



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 266**

51 Int. Cl.:

C12N 15/25 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 14/545 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00937687 .2**

86 Fecha de presentación : **22.05.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1179068**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2002**

54 Título: **Interleuquina-1 Hy2, materiales y métodos.**

30 Prioridad: **20.05.1999 US 316081**
10.03.2000 US 522964

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **Nuvelo, Inc.**
675 Almanor Avenue
Sunnyvale, California 94085, US

72 Inventor/es: **Ballinger, Dennis, G.;**
Ford, John;
Ho, Alice, Suk-Yue;
Lin, Hai, Shan y
Pace, Ann, M.

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

DESCRIPCIÓN

Interleuquina-1 Hy2, materiales y métodos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo polinucleótido que codifica una proteína denominada IL-1 Hy2, que está relacionada estructuralmente con la proteína antagonista del receptor de Interleuquina-1, junto con utilidades terapéuticas, diagnósticas y de investigación para estos productos y productos afines.

10 **Antecedentes**

La interleuquinas están implicadas en la inflamación y la respuesta inmunitaria, en parte por activación de células endoteliales. Inmunomediadores distintos tales como factor de necrosis tumoral (TNF), Interleuquina-1 (IL-1) y gamma-interferón (IFN) parecen inducir patrones diferentes pero parcialmente solapantes de activación de células endoteliales que incluyen actividad procoagulante incrementada (Bevilaqua) (1976, PNAS, 83: 4533-4537), producción de PG1 y 2 (Rossi (1985), Science, 229: 174-176), expresión del antígeno HLA (Pober (1987) J. Immunol., 138: 3319-3324) y moléculas de adhesión de linfocitos (Carender (1987) J. Immunol., 138:2149-2154). Se ha comunicado también que estas citoquinas causan hipotensión, hemorragia vascular, e isquemia (Goldblum *et al.*, 1989, Tracey *et al.*, Science 234-479, 1986). Una toxicidad importante de estos y de otros modificadores de la respuesta biológica es la hipotensión y la fuga vascular (Dvorak (1989) J.N.C.I., 81: 497-502).

La IL-1 es producida por varios tipos de células, con inclusión de monocitos y macrófagos, células de Langerhans, células agresoras naturales, células B, líneas de células leucémicas de células T, neutrófilos, células endoteliales, células dendríticas, líneas de células de melanoma, células mesangiales, astrocitos, células de glioma, células de microglía, fibroblastos y células epiteliales. Dos formas de IL-1 han sido aisladas: IL-1 α e IL-1 β . Las mismas representan los productos de dos genes distintos y sus formas maduras son proteínas de 159 y 153 aminoácidos, respectivamente. Estas moléculas son activadores celulares extremadamente potentes y multifuncionales, con un espectro que abarca células de origen hematopoyético, desde precursores inmaduros a leucocitos diferenciados, elementos de la pared de los vasos, y células de origen mesenquimático, nervioso y epitelial. IL-1 induce también la producción de citoquinas secundarias, con inclusión de IL-6, factores estimulantes de colonias (CSFs) y quimioquinas. IL-1 es activa como factor de crecimiento y diferenciación hematopoyéticos; activa las células endoteliales de una manera pro-inflamatoria y pro-trombótica (con inclusión de la inducción de la producción de factor tisular y factor de activación plaquetaria); estimula la liberación de hormona liberadora de corticotropina (CRH) que causa finalmente la liberación de corticosteroides por las glándulas suprarrenales; media la respuesta de fase aguda (con inclusión de la inducción de la producción por los hepatocitos de proteínas de fase aguda) y es un mediador central de reacciones inflamatorias locales y sistémicas que pueden conducir a sepsis y choque séptico; es el pirógeno endógeno primario (causante de la fiebre); induce sueño de onda lenta y anorexia; puede jugar un papel en enfermedades destructivas de articulaciones y huesos (con inclusión de la inducción de la producción de colagenasa por las células sinoviales y de metaloproteinasas por los condrocitos); estimula la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno; y puede jugar un papel en la patogénesis de la diabetes Tipo I dependiente de insulina por su toxicidad para las células beta productoras de insulina en los islotes de Langerhans.

El camino de IL-1 está constituido por los dos agonistas IL-1 α e IL-1 β , un sistema de activación específico (enzima convertidora de IL-1), un antagonista de receptor (IL-1Ra) producido en diferentes isoformas y dos receptores de afinidad alta. IL-1 α e IL-1 β se fijan a dos tipos de receptores de IL-1 distintos, el Tipo I de receptor de IL-1 (IL-1RI) y el Tipo II de receptor de IL-1 (IL-1RII), los dos cuales son miembros de la superfamilia de receptores de inmunoglobulina. Ambos tipos de receptores se coexpresan usualmente, aunque el Tipo I es la forma predominante en los fibroblastos y las células T, mientras que el Tipo II se expresa preferentemente en células B, monocitos y neutrófilos. IL-1RI e IL-1RII tienen afinidades diferentes para los tres ligandos de la familia de IL-1 (IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra). En particular, IL-1Ra se fija al receptor Tipo I con una afinidad similar a la de IL-1 α , mientras que IL-1Ra se fija al receptor de Tipo II 100 veces menos eficientemente que el receptor de Tipo I. Existe evidencia indicativa de que las actividades inducidas por IL-1 están mediadas exclusivamente por el receptor de Tipo I, mientras que el receptor de Tipo II no tiene actividad de señalización alguna e inhibe las actividades de IL-1 por actuar como reclamo para IL-1.

El antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra o IRAP) se fija al receptor de IL-1 con afinidad similar a la de IL-1, pero no tiene actividad alguna semejante a IL-1, incluso a concentraciones muy altas, y por tanto inhibe (antagoniza) la actividad de IL-1. La molécula de IL-1Ra purificada tiene un peso molecular de aproximadamente 22 kD y se cree que está glicosilada. La misma tiene una semejanza de secuencia limitada con IL-1 α e IL-1 β al nivel de aminoácidos (19% y 26%, respectivamente). Parecen existir al menos dos isoformas de IL-1Ra, que incluyen una forma soluble y una forma intracelular generada por un suceso de remodelación alternativo. IL-1Ra parece ser producida por monocitos, macrófagos, neutrófilos y fibroblastos; los queratinocitos y células de origen epitelial producen casi exclusivamente la forma intracelular. En humanos, el gen para IL-1Ra ha sido localizado en la rama larga del cromosoma 2, que es la misma región en la que se encuentran IL-1 α e IL-1 β , así como IL-1RI e IL-1RII.

La aptitud de IL-1 para modificar las respuestas biológicas ha sido demostrada en una diversidad de estudios. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración de IL-1 a conejos (Wakabayashi *et al.*, FASEB J 1991;5:338;

Okusawa *et al.* J Clin Invest 1988; 81:1162; Ohlsson *et al.*, Nature 1990; 348:550; Aiura, *et al.* Cytokine 1991; 4:498) y primates (Fischer *et al.*, Am. J. Physiol. 1991; 261: R442) da como resultado hipotensión, taquicardia, edema pulmonar, insuficiencia renal, y, eventualmente, la muerte, dependiendo de la dosis. Cuando se examina el suero de los animales tratados con IL-1, la elevación de otras citoquinas es evidente, mimetizando los niveles observados en la

5 p pancreatitis aguda en humanos. (Guice *et al.*, J. Surg. Res. 1991; 51: 495-499; Heath *et al.*, Pancreas 1993; 66: 41-45). Existe una gran cantidad de pruebas disponibles actualmente que soportan el papel de IL-1 como mediador principal de la respuesta sistémica a enfermedades tales como sepsis y pancreatitis, y como activador de los miembros restantes de la cascada de citoquinas. (Dinarello *et al.*, Arch. Surg. 1992; 127: 1350-1353).

10 IL-1 es un mediador fundamental en la respuesta inflamatoria (para revisiones, véase Dinarello (1991) Blood 77: 1627-1652; Dinarello *et al.*, (1993) New England J. Med. 328: 106-113; Dinarello (1994) FASEB J. 8: 1314-1325). La importancia de IL-1 en la inflamación ha sido demostrada por la capacidad de la proteína antagonista del receptor de IL-1 altamente específica para aliviar las condiciones inflamatorias (para revisión, véase Dinarello (1991) Blood 77: 1627-1652; Dinarello *et al.*, (1993) New England J. Med. 328: 106-113; Dinarello (1994) FASEB J. 8: 1314-1325; Dinarello (1993) Immunol. Today 14: 260-264). Muchos de los efectos pro-inflamatorios de IL-1, tales como la regulación ascendente de moléculas de adhesión celular en los endotelios vasculares, se ejercen al nivel de la regulación de la transcripción. La activación de la transcripción por IL-1 de las moléculas de adhesión celular y otros genes implicados en la respuesta inflamatoria parece estar mediada en gran parte por NF-kappa B (Shirakawa *et al.* (1989) Molec. Cell Biol. 9: 2424-2430; Osborn *et al.*, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2336-2340; Krasnow *et al.*, (1991) Cytokine 3: 372-379; Collins *et al.*, (1993) Trends Cardiovasc. Med. 3: 92-97). En respuesta a IL-1, el factor inhibidor de NF-kappa B, I kappa B se degrada y se libera NF-kappa B de su estado citoplásmico inactivo para localizarse dentro del núcleo, donde el mismo fija DNA y activa la transcripción (Liou *et al.*, (1993) Curr. Opin. Cell Biol. 5: 477-487; Beg *et al.*, (1993) Mol. Cell. Bid. 13: 3301-3310).

25 IL-1 es también un mediador del choque séptico. El choque séptico, una complicación amenazante para la vida de las infecciones bacterianas, afecta a 150.000 hasta 300.000 pacientes anualmente en los Estados Unidos (Parrillo, J.E. (1989), Septic Shock in Humans: Clinical Evaluation, Pathogenesis, and Therapeutic Approach (2nd ed.) En: Textbook of Critical Care Shoemaker, *et al.*, compiladores, Saunders Publishing Co., Philadelphia. Pa., pp. 1006). El colapso cardiovascular y las perturbaciones metabólicas múltiples asociadas con el choque séptico son debidos en gran parte a la endotoxina bacteriana (ET), que se ha demostrado provoca una condición semejante al choque séptico cuando se administra a animales (Natanson, *et al.*, (1989). Endotoxin and Tumor Necrosis Factor Challenges in Dogs Simulate the Cardiovascular Profile of Human Septic Shock. J. Exp. Med. 169: 823).

35 Así pues, existe una gran necesidad de moduladores de IL-1 que puedan ser útiles para modular la inflamación y la respuesta inmunitaria.

Sumario de la invención

40 Las composiciones de la presente invención incluyen nuevos péptidos aislados, en particular, nuevas proteínas de interleuquina humana-1 Hy2 (IL-1 Hy2) y variantes activas de las mismas, polinucleótidos aislados que codifican tales polipéptidos, con inclusión de moléculas de DNA recombinante, genes clonados o variantes degeneradas de los mismos, especialmente variantes existentes naturalmente tales como variantes alélicas, moléculas de polinucleótidos antisentido, y anticuerpos que reconocen específicamente uno o más epítopes presentes en tales polipéptidos, así como hibridomas que producen tales anticuerpos.

45 Las composiciones de la presente invención incluyen adicionalmente vectores, con inclusión de vectores de expresión, que contienen los polinucleótidos de la invención, células modificadas por ingeniería genética que contienen tales polinucleótidos y células modificadas por ingeniería genética que expresan tales polinucleótidos.

50 Los polinucleótidos de la invención incluyen DNA existente naturalmente o total o parcialmente sintético, v.g., cDNA y DNA genómico, y RNA, v.g. mRNA. Los polinucleótidos aislados de la invención incluyen un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2 ó 13. Los polinucleótidos aislados de la invención incluyen adicionalmente un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14; un polinucleótido que comprende la secuencia codificante de la proteína de longitud total de SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14; y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificante de la proteína madura de SEQ ID nos: 1, 12 ó 14. Los polinucleótidos de la presente invención incluyen también un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad de IL-1 Hy2 y que se hibrida en condiciones de hibridación severas al complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

60 Los polinucleótidos de la invención incluyen adicionalmente el complemento de cualquiera de los polinucleótidos citados anteriormente.

Una colección como la utilizada en esta solicitud puede ser una colección de un solo polinucleótido. La colección de información de secuencias o información de identificación de cada secuencia puede proporcionarse en una red de ácido nucleico. En una realización, se proporcionan segmentos de información de secuencias en una red de ácido nucleico para detectar el polinucleótido que contiene el segmento. La red puede diseñarse para detectar ácidos nucleicos que son perfectamente complementarios (apareamiento total) o desapareados respecto al polinucleótido que contiene el segmento. La colección puede proporcionarse también en un formato legible por ordenador.

Los polipéptidos aislados de la invención incluyen un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2 ó 13, o una porción del mismo correspondiente a la proteína de longitud total o madura. Los polipéptidos de la invención incluyen también polipéptidos con actividad de IL-1 Hy2 que están codificados por (a) polinucleótidos que codifican SEQ ID NOS: 2 ó 13; (b) polinucleótidos que se hibridan al complemento de los polinucleótidos de (a) en condiciones de hibridación severas. Se contemplan también variantes biológica o inmunológicamente activas de la secuencia de la proteína IL-1Ra de SEQ ID NOS: 2 ó 13 y “equivalentes sustanciales” de la misma (v.g., con 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 99% de identidad de aminoácidos) que retienen actividad de IL-1 Hy2, preferiblemente actividad antagonista de IL-1. Los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse total o parcialmente por vía química, pero preferiblemente se producen por medios recombinantes utilizando las células modificadas por ingeniería genética (v.g. células hospedadoras) de la invención.

Las composiciones de proteínas de la presente invención pueden comprender adicionalmente un vehículo aceptable, tal como un vehículo hidrófilo, v.g., farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere también a métodos para producir polipéptidos de la invención que comprenden dejar crecer un cultivo de las células de la invención en un medio de cultivo adecuado en condiciones que permiten la expresión de un polipéptido deseado, y purificar la proteína a partir de las células o el medio de cultivo. Realizaciones preferidas incluyen aquéllas en las cuales la proteína producida por dicho proceso es una forma madura de la proteína.

Los polinucleótidos de acuerdo con la invención tienen numerosas aplicaciones en una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en biología molecular. Estas técnicas incluyen el uso como sondas de hibridación, uso como oligómeros para PCR, uso para mapeado de cromosomas y genes, uso en la producción recombinante de proteína, y uso en la segregación de DNA o RNA antisentido, sus análogos químicos, etcétera. Por ejemplo, cuando la expresión de un mRNA está restringida en gran parte a un tipo particular de célula o tejido, los polinucleótidos de la invención pueden utilizarse como sondas de hibridación para detectar la presencia del mRNA particular de la célula o tejido en una muestra utilizando, v.g., hibridación *in situ*.

En otras realizaciones ilustrativas, los polinucleótidos se utilizan en diagnósticos como marcadores de secuencia expresados para identificar genes expresados o, como es bien conocido en la técnica y ha sido ilustrado por Vollrath *et al.*, Science 258: 52-59 (1992), como marcadores de secuencia expresados para mapeado físico del genoma humano.

Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden utilizarse en una diversidad de procedimientos y métodos convencionales que se aplican actualmente a otras proteínas. Por ejemplo, puede utilizarse un polipéptido de la invención para generar un anticuerpo que se fija específicamente al polipéptido. Los polipéptidos de la invención pueden utilizarse también como marcadores de peso molecular, y como suplemento alimentario. Se contemplan también animales transgénicos con expresión alterada de los polipéptidos de la invención (es decir animales “knockout”) o animales que sobreexpresan IL-1 Hy2).

Se proporcionan también métodos para prevención, tratamiento o mejora de una afección médica que comprenden administrar a un individuo mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una proteína de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En particular, los polipéptidos y polinucleótidos de la invención pueden utilizarse, por ejemplo, como parte de los métodos para la prevención y/o el tratamiento de trastornos mediados por IL-1, IL-18 y/o IL-12 que incluyen trastornos que implican sepsis (y afecciones asociadas tales como fiebre, taquicardia, taquipnea, sobre-estimulación de citoquinas, permeabilidad vascular incrementada, hipotensión, activación del complemento, coagulación intravascular diseminada, anemia, trombocitopenia, leucopenia, edema pulmonar, síndrome de ansiedad respiratoria en los adultos, isquemia intestinal, insuficiencia y fallo renales, acidosis metabólica y síndrome de disfunción multiorgánica), choque endotóxico, choque inducido por citoquinas, trombosis, pancreatitis aguda, artritis reumatoide o reactiva, artritis inflamatoria crónica, vasculitis, lupus, glomerulonefritis compleja inmune, deterioro de las células pancreáticas por diabetes mellitus tipo 1, trasplante de aloinjertos y xenoinjertos, enfermedad de rechazo inverso, enfermedad inflamatoria intestinal, inflamación asociada con enfermedad pulmonar, otras enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias, un agente antiproliferativo tal como en el caso de la leucemia mielógena aguda o crónica, carcinoma de ovario, o en la prevención del parto prematuro secundario a infecciones intra-uterinas, enfermedades degenerativas óseas tales como osteoporosis, y trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer.

Se contempla también de acuerdo con la invención la administración simultánea de otros agentes que inhiben la producción o actividad de IL-1 (tales como GM-CSF, IL-4, IL-10, IL-13 y el factor beta del crecimiento transformante) u otros agentes anti-inflamatorios (tales como IL-1Ra, proteínas IL-1 Hy1 semejantes a IL-1Ra descritas en la solicitud U.S. No. de Serie 09/287.210 presentada el 5 de abril 1999 también en tramitación, que se incorpora en esta memoria por referencia, anti-TNF, corticosteroides, y agentes inmunosupresores).

Los métodos de la presente invención se refieren adicionalmente a métodos para detectar la presencia de los polinucleótidos o polipéptidos de la invención en una muestra. Dichos métodos pueden utilizarse, por ejemplo, como parte de la evaluación de pronóstico y diagnóstico de trastornos como los arriba citados y para la identificación de individuos que exhiben una predisposición a tales condiciones. Adicionalmente, la invención proporciona métodos para evaluación de la eficacia de fármacos, y monitorización del progreso de pacientes implicados en pruebas clínicas para el tratamiento de trastornos como los arriba citados.

La invención proporciona también métodos para la identificación de compuestos que modulan (es decir, aumentan o disminuyen) la expresión o actividad de los polinucleótidos y/o polipéptidos de la invención. Tales métodos pueden utilizarse, por ejemplo, para identificación de compuestos que pueden mejorar los síntomas de trastornos como los arriba citados. Tales métodos pueden incluir, pero sin carácter limitante, ensayos para identificar compuestos y otras sustancias que interaccionan con (v.g., se fijan a) los polipéptidos de la invención.

Los métodos de la invención incluyen también métodos para el tratamiento de trastornos como los arriba citados que pueden implicar la administración de tales compuestos a individuos que exhiben síntomas o tendencias relacionadas con trastornos como los arriba citados. Adicionalmente, la invención abarca métodos para el tratamiento de enfermedades o trastornos como los arriba citados por administración de compuestos y otras sustancias que modulan la actividad global de los productos del gen diana. Los compuestos y otras sustancias pueden producir dicha modulación sea al nivel de expresión del gen diana o la actividad de la proteína diana.

La invención proporciona adicionalmente un método de tratamiento de un estado de enfermedad inflamatoria mediado por IL-18 que comprende administrar a un individuo que se encuentra en necesidad de ello una cantidad de un polinucleótido, polipéptido o agonista de IL-1 Hy2 eficaz para inhibir la actividad de IL-18. Se proporcionan también métodos de inhibición *in vitro* e *in vivo* de la actividad de IL-18.

Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A-1B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de IL-1 Hy2 (SEQ ID NO: 2) con las secuencias de IL-1 Hy1 (descrita en el documento U.S. No. de Serie 09/287.210, en co-propiedad y también en tramitación, presentado el 5 de abril de 1999), IL-1 Ra de rata, IL-1Ra de cerdo, IL-1Ra humano secretado (Hu sIL-1Ra) e IL-1 Ra humano intracelular (Hu icIL-1Ra), SEQ ID NOS: 5-9, respectivamente. En estas figuras, A - alanina; R - arginina; N - asparagina; D - ácido aspártico, C - cisteína; E - ácido glutámico; Q - glutamina, G - glicina, H - histidina; I - isoleucina; L - leucina, K - lisina, M - metionina; F - fenilalanina; P - prolina, S - serina; T - treonina, W - triptófano; Y - tirosina, V - valina, X - cualquiera de los 20 aminoácidos. Las lagunas se representan como guiones. Los números de aminoácidos para todas las secuencias se marcan de acuerdo con ello. Los residuos encerrados en recuadros indican secuencia de consenso o conservada.

Fig. 2 expone SEQ ID NO: 12, que representa la secuencia de cDNA predicha basada en la secuencia genómica humana de IL-1 Hy2.

Fig. 3 expone SEQ ID NO: 13, que representa la secuencia de aminoácidos humana codificada por el marco de lectura abierto más largo de SEQ ID NO: 12, que es una forma alternativa del polipéptido IL-1 Hy2.

Fig. 4 expone SEQ ID NO: 14, que representa la secuencia de cDNA de los clones de IL-1 Hy2 que se extiende hasta la región 5' de SEQ ID NO: 1.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

El término "secuencia de nucleótidos", hace referencia a un heteropolímero de nucleótidos o a la secuencia de estos nucleótidos. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan también de modo intercambiable en esta memoria para hacer referencia a un heteropolímero de nucleótidos. Generalmente, los segmentos de ácido nucleico proporcionados por esta invención pueden ensamblarse a partir de fragmentos del genoma y enlazadores oligonucleotídicos cortos, o a partir de una serie de oligonucleótidos, o de nucleótidos individuales, para proporcionar un ácido nucleico sintético que es capaz de ser expresado en una unidad de transcripción recombinante que comprende elementos reguladores derivados de un operón microbiano o viral, o un gen eucariota.

Los términos "fragmento oligonucleotídico" o "fragmento de polinucleótido", "porción", o "segmento" es un tramo de residuos de nucleótidos polipeptídicos que es suficientemente largo para utilizar en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o diversos procedimientos de hibridación para identificar o amplificar partes idénticas o afines de moléculas de mRNA o DNA.

Los términos "oligonucleótidos" o "sondas de ácido nucleico" se preparan basándose en las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente invención. Los oligonucleótidos comprenden porciones de una secuencia de polinucleótidos de este tipo que tienen al menos aproximadamente 15 nucleótidos y usualmente al menos aproximadamente 20 nucleótidos. Las sondas de ácido nucleico comprenden porciones de una secuencia de polinucleótidos de este tipo que tienen menos nucleótidos que aproximadamente 6 kb, usualmente menos que aproximadamente 1 kb. Después del ensayo apropiado para eliminar resultados positivos falsos, estas sondas pueden, por ejemplo, utilizarse para determinar si moléculas específicas de mRNA están presentes en una célula o tejido o para aislar secuencias similares de ácido nucleico a partir del DNA cromosómico como se describe por Walsh *et al.* (Walsh, P.S *et al.*, 1992, PCR Methods Appl. 1: 241-2250).

El término "sondas" incluye ácidos nucleicos mono- o bicatenarios existentes naturalmente o sintetizados por medios recombinantes o medios químicos. Los mismos pueden estar marcados por traslación de la mella, reacción

de rellenado con Klenow, PCR u otros métodos bien conocidos en la técnica. Las sondas de la presente invención, su preparación y/o marcación se elaboran en Sambrook, J. *et al.*, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY; o en Ausubel, F.M. *et al.*, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York NY, los dos cuales se incorporan en esta memoria por referencia en su totalidad.

El término “severo” se utiliza para hacer referencia a condiciones que se comprenden comúnmente en la técnica como severas. Las condiciones severas pueden incluir condiciones altamente severas (es decir, hibridación a DNA fijado a un filtro en NaHPO_4 0,5M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en 0,1 x SSC/0,1% SDS a 68°C), y condiciones moderadamente severas (es decir, lavado en 0,2 x SSC/0,1% SDS a 42°C).

En casos en que está implicada hibridación de desoxiligonucleótidos, condiciones de hibridación severas ilustrativas adicionales incluyen lavado en 6 x SSC/0,05% pirofosfato de sodio a 37°C (para oligonucleótidos de 14 bases), 48°C (para oligonucleótidos de 17 bases), 55°C (para oligonucleótidos de 20 bases), y 60°C (para oligonucleótidos de 23 bases).

El término “recombinante”, cuando se utiliza en esta memoria para hacer referencia a un polipéptido o una proteína, significa que un polipéptido o proteína se deriva de sistemas de expresión recombinantes (v.g. microbianos o de mamífero). “Microbiano” hace referencia a polipéptidos o proteínas recombinantes fabricados en sistemas de expresión bacterianos o fúngicos (v.g., levadura). Como producto, “microbiano recombinante” define un polipéptido o proteína esencialmente exento de sustancias endógenas nativas y que no está acompañado por glicosilación nativa asociada. Los polipéptidos o proteínas expresados en la mayoría de los cultivos bacterianos, v.g. *E. coli*, estarán exentos de modificaciones de glicosilación; los polipéptidos o proteínas expresados en levadura tendrán un patrón de glicosilación diferentes en general de los expresados en células de mamífero.

El término “vehículo o vector de expresión recombinante” hace referencia a un plásmido o fago o virus o vector, para expresar un polipéptido de una secuencia de DNA(RNA). Un vehículo de expresión puede comprender una unidad de transcripción que comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tiene una función reguladora en la expresión génica, por ejemplo, promotores o intensificadores, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en mRNA y se traduce en proteína, y (3) secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción. Las unidades estructurales destinadas para uso en sistemas de expresión de levaduras o eucariotas incluyen preferiblemente una secuencia conductora que hace posible la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedadora. Alternativamente, en los casos en que se expresa proteína recombinante sin una secuencia conductora o de transporte, la misma puede incluir un residuo metionina N-terminal. Este residuo puede escindirse o no subsiguientemente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

El término “sistema de expresión recombinante” significa células hospedadoras que han integrado de manera estable una unidad de transcripción recombinante en su DNA cromosómico o que llevan la unidad de transcripción recombinante extracromosómicamente. Sistemas de expresión recombinantes como se definen en esta memoria expresarán polipéptidos o proteínas heterólogos por inducción de los elementos reguladores enlazados al segmento de DNA o gen sintético a expresar. Este término significa también células hospedadoras que han integrado de manera estable un elemento o elementos genético(s) recombinante(s) que tiene(n) un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o intensificadores. Sistemas de expresión recombinantes como se definen en esta memoria expresarán polipéptidos o proteínas endógenos(as) a la célula después de inducción de los elementos reguladores enlazados al segmento de DNA endógeno o gen a expresar. Las células pueden ser procariotas o eucariotas.

El término “marco de lectura abierto”, ORF, significa una serie de tripletes de nucleótidos que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación y es una secuencia traducible en proteína.

El término “fragmento modulador de la expresión”, “EMF”, significa una serie de oligonucleótidos que modula la expresión de un ORF enlazado operativamente u otro EMF.

Como se utiliza en esta memoria, se dice que una secuencia “modula la expresión de una secuencia enlazada operativamente” cuando la expresión de la secuencia se ve alterada por la presencia del EMF. Los EMFs incluyen, pero sin carácter limitante, promotores, y secuencias moduladoras de promotores (elementos inducibles). Una clase de EMFs son fragmentos que inducen la expresión de un ORF enlazado operativamente en respuesta a un factor o suceso fisiológico regulador específico.

Como se utiliza en esta memoria, un “fragmento modulador de la absorción”, UMF, significa una serie de nucleótidos que median la absorción de un fragmento de DNA enlazado en una célula. Los UMFs pueden identificarse fácilmente utilizando UMFs conocidos como secuencia diana o motivo diana con los sistemas basados en ordenador descritos más adelante.

La presencia y actividad de un UMF puede confirmarse por fijación del UMF sospechoso a una secuencia marcadora. La molécula de ácido nucleico resultante se incuba luego con un hospedador apropiado en condiciones apropiadas y se determina la absorción de la secuencia marcadora. Como se ha descrito arriba, un UMF aumentará la frecuencia de absorción de una secuencia marcadora enlazada.

El término “activo” hace referencia a aquellas formas del polipéptido que retienen las actividades biológicas y/o inmunológicas de cualquier polipéptido existente naturalmente. De acuerdo con la invención, el término “biológicamente activo” con referencia a IL-1 Hy2 significa que el polipéptido retiene al menos una de las actividades biológicas, preferiblemente la actividad antagonista de IL-1, de la IL-1 Hy2 humana, mientras que el término “inmunológicamente activo” con referencia a IL-1 Hy2 significa que el polipéptido retiene al menos una de las actividades inmunológicas o antigénicas de IL-1 Hy2 humana.

El término “polipéptido existente naturalmente” hace referencia a polipéptidos producidos por células que no se han sometido a ingeniería genética y contempla específicamente diversos polipéptidos procedentes de modificaciones posteriores a la traducción del polipéptido que incluyen, sin carácter limitante, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación.

El término “derivado” hace referencia a polipéptidos modificados químicamente por técnicas tales como ubiquitinación, marcación (v.g., con radionucleidos de diversas enzimas), pegilación (derivatización con polietilenglicol), e inserción o sustitución por síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que no existen normalmente en las proteínas humanas.

El término “variante” o “análogo” hace referencia a cualquier polipéptido que difiere de los polipéptidos existentes naturalmente por inserciones, deleciones, y sustituciones de aminoácidos, creadas utilizando técnicas de DNA recombinante. La guía en la determinación de qué residuos de aminoácidos pueden reemplazarse, añadirse o suprimirse sin anular las actividades de interés, tales como actividad antagonista de IL-1, puede encontrarse por comparación de la secuencia del polipéptido particular con la de péptidos homólogos humanos o de otros mamíferos, v.g. IL-1Ra, IL-1 Hy1, o IL-1, y minimización del número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de alta homología (regiones conservadas) o por reemplazamiento de aminoácidos con secuencia de consenso.

Preferiblemente, las “sustituciones” de aminoácidos son el resultado del reemplazamiento de un aminoácido con otro aminoácido que tenga estructura similar y/o propiedades químicas, es decir, reemplazamientos de aminoácidos conservadores. Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos “conservadoras” sobre la base de semejanza en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, y metionina; los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las “inserciones” o “deleciones” están comprendidas típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede ser determinada experimentalmente por realización sistemática de inserciones, deleciones, o sustituciones de aminoácidos en la molécula de polipéptido utilizando técnicas de DNA recombinante y ensayando las variantes recombinantes respecto a actividad.

Alternativamente, en los casos en que se desea alteración de la función, las inserciones, deleciones o alteraciones no conservadoras pueden modificarse por ingeniería genética para producir polipéptidos alterados. Tales alteraciones pueden, por ejemplo, alterar una o más de las funciones biológicas o características bioquímicas de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, tales alteraciones pueden cambiar las características del polipéptido tales como afinidades de fijación de ligandos, afinidades intercatenarias, o tasa de degradación/reposición. Adicionalmente, tales alteraciones pueden seleccionarse a fin de generar polipéptidos que sean más adecuados para expresión, aumento de escala y análogos en las células hospedadoras seleccionadas para la expresión. Por ejemplo, los residuos cisteína pueden delecionarse o sustituirse con otro residuo de aminoácido con objeto de eliminar puentes disulfuro.

Tal como se utiliza en esta memoria, “sustancialmente equivalente” puede hacer referencia tanto a secuencias de nucleótidos como a secuencias de aminoácidos, por ejemplo una secuencia mutante, que varía respecto a una secuencia de referencia por una o más sustituciones, deleciones, o adiciones, cuyo efecto neto no da como resultado un desemejanza funcional desfavorable entre la referencia y las secuencias objeto. Típicamente, dicha secuencia sustancialmente equivalente varía con respecto a una de las enumeradas en esta memoria en no más de aproximadamente 20% (es decir, el número de sustituciones, adiciones, y/o deleciones de restos individuales en una secuencia sustancialmente equivalente, en comparación con la secuencia de referencia correspondiente, dividido por el número total de residuos en la secuencia sustancialmente equivalente que es aproximadamente 0,2 o menos. Una secuencia de este tipo se dice que tiene 80% de identidad de secuencia con la secuencia incluida en el listado. En una realización, una secuencia sustancialmente equivalente, v.g., mutante, de la invención, varía con respecto a una secuencia incluida en la lista en no más de 10% (90% de identidad de secuencia); en una variación de esta realización, en no más de 5% (95% de identidad de secuencia); y en una variación adicional de esta realización, en no más de 2% (98% de identidad de secuencia). Secuencias de aminoácidos sustancialmente equivalentes, v.g. mutantes, de acuerdo con la invención tienen generalmente al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos listada, mientras que una secuencia de nucleótidos sustancialmente equivalente de la invención puede tener menores porcentajes de identidad de secuencia, teniendo en cuenta, por ejemplo, la redundancia o regeneración del código genético. Para los propósitos de la presente invención, secuencias que tienen actividad biológica sustancialmente equivalente y características de expresión sustancialmente equivalentes se consideran sustancialmente equivalentes. Para los propósitos de determinación de la equivalencia, debería ignorarse la truncación de la secuencia madura (v.g., por una mutación que crea un codón de parada espurio). La identidad de secuencia puede determinarse, v.g., utilizando el método de Jotun Hein.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican tales secuencias sustancialmente equivalentes, v.g., secuencias de las identidades de porcentajes citadas, pueden aislarse e identificarse rutinariamente por procedimientos estándar de hibridación bien conocidos por los expertos en la técnica.

5 En caso deseado, puede diseñarse un vector de expresión que contenga una “secuencia señal o conductora”, que dirigirá el polipéptido a través de la membrana de una célula. Una secuencia de este tipo puede estar presente naturalmente en los polipéptidos de la presente invención o proporcionarse a partir de fuentes de proteínas heterólogas por técnicas de DNA recombinante.

10 Un “fragmento”, “porción” o “segmento” polipeptídico es un tramo de residuos de aminoácidos de la menos aproximadamente 5 aminoácidos, a menudo al menos aproximadamente 7 aminoácidos, típicamente al menos aproximadamente 9 a 13 aminoácidos, y, en diversas realizaciones, al menos aproximadamente 17 o más aminoácidos. Para ser activo, cualquier polipéptido debe tener una longitud suficiente para exhibir actividad biológica y/o inmunológica.

15 Alternativamente, las variantes recombinantes que codifican estos o similares polipéptidos pueden sintetizarse o seleccionarse haciendo uso de la “redundancia” del código genético. Diversas sustituciones de codones, tales como los cambios silenciosos que producen diversos sitios de restricción, pueden introducirse para optimizar la clonación en un plásmido o vector viral o la expresión en un sistema particular procarionota o eucariota. Las mutaciones en la secuencia de polinucleótidos pueden reflejarse en el polipéptido o dominios de otros péptidos añadidos al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, a fin de cambiar características tales como las afinidades de fijación de ligandos, las afinidades intercatenarias, o la tasa de degradación/reposición.

20 El término células “activadas” tal como se utiliza en esta solicitud son aquéllas que están involucradas en el tráfico de membrana extracelular o intracelular, con inclusión de la exportación de moléculas neurosecretoras o enzimáticas como parte de un proceso normal o de enfermedad.

25 El término “purificado”, tal como se utiliza en esta memoria, denota que el ácido nucleico o polipéptido indicado está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, v.g., polinucleótidos, proteínas, etcétera. En una realización, el polinucleótido o polipéptido se purifica de tal manera que el mismo constituye al menos 95% en peso, más preferiblemente al menos 99,8% en peso de las macromoléculas biológicas indicadas presentes (si bien puede estar presente agua, tampones, y otras moléculas pequeñas (especialmente moléculas que tengan un peso molecular inferior a 1000 Daltons).

30 El término “aislado”, tal como se utiliza en esta memoria, hace referencia a un ácido nucleico o polipéptido separado a partir de la menos otro componente (v.g., ácido nucleico o polipéptido) presente con el ácido nucleico o polipéptido en su fuente natural. En una realización, el ácido nucleico o polipéptido se encuentra en presencia de (si acaso) únicamente un disolvente, tampón, ion u otro componente normalmente presente en una solución del mismo. Los términos “aislado” y “purificado” no abarcan ácidos nucleicos o polipéptidos presentes en su fuente natural.

35 El término “infección” hace referencia a la introducción de ácidos nucleicos en una célula hospedadora adecuada por el uso de un virus o vector viral.

40 El término “transformación” significa introducción de DNA en una célula hospedadora adecuada de tal modo que el DNA es replicable, sea como un elemento extracromosómico, o por integración cromosómica.

45 El término “transfección” hace referencia a la absorción de un vector de expresión por una célula hospedadora adecuada, tanto si se expresa como si no se expresa de hecho secuencia codificante alguna.

50 El término “fragmento intermedio” significa un ácido nucleico de longitud comprendida entre 5 y 1000 bases, y preferiblemente con una longitud comprendida entre 10 y 40 pb.

55 El término “secretado” incluye una proteína que es transportada a través o a lo largo de una membrana, con inclusión de transporte como resultado de secuencias señal en su secuencia de aminoácidos cuando la misma se expresa en una célula hospedadora adecuada. Las proteínas “secretadas” incluyen, sin limitación, proteínas secretadas totalmente (v.g., proteínas solubles) o parcialmente (v.g., receptores) a partir de la célula en la que se expresan las mismas. Las proteínas “secretadas” incluyen también, sin limitación, proteínas que se transportan a través de la membrana del retículo endoplásmico. Debe entenderse que las proteínas “secretadas” incluyen también proteínas que contienen secuencias señal no típicas (v.g. Interleuquina-I Beta, véase Krasney, P.A. and Young, P.R. (1992) Cytokine 4(2): 134-143) y factores liberados por células deterioradas (v.g. el Antagonista del Receptor de Interleuquina-I, véase Arend, W.P. *et. al.* (1998) Annu. Rev. Immunol. 16:27-55).

60 Debe entenderse que cada uno de los términos anteriores abarca todo lo que se describe para cada uno, a no ser que el contexto dicte otra cosa.

Ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la invención se exponen a continuación. Fragmentos de las proteínas de la presente invención que son capaces de exhibir actividad biológica se abarcan también por la presente invención. Los fragmentos de la proteína pueden encontrarse en forma lineal o pueden estar ciclados utilizando métodos conocidos, por ejemplo, como se describe en H. U. Saragovi, *et al.*, Bio/Technology 10, 773-778 (1992) y en R. S. McDowell, *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 114, 9245-9253 (1992), los dos cuales se incorporan en esta memoria por referencia. Tales fragmentos pueden fusionarse a moléculas portadoras tales como inmunoglobulinas para muchos propósitos, con inclusión del aumento de la valencia de los sitios de fijación de proteínas. Por ejemplo, fragmentos de la proteína pueden fusionarse a través de secuencias "enlazadoras" a la porción Fc de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la proteína, una fusión de este tipo podría ser a la porción Fc de una molécula IgG. Otros isotipos de inmunoglobulina pueden utilizarse también para generar tales fusiones. Por ejemplo, una fusión proteína-IgM generaría una forma decavalente de la proteína de la invención.

La presente invención proporciona también formas de longitud total y formas maduras (por ejemplo, sin una secuencia señal o secuencia precursora) de las proteínas descritas. La forma de longitud total de tales proteínas se identifica en el listado de secuencia por traducción de la secuencia de nucleótidos de cada uno de los clones descritos. La forma madura de dicha proteína puede obtenerse por expresión del polinucleótido de longitud total descrito en una célula de mamífero adecuada u otra célula hospedadora. La secuencia de la forma madura de la proteína puede determinarse también a partir de la secuencia de aminoácidos de la forma de longitud total. En los casos en que la proteína de la presente invención está fijada a la membrana, se proporcionan también formas solubles de la proteína. En tales formas parte o la totalidad de las regiones que hacen que la proteína se fije a la membrana se delecionan a fin de que la proteína sea secretada totalmente por la célula en la que se expresa la misma.

La presente invención proporciona también genes que corresponden a las secuencias de cDNA descritas en esta memoria. Los genes correspondientes pueden aislarse de acuerdo con métodos conocidos utilizando la información de secuencias descrita en esta memoria. Tales métodos incluyen la preparación de sondas o iniciadores a partir de la información de secuencias descrita para identificación y/o amplificación de genes en genotecas genómicas apropiadas u otras fuentes de materiales genómicos. Homólogos de especies de los polinucleótidos y proteínas descritos se proporcionan también por la presente invención. Las especies homólogas pueden aislarse e identificarse construyendo sondas o iniciadores adecuados a partir de las secuencias proporcionadas en esta memoria y seleccionando una fuente de ácido nucleico adecuada de la especie deseada. La invención abarca también variantes alélicas de los polinucleótidos o proteínas descritos; es decir, formas alternativas existentes naturalmente del polinucleótido aislado que codifican también proteínas que son idénticas, homólogas o afines a la codificada por los polinucleótidos. Las composiciones de la presente invención incluyen polinucleótidos aislados, con inclusión de moléculas de DNA recombinante, genes clonados o variantes degeneradas de los mismos, especialmente variantes existentes naturalmente tales como variantes alélicas, nuevos polipéptidos aislados, y anticuerpos que reconocen específicamente un o más epítopes presentes en tales polipéptidos. Especies homólogas de los polinucleótidos y proteínas descritos se proporcionan también por la presente invención. Especies homólogas pueden aislarse e identificarse por realización de sondas o iniciadores adecuados a partir de las secuencias proporcionadas en esta memoria y selección de una fuente de ácido nucleico adecuada de la especie deseada. La invención abarca también variantes alélicas de los polinucleótidos o proteínas descritos; es decir, formas alternativas existentes naturalmente del polinucleótido aislado que codifica también proteínas que son idénticas, homólogas o afines a la codificada por los polinucleótidos.

Descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de nucleótidos preferida de IL-1 Hy2 que contiene una región codificante de proteína desde los nucleótidos 54 al 509.

SEQ ID NO: 2 muestra una secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de nucleótidos idéntica a SEQ ID NO: 1 excepto que la región codificante de la proteína abarca los nucleótidos 3 a 509.

SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NOS: 5-9 muestra las secuencias de aminoácidos de IL-1 Hy1 humana, IL-1Ra de rata, IL-1Ra de cerdo, IL-1Ra humana e IL-1Ra humana intracelular, respectivamente.

SEQ ID NO: 14 muestra una secuencia de cDNA extendida de un clon de IL-1 Hy2 humana que es más largo que SEQ ID NO: 1 pero codifica el mismo polipéptido de 152 aminoácidos (SEQ ID NO: 2).

SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de DNA genómico de IL-1 Hy2.

SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de cDNA predicha basada en la secuencia genómica humana de IL-Hy2 (SEQ ID NO: 15), y difiere de SEQ ID NO: 14 en la posición 279 (C → T).

ES 2 300 266 T3

SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de 200 aminoácidos codificada por el marco de lectura abierto más largo de SEQ ID NO: 12.

SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de DNA genómico de IL-1 Hy2 murino.

SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de cDNA murino predicha basada en la secuencia genómica de ratón de SEQ ID NO: 16.

SEQ ID NO: 18 muestra la secuencia de aminoácidos deducida del polipéptido IL-1 Hy2 murina.

2. Ácidos nucleicos de la invención

Los polinucleótidos aislados de la invención incluyen un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2 ó 13. Una secuencia de ácido nucleico preferida se expone en SEQ ID NO: 1 (que es idéntica a SEQ ID NO: 3 excepto por la identificación de la región codificante de la proteína, que tiene los nucleótidos 54 a 509 para SEQ ID NO: 1 y los nucleótidos 3 a 509 para SEQ ID NO: 3).

Existen dos marcos de lectura abiertos alternativos en SEQ ID NO: 1. La resecuenciación de la región 5' del cDNA de IL-1 Hy2 dio como resultado SEQ ID NO: 14, que incluye el marco de lectura abierto más corto de SEQ ID NO: 1 y extiende su secuencia 5'. La secuencia de amino-ácidos predicha basada en el marco de lectura abierto más corto de SEQ ID NO: 14 se muestra en SEQ ID NO: 2. La secuencia de cDNA predicha basada en la secuencia de DNA genómico se indica como SEQ ID NO: 12, que contiene un cambio C → T que da como resultado una metionina iniciadora alternativa aguas arriba que extiende el marco de lectura abierto de SEQ ID NO: 3. La secuencia de amino-ácidos predicha basada en el marco de lectura abierto más largo se muestra en SEQ ID NO: 13.

Los polinucleótidos aislados de la invención incluyen adicionalmente un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14; un polinucleótido que comprende la secuencia codificante de la proteína de longitud total de SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14; y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificante de la proteína madura de SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14. Los polinucleótidos de la presente invención incluyen también un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad de IL-1 Hy2 y que se hibrida en condiciones de hibridación severas al complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

Los polinucleótidos de la invención incluyen adicionalmente el complemento de cualquiera de los polinucleótidos citados arriba.

Los polinucleótidos de la invención proporcionan también polinucleótidos que incluyen secuencias de nucleótidos que son sustancialmente equivalentes a los polinucleótidos citados arriba. Los polinucleótidos de acuerdo con la invención pueden tener al menos aproximadamente 65%, de modo más general al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85% o 90%, y de modo aún más general al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con un polinucleótido citado arriba. La invención proporciona también el complemento de los polinucleótidos que incluye una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 80%, de modo más general al menos aproximadamente 90%, y de modo todavía más general al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a un polinucleótido que codifica un polipéptido arriba citado. El polinucleótido puede ser DNA (genómico, cDNA, amplificado o sintético) o RNA. Métodos y algoritmos para la obtención de tales polinucleótidos son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, métodos para determinación de condiciones de hibridación que pueden aislar rutinariamente polinucleótidos de las identidades de secuencia deseadas.

Un polinucleótido de acuerdo con la invención puede unirse a cualquiera de una diversidad de otras secuencias de nucleótidos por métodos de DNA recombinante bien establecidos (véase Sambrook J. *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY). Secuencias de nucleótidos útiles para unión a polipéptidos incluyen una colección de vectores, v.g., plásmidos, cósmidos, derivados del fago lambda, fagémidos, y análogos, que son bien conocidos en la técnica. De acuerdo con ello, la invención proporciona también un vector que incluye un polinucleótido de la invención y una célula hospedadora que contiene el polinucleótido. En general, el vector contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios convenientes de endonucleasas de restricción, y un marcador seleccionable para la célula hospedadora. Los vectores de acuerdo con la invención incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas, y vectores de secuenciación. Una célula hospedadora de acuerdo con la invención puede ser una célula procariota o eucariota y puede ser un organismo unicelular o parte de un organismo multicelular.

Las secuencias que caen dentro del alcance de la presente invención no están limitadas a las secuencias específicas descritas en esta memoria, sino que pueden incluir también variaciones alélicas de las mismas. Las variaciones alélicas pueden determinarse rutinariamente por comparación de la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 1, 12 ó 14, o un fragmento representativo de la misma, o una secuencia de nucleótidos que es al menos idéntica en un 99,9% a SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14 con una secuencia de otro material aislado de la misma especie. El Ejemplo 2 muestra que existen diversas variantes alélicas, algunas de las cuales dan como resultado cambios en la secuencia del polipéptido codificada.

Para acomodar la variabilidad de codones, la invención incluye moléculas de ácido nucleico que codifican las mismas secuencias de aminoácidos que lo hacen los ORFs específicos descritos en esta memoria. Dicho de otro modo, en la región codificante de un ORF, se contempla expresamente la sustitución de un codón por otro que codifica el mismo aminoácido. Cualquier secuencia específica descrita en esta memoria puede ser seleccionada fácilmente respecto a errores por resecuenciación de un fragmento particular, tal como un ORF, en ambas direcciones (es decir, secuenciar ambas cadenas).

La presente invención proporciona adicionalmente constructos recombinantes que comprenden un ácido nucleico que tiene la secuencia de SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14; o un fragmento del mismo o cualesquiera otros polinucleótidos de la invención. En una realización, los constructos recombinantes de la presente invención comprenden un vector, tal como un plásmido o vector viral, en el cual se inserta un ácido nucleico que tiene la secuencia de SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14; o un fragmento del mismo, en una orientación directa o inversa. En el caso de un vector que comprende uno de los ORFs de la presente invención, el vector puede comprender también secuencias reguladoras que incluyen, por ejemplo, un promotor, enlazado operativamente al ORF. Para vectores que comprenden los EMFs y UMFs de la presente invención, el vector puede comprender además una secuencia marcadora o un ORF heterólogo enlazado operativamente al EMF o UMF. Grandes números de vectores y promotores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente para generar los constructos recombinantes de la presente invención. Los vectores siguientes se proporcionan a modo de ejemplo. Bacterianos: pBs, Phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A; pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucariotas: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXTI, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia).

El polinucleótido aislado de la invención puede enlazarse operativamente a una secuencia de control de la expresión tal como los vectores de expresión pMT2 o pED descritos en Kaufman *et al.*, Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490 (1991), con objeto de producir la proteína recombinantemente. Muchas secuencias de control de la expresión adecuadas se conocen en la técnica. Métodos generales de expresión de proteínas recombinantes se conocen también y se ilustran en R. Kaufman, Methods in Enzymology 185, 537-566 (1990). Como se define en esta memoria, “enlazado operativamente” significa que el polinucleótido aislado de la invención y una secuencia de control de la expresión están situados dentro de un vector o célula de tal manera que la proteína es expresada por una célula hospedadora que se ha transformado (transfectado) con la secuencia polinucleótido/control de la expresión ligada.

Regiones promotoras pueden seleccionarse de cualquier gen deseado utilizando vectores de CAT (cloramfenicol-transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Promotores bacterianos citados particularmente incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P_R y trc. Promotores eucariotas incluyen CMV precoz inmediato, HSV-timidina-quinasa, SV40 precoz y tardío, LTRs de retrovirus, y metalotioneína-I de ratón. La selección del vector y promotor apropiado está perfectamente dentro del nivel de experiencia ordinario en la técnica. Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permitan la transformación de la célula hospedadora, v.g., el gen de resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural situada aguas abajo. Tales promotores pueden derivarse de operones que codifican enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato-quinasa (PGK), factor a, fosfatasa ácida, o proteínas de choque térmico, entre otros. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en una fase apropiada con secuencias de iniciación y terminación de la traducción, y preferiblemente, una secuencia conductora capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida al espacio periplásmico o al medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación del terminal N que imparte características deseadas, v.g., estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. Vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen por inserción de una secuencia de DNA estructural que codifica una proteína deseada junto con señales adecuadas de iniciación y terminación de la traducción en fase de lectura operativa con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores fenotípicos seleccionables y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y, en caso deseable, proporcionar amplificación en el hospedador. Hospedadores procariontes adecuados para transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, aunque pueden emplearse también otros como cuestión de elección.

Como ejemplo representativo pero no limitante, vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos disponibles comercialmente que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, EE.UU.). Estas secciones de “cadena principal” de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y con el gen estructural a expresar. Después de la transformación de una cepa hospedadora adecuada y el crecimiento de la cepa hospedadora hasta una densidad de células apropiada, el promotor seleccionado se induce o se libera de la represión por medios apropiados (v.g., cambio de temperatura o inducción química), y se cultivan las células durante un periodo adicional. Las células se cosechan típicamente por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante se conserva para purificación ulterior.

De acuerdo con la invención, secuencias de polinucleótidos que codifican los nuevos ácidos nucleicos, o equivalentes funcionales de los mismos, pueden utilizarse para generar moléculas de DNA recombinante que dirigen la expresión de dicho ácido nucleico, o un equivalente funcional del mismo, en células hospedadoras apropiadas.

Las secuencias de ácido nucleico de la invención están dirigidas ulteriormente a secuencias que codifican variantes de los ácidos nucleicos descritos. Estas variantes de secuencia de aminoácidos pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica por introducción de cambios de nucleótidos apropiados en un polinucleótido nativo o variante. Existen dos variables en la construcción de variantes de secuencias de aminoácidos: la localización de la mutación y la naturaleza de la mutación. Las variantes de secuencias de aminoácidos de los ácidos nucleicos se construyen preferiblemente por mutación del polinucleótido a fin de dar una secuencia de aminoácidos que no ocurre en la naturaleza. Estas alteraciones de aminoácidos pueden realizarse en sitios que difieren en los ácidos nucleicos de diferentes especies (posiciones variables) o en regiones altamente conservadas (regiones constantes). Los sitios en tales localizaciones se modificarán típicamente en serie, v.g., por sustitución primeramente con elecciones conservadoras (v.g., un aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrófobo diferente) y luego con elecciones más distantes (v.g., un aminoácido hidrófobo a un aminoácido cargado), pudiendo hacerse después delecciones o inserciones en el sitio diana. Las delecciones en la secuencia de aminoácidos están comprendidas por regla general entre aproximadamente 1 y 30 residuos, con preferencia aproximadamente 1 a 10 residuos, y son típicamente contiguas. Las inserciones de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxi-terminales comprendidas en longitud desde 1 a 100 o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Las inserciones intrasecuencia pueden abarcar por regla general desde aproximadamente 1 a 10 residuos amino, preferiblemente desde 1 a 5 residuos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen las secuencias señal heterólogas necesarias para secreción o para direccionamiento intracelular en células hospedadoras diferentes.

En un método preferido, polinucleótidos que codifican los nuevos ácidos nucleicos se cambian por mutagénesis orientada. Este método utiliza secuencias de oligonucleótidos que codifican la secuencia polinucleotídica de la variante de aminoácido deseada, así como un nucleótido adyacente suficiente en ambos lados del aminoácido cambiado para formar un dúplex estable a cada lado del sitio que se está modificando. En general, las técnicas de mutagénesis orientada son bien conocidas por los expertos en la técnica y esta técnica se ilustra en publicaciones tales como, Edelman *et al.*, DNA 2: 183 (1983). Un método versátil y eficiente para producir cambios específicos del sitio en una secuencia de polinucleótidos fue publicado por Zoller y Smith, Nucleic Acids Res. 10: 6487-6500 (1982). La PCR puede utilizarse también para crear variantes de secuencia de aminoácidos de los nuevos ácidos nucleicos. Cuando se utilizan pequeñas cantidades de DNA molde como material de partida, uno o más iniciadores que difiere(n) ligeramente en secuencia de la región correspondiente en el DNA molde puede(n) generar la variante de aminoácido deseada. La amplificación por PCR da como resultado una población de fragmentos de DNA producidos que difieren del molde polinucleotídico que codifica el polipéptido en la posición especificada por el iniciador. Los fragmentos de DNA producidos reemplazan la región correspondiente en el plásmido y esto da la variante de aminoácidos deseada.

Una técnica adicional para generación de variantes de aminoácidos es la técnica de mutagénesis en casete descrita en Wells *et al.*, Gene 34: 315 (1985); y otros métodos de mutagénesis bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, los métodos de Sambrook *et al.*, *supra*, y Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.* Debido a la degeneración inherente del código genético, otras secuencias de DNA que codifican sustancialmente la misma secuencia o una secuencia de aminoácidos funcionalmente equivalente pueden utilizarse en la práctica de la invención para la clonación y expresión de estos nuevos ácidos nucleicos. Tales secuencias de DNA incluyen aquellas que son susceptibles de hibridación a la nueva secuencia de ácido nucleico apropiada en condiciones severas.

Adicionalmente, el conocimiento de la secuencia de DNA proporcionado por la presente invención hace posible la modificación de células para permitir, o aumentar, la expresión de polipéptidos endógenos de IL-1 Hy2. Las células pueden modificarse (v.g. por recombinación homóloga) para proporcionar una expresión incrementada de IL-1 Hy2 por reemplazamiento, totalmente o en parte, del promotor de IL-1 Hy2 existente naturalmente con la totalidad o una parte de un promotor heterólogo de tal modo que las células expresen polipéptidos IL-1 Hy2 a un nivel más alto. El promotor heterólogo se inserta de tal manera que el mismo está enlazado operativamente a secuencias codificantes de IL-1 Hy2. Véanse, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT No. WO 94/12650, la publicación Internacional PCT No. WO 92/20808, y la publicación internacional PCT No. WO 91/09955. Se contempla también que, además del DNA del promotor heterólogo, puede insertarse DNA marcador amplificable (v.g., *ada*, *dhfr*, y el gen multifuncional CAD que codifica carbamil-fosfato-sintasa, aspartato-transcarbamilasa, y dihidroorotasa) y/o DNA de intrón junto con el DNA promotor heterólogo. Si se enlaza a la secuencia codificante de IL-1 Hy2, la amplificación del DNA marcador por métodos de selección estándar da como resultado la co-amplificación de las secuencias codificantes de IL-1 Hy2 en las células.

Los polinucleótidos de la presente invención hacen también posible el desarrollo, por, v.g., recombinación homóloga o estrategias "knockout", de animales que no expresan polipéptidos IL-1 Hy2 funcionales o que expresan una variante de un polipéptido IL-1 Hy2. Tales animales son útiles como modelos para estudiar las actividades *in vivo* de los polipéptidos IL-1 Hy2 así como para estudiar moduladores de los polipéptidos IL-1 Hy2.

Los polinucleótidos de la invención pueden utilizarse también para inducir respuestas inmunes. Por ejemplo, como se describe en Fan *et al.*, Nat. Biotech. 17: 870-872 (1999), que se incorpora en esta memoria por referencia, pueden utilizarse secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido para generar anticuerpos contra el polipéptido codificado después de la administración tópica de DNA plasmídico desnudo o después de inyección, y preferiblemente inyección intramuscular del DNA. Las secuencias de ácido nucleico se insertan preferiblemente en un vector de expresión recombinante y pueden encontrarse en la forma de DNA desnudo.

3. Hospedadores

La presente invención proporciona adicionalmente células hospedadoras modificadas por ingeniería genética que contienen los polinucleótidos de la invención. Por ejemplo, tales células hospedadoras pueden contener los ácidos nucleicos de la invención introducidos en la célula hospedadora utilizando métodos conocidos de transformación, transfección o infección. La presente invención proporciona adicionalmente células hospedadoras modificadas por ingeniería genética para expresar los polinucleótidos de la invención, en donde tales polinucleótidos están en asociación operativa con una secuencia reguladora heteróloga para la célula hospedadora que dirige la expresión de los polinucleótidos en la célula.

La célula hospedadora puede ser una célula hospedadora eucariota superior, tal como una célula de mamífero, una célula hospedadora eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la célula hospedadora puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción del constructo recombinante en la célula hospedadora puede efectuarse por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, o electroporación (Davis, L. *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology* (1986)). Las células hospedadoras que contienen uno de los polinucleótidos de la invención, pueden utilizarse de modos convencionales para producir el producto génico codificado por el fragmento aislado (en el caso de un ORF) o pueden utilizarse para producir una proteína heteróloga bajo el control del EMF.

Puede utilizarse cualquier sistema hospedador/vector para expresar uno o más de los ORFs de la presente invención. Éstos incluyen, pero sin carácter limitante, hospedadores eucariotas tales como células HeLa, células Cv-1, células COS, y células Sf9, así como hospedadores procariotas tales como *E. coli* y *B. subtilis*. Las células más preferidas son aquellas que no expresan normalmente el polipéptido o proteína particular o que expresan el polipéptido o proteína a nivel natural bajo. Las proteínas maduras pueden expresarse en células de mamífero, levadura, bacterias, u otras células bajo el control de promotores apropiados. Pueden emplearse también sistemas de traducción exentos de células para producir tales proteínas utilizando RNAs derivados de los constructos de DNA de la presente invención. Vectores apropiados de clonación y expresión para uso con hospedadores procariotas y eucariotas han sido descritos por Sambrook, *et al.*, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989), cuya descripción se incorpora en la presente solicitud por referencia.

Pueden emplearse también diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar proteína recombinante. Ejemplos de sistemas de expresión de mamífero incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman, *Cell*, 23: 175 (1981), y otras líneas de células capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas de células C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Vectores de expresión de mamífero comprenderán un origen de replicación, un promotor adecuado y también cualesquiera sitios de fijación de ribosoma necesarios, sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de remodelación, secuencias de terminación de la transcripción, y secuencias no transcritas 5' flanqueantes. Secuencias de DNA derivadas del genoma viral SV40, por ejemplo, sitios de origen de SV40, promotor temprano, intensificadores, de remodelación y de poliadenilación pueden utilizarse para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos. Polipéptidos y proteínas recombinantes producidos en cultivo bacteriano se aíslan usualmente por extracción inicial a partir de pelets de células, seguida por uno o más pasos de precipitación con sal, intercambio acuoso de iones o cromatografía de exclusión por tamaños. Pueden utilizarse, en caso necesario, pasos de repliegamiento de proteínas, en el acabado de la configuración de la proteína madura. Finalmente, pueden emplearse cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para los pasos de purificación finales. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse por cualquier método conveniente, con inclusión de sometimiento a ciclos de congelación-descongelación, tratamiento por ultrasonidos, ruptura mecánica, o uso de agentes de lisis de células.

Algunos tipos de células pueden actuar como células hospedadoras adecuadas para expresión de la proteína. Células hospedadoras de mamífero incluyen, por ejemplo, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO), células 293 de riñón humano, células A431 de epidermis humana, células Colo205 humanas, células 3T3, células CV-1, otras líneas de células de primate transformadas, células diploides normales, cepas de células derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HeLa, células L de ratón, células BHK, HL-60, U937, HaK o Jurkat.

Alternativamente, puede ser posible producir la proteína en eucariotas inferiores tales como levadura o en procariotas tales como bacterias. Cepas de levadura potencialmente adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. Cepas bacterianas potencialmente adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar proteínas heterólogas. Si la proteína se produce en levadura o bacterias, puede ser necesario modificar la proteína producida en ellas, por ejemplo, por fosforilación o glicosilación de los sitios apropiados, con objeto de obtener la proteína funcional. Tales fijaciones covalentes pueden realizarse utilizando métodos químicos o enzimáticos conocidos.

En otra realización de la presente invención, las células y los tejidos pueden modificarse por ingeniería genética para expresar un gen endógeno que comprende los polinucleótidos de la invención bajo el control de elementos reguladores inducibles, en cuyo caso las secuencias reguladoras del gen endógeno pueden reemplazarse por recombinación homóloga. Como se describe en esta memoria, puede utilizarse direccionamiento de genes para reemplazar una re-

gión reguladora existente de un gen con una secuencia reguladora aislada de un gen diferente o una nueva secuencia reguladora sintetizada por métodos de ingeniería genética. Tales secuencias reguladoras pueden estar constituidas por promotores, intensificadores, regiones de fijación de entramado, elementos reguladores negativos, sitios de iniciación de la transcripción, sitios de fijación de proteínas reguladoras o combinaciones de dichas secuencias. Alternativamente, secuencias que afectan a la estructura o estabilidad del RNA o la proteína producida pueden reemplazarse, eliminarse, añadirse, o modificarse de otro modo por direccionamiento, con inclusión de señales de poliadenilación, elementos de estabilidad del mRNA, sitios de remodelación, secuencias conductoras para mejora o modificación de las propiedades de transporte o de secreción de la proteína, u otras secuencias que alteran o mejoran la función o estabilidad de las moléculas de proteína o RNA.

El suceso de direccionamiento puede ser una simple inserción de la secuencia reguladora, que pone el gen bajo el control de la nueva secuencia reguladora, v.g., inserción de un nuevo promotor o intensificador o ambos aguas arriba de un gen. Alternativamente, el suceso de direccionamiento puede ser una simple delección de un elemento regulador, tal como la delección de un elemento regulador negativo específico de un tejido. Alternativamente, el suceso de direccionamiento puede reemplazar un elemento existente; por ejemplo, un intensificador específico de tejido puede ser reemplazado por un intensificador que tiene una especificidad más amplia o diferente del tipo de célula que los elementos existentes naturalmente. En este caso, las secuencias existentes naturalmente se delecionan y se añaden secuencias nuevas. En todos los casos, la identificación del suceso de direccionamiento puede ser facilitada por el uso de uno o más genes marcadores seleccionables que son contiguos al DNA de direccionamiento, permitiendo la selección de células en las cuales el DNA exógeno se ha integrado en el genoma de la célula hospedadora. La identificación del suceso de direccionamiento puede verse facilitada también por el uso de uno o más genes marcadores que exhiben la propiedad de selección negativa, de tal modo que el marcador seleccionable negativamente está enlazado al DNA exógeno, pero configurado de tal modo que el marcador seleccionable negativamente flanquea la secuencia de direccionamiento, y de tal manera que un suceso correcto de recombinación homóloga con secuencias en el genoma de la célula hospedadora no da como resultado la integración estable del marcador seleccionable negativamente. Marcadores útiles para este propósito incluyen el gen timidina-quinasa (TK) del Virus del Herpes símplex o el gen de xantina-guanina-fosforribosil-transferasa (gpt) bacteriana.

Las técnicas de direccionamiento de genes o activación de genes que pueden utilizarse de acuerdo con este aspecto de la invención se describen más particularmente en la Patente U.S. No. 5.272.071 concedida a Chappel; la Patente U.S. No. 5.578.461, concedida Sherwin *et al.*; la Solicitud Internacional No. PCT/US 92/09627 (WO 93/09222), por Selden *et al.*; y la Solicitud Internacional No. PCT/US 90/06436 (WO 91/06667) por Skoultschi *et al.*, cada una de las cuales se incorpora por referencia en esta memoria en su totalidad.

4. Polipéptidos de la invención

SEQ ID NO: 1 codifica la secuencia del polipéptido IL-1 Hy2 de SEQ ID NOS: 2, 4 y 13. Una alineación de los aminoácidos de SEQ ID NO: 2 con IL-1Ra humana secretada, IL-1Ra humana intracelular e IL-1 Hy1 humana, así como de IL-1Ra de rata y de cerdo, se muestra en Fig. 1. SEQ ID NO: 2 presenta la homología significativa de aminoácidos con IL-1Ra humana e IL-1 Hy1 (41,4% y 45% de identidad de secuencia, respectivamente, utilizando el método de Jotan Hein), y representa por tanto una nueva molécula dentro de la familia IL-1Ra. Las semejanzas de secuencia entre las tres proteínas y la localización del gen de IL-1 Hy2 en el cromosoma 2, en donde están localizadas otras proteínas del sistema IL-1, indican que IL-1 Hy2 está implicada en el sistema IL-1 y puede jugar algunos papeles biológicos comunes como IL-1Ra e IL-1 Hy1, v.g., la actuación como antagonista de IL-1. Miembros adicionales de la familia IL-1 Hy2 pueden identificarse utilizando SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14 como sonda molecular.

La Interleuquina-1 tiene actividades biológicas pleiotrópicas, muchas de las cuales afectan desfavorablemente al organismo, y podría esperarse que la molécula tenga que regularse fuertemente si ello no es lesivo. De hecho, existen varios informes de inhibidores de Interleuquina-1 que regulan la acción de Interleuquina-1. La actividad inhibidora de Interleuquina-1 ha sido consignada en medio acondicionado de monocitos, en donde los monocitos se cultivan en complejos inmunes adherentes. Arena, W.P. *et al.*, 1985, Journal of Immun., 134: 3868. Adicionalmente, se ha considerado como inhibidor la presencia de orina. Seckinger, P., *et al.*, 1987, Journal of Immun., 139: 1546. Finalmente, ha sido consignado un inhibidor de proteínas, purificado y clonado, que tiene actividad antagonista del receptor de Interleuquina-1. Hannum, *et al.*, 1990, Nature, 346: 336, y Eisenberg, S., *et al.*, 1990, Nature, 343: 341.

Se cree que el inhibidor de Interleuquina-1 presente en la orina, y que ha sido purificado parcialmente y caracterizado por Seckinger, P. *et al.*, y Seckinger, P., *et al.*, 1987, Journal of Immun., 139: 1541 es similar, si no idéntico al antagonista del receptor de Interleuquina-1 clonado consignado por Eisenberg, S., *et al.*, (1990), Nature, 343: 341; y Carter, D. *et al.*, (1990), Nature, 344: 633.

El antagonista del receptor de Interleuquina-1 es un péptido existente naturalmente secretado por macrófagos en respuesta a muchos de los mismos estímulos que causan la secreción de Interleuquina-1 propiamente dicha. El antagonista del receptor de Interleuquina-1 es un antagonista existente naturalmente para las citoquinas y reconoce receptores en diversos tipos de células, y bloquea las respuestas mediadas por Interleuquina-1 por ocupación del receptor. (Wakabayashi *et al.*, FASEB J 1991; 5:338; Okusawa *et al.* J Clin Invest 1988; 81:1162; Ohlsson *et al.*, Nature 1990; 348:550; Aiura, *et al.* Cytokine 1991; 4:498; Fischer *et al.* Am J Physiol 1991; 261:R442). En humanos, el antagonista del receptor de Interleuquina-1 es un grupo de moléculas existente naturalmente; se han caracterizado tres formas (dos glicosiladas y una no glicosilada).

Fischer *et al.* (Am. J. Physiol. 1991; 261: R442) demostraron que la administración de un antagonista existente naturalmente para Interleuquina-1 mitigará significativamente la cascada de citoquinas y mejorará la supervivencia en los mandriles a los que se ha administrado una dosis letal de bacterias vivas. El antagonista del receptor de Interleuquina-1 atenúa significativamente la disminución en la presión arterial media y el gasto cardíaco y mejora la supervivencia en el caso de la pancreatitis aguda severa. (U.S. Pat. No. 5.508.262). La respuesta sistémica a Interleuquina-1 observada como resultado de la sepsis bacteriana se redujo también significativamente, en correlación con una disminución en la respuesta sistémica a la sepsis bacteriana.

Estudios realizados por Ajura *et al.* 9 Cytokine 1991; 4: 498) han demostrado que el antagonista del receptor de Interleuquina-1 actúa como protector en un modelo de choque séptico hipotensivo gram-positivo en el conejo. Se ha demostrado que la administración de antagonistas del receptor de Interleuquina-1 en este modelo animal mantiene la presión arterial media comparada con un control, disminuyendo además el agua en el pulmón y manteniendo la producción de orina. Este trabajo demostró la función de Interleuquina-1 y la función protectora del antagonista del receptor de Interleuquina-1 en el choque séptico gram-positivo. La Interleuquina-1 es el mediador principal en la respuesta clínica de un paciente a diferentes estados de estrés múltiples con indiferencia de la etiología (con inclusión de pancreatitis aguda, sepsis, choque endotóxico, y choque inducido por citoquinas).

Los polipéptidos aislados de la invención incluyen un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2 ó 13 o una porción de la misma correspondiente a la proteína de longitud total o madura. Los polipéptidos de la invención incluyen también polipéptidos con actividad de IL-1 Hy2 que son codificados por (a) el polinucleótido de SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14, o (b) polinucleótidos que codifican SEQ ID NOS: 2 ó 13, (b) un polinucleótido que se hibrida al complemento del polinucleótido de SEQ ID NO: 1 en condiciones de hibridación severas. Se contemplan también variantes biológicamente activas o inmunológicamente activas de la secuencia de la proteína de IL-1 Ra de SEQ ID NOS: 2 ó 13 y "equivalentes sustanciales" de la misma (v.g., con 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, típicamente 95%, más típicamente 98% o muy típicamente 99% de identidad de aminoácidos) que retienen actividad de IL-1 Hy2, preferiblemente actividad antagonista de IL-1. Polipéptidos codificados por variantes alélicas, tales como los descritos en el Ejemplo 2 siguiente, pueden tener una actividad similar o incrementada o reducida en comparación con los polipéptidos de SEQ ID NOS: 2, 4 ó 13.

Las composiciones de proteínas de la presente invención pueden comprender adicionalmente un vehículo aceptable, tal como un vehículo hidrófilo, v.g., farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere también a métodos para producir un polipéptido que comprenden dejar crecer un cultivo de las células de la invención en un medio de cultivo adecuado, y purificar la proteína a partir del cultivo. Por ejemplo, los métodos de la invención incluyen un proceso para producir un polipéptido en el cual una célula hospedadora que contiene un vector de expresión adecuado que incluye un polinucleótido de la invención se cultiva en condiciones que permiten la expresión del polipéptido codificado. El polipéptido puede recuperarse del cultivo, convenientemente a partir del medio de cultivo, y purificarse ulteriormente. Realizaciones preferidas incluyen aquellas en las cuales la proteína producida por tal proceso es una forma de longitud total o madura de la proteína.

La presente invención proporciona adicionalmente polipéptidos aislados codificados por los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención o por variantes degeneradas de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención. Por "variante degenerada" se entienden fragmentos de nucleótidos que difieren de un fragmento de ácido nucleico de la presente invención (v.g., un ORF) por secuencia de nucleótidos pero, debido a la degeneración del código genético, codifican una secuencia de polipéptidos idéntica. Fragmentos de ácido nucleico preferidos de la presente invención son los ORFs que codifican proteínas. Una diversidad de metodologías conocidas en la técnica pueden utilizarse para obtener uno cualquiera de los polipéptidos o proteínas aislados de la presente invención. Al nivel más simple, la secuencia de aminoácidos puede sintetizarse utilizando sintetizadores de péptidos disponibles comercialmente. Esto es particularmente útil en la producción de pequeños péptidos y fragmentos de polipéptidos mayores. Los fragmentos son útiles, por ejemplo, en la generación de anticuerpos contra el polipéptido nativo. En un método alternativo, el polipéptido o la proteína se purifica a partir de células bacterianas que producen naturalmente el polipéptido o la proteína. Un experto en la técnica puede seguir fácilmente métodos conocidos para aislamiento de polipéptidos y proteínas a fin de obtener uno de los polipéptidos o proteínas aislados de la presente invención. Éstos incluyen, pero sin carácter limitante, inmunocromatografía, HPLC, cromatografía de exclusión de tamaños, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de inmutio-afinidad. Véase, v.g., Scopes Protein Purification: Principles and Practice. Springer-Verlag (1994); Sambrook, *et al.*, in Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology.

Los polipéptidos y proteínas de la presente invención pueden purificarse alternativamente a partir de células que se han alterado para expresar el polipéptido o proteína deseado. Como se utiliza en esta memoria, se dice que una célula está alterada para expresar un polipéptido o proteína deseado cuando se hace que la célula, por manipulación genética, produzca un polipéptido o proteína que no produce normalmente, o que produce normalmente a un nivel inferior. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente procedimientos para introducir y expresar secuencias recombinantes o sintéticas en células eucariotas o procariotas a fin de generar una célula que produce uno de los polipéptidos o proteínas de la presente invención. Los polipéptidos purificados pueden utilizarse en ensayos de fijación *in vitro* que son bien conocidos en la técnica para identificar moléculas que se fijan a los polipéptidos. Estas moléculas incluyen, pero sin carácter limitante, v.g., moléculas pequeñas, moléculas procedentes de genotecas combinatorias, anticuerpos u otras proteínas. Las moléculas identificadas en el ensayo de fijación se prueban luego en cuanto a actividad antagonista o

agonista en un cultivo de tejido *in vivo* o en modelos animales que son bien conocidos en la técnica. Resumidamente, las moléculas se titulan en una pluralidad de cultivos de células o animales y se prueban luego respecto a la muerte de la célula o el animal o la supervivencia prolongada de los animales o células.

5 Adicionalmente, las moléculas de fijación pueden complejarse con toxinas, v.g., ricina o cólera, o con otros compuestos que son tóxicos para las células. El complejo toxina-molécula de fijación se direcciona luego a un tumor u otra célula por la especificidad de la molécula de fijación para SEQ ID NOS: 2 ó 13.

10 La proteína de la invención puede expresarse también como producto de animales transgénicos, v.g., como componente de la leche de vacas, cabras, cerdos, u ovejas transgénicos(as) que se caracterizan por células somáticas o germinales que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína.

15 La proteína puede producirse también por síntesis química convencional conocida. Métodos para construir las proteínas de la presente invención por medios sintéticos son conocidos por los expertos en la técnica. Las secuencias de proteínas construidas sintéticamente, en virtud de compartir características estructurales y/o de conformación primarias, secundarias o terciarias con proteínas pueden poseer propiedades biológicas en común con ellas, con inclusión de actividad proteínica. Así, las mismas pueden emplearse como sustitutos biológicamente activos o inmunológicos para proteínas naturales purificadas en la selección de compuestos terapéuticos y en procesos inmunológicos para el desarrollo de anticuerpos.

20 Las proteínas proporcionadas en esta invención incluyen también proteínas caracterizadas por secuencias de aminoácidos similares a las de proteínas purificadas, pero en las cuales se proporcionan naturalmente modificaciones o se incluyen deliberadamente por ingeniería genética. Por ejemplo, pueden realizarse modificaciones en las secuencias de péptidos o DNA por los expertos en la técnica utilizando métodos conocidos. Modificaciones de interés en las secuencias de proteínas pueden incluir alteración, sustitución, reemplazamiento, inserción o delección de un residuo de aminoácido seleccionado en la secuencia codificante. Por ejemplo, uno o más de los residuos cisteína pueden deleccionarse o reemplazarse con otro aminoácido para alterar la conformación de la molécula. Métodos para dicha alteración, sustitución, reemplazamiento, inserción o delección son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, v.g., U.S. Pat. No. 4.518.584). Preferiblemente, dicha alteración, sustitución, reemplazamiento, inserción o delección retiene la actividad deseada de la proteína.

30 Otros fragmentos y derivados de las secuencias de proteínas que podría esperarse retengan la actividad proteínica totalmente o en parte y puedan ser útiles por tanto para selección u otras metodologías inmunológicas pueden producirse también fácilmente por los expertos en la técnica dadas las descripciones de esta memoria. Dichas modificaciones se consideran abarcadas por la presente invención.

40 La proteína puede producirse también enlazando operativamente el polinucleótido aislado de la invención a secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insecto, y empleando un sistema de expresión de insecto. Materiales y métodos para sistemas de expresión baculovirus/células de insecto están disponibles comercialmente en forma de kit de, v.g., Invitrogen, San Diego, Calif., EE.UU. (el kit MaxBat.RTM), y tales métodos son bien conocidos en la técnica, como se describe en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), que se incorpora en esta memoria por referencia. Como se utiliza en esta memoria, una célula de insecto capaz de expresar un polinucleótido de la presente invención está "transformada".

45 La proteína de la invención puede prepararse por cultivo de células hospedadoras transformadas en condiciones de cultivo adecuadas para expresar la proteína recombinante. La proteína expresada resultante puede purificarse luego a partir de dicho cultivo (es decir, a partir del medio de cultivo o de extractos celulares) utilizando procesos de purificación conocidos, tales como filtración con gel y cromatografía de intercambio iónico. La purificación de la proteína puede incluir también una columna de afinidad que contenga agentes que se fijen a la proteína; uno o más pasos de columna sobre resinas de afinidad tales como concanavalina A-agarosa, heparin-toyopearl.RTM o Cibacrom azul 3GA Sepharose.RTM.; uno o más pasos que implican cromatografía de interacción hidrófoba utilizando resinas tales como fenil-éter, butil-éter, o propil-éter; o cromatografía de inmunoafinidad.

55 Alternativamente, la proteína de la invención puede expresarse también en una forma que facilite la purificación. Por ejemplo, la misma puede expresarse como una proteína de fusión, tal como las de la proteína de fijación de maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), o tiorredoxina (TRX). Kits para expresión y purificación de tales proteínas de fusión están disponibles comercialmente de New England BioLab (Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, N.J.) e Invitrogen, respectivamente. La proteína puede marcarse también con un epítipo y purificarse ulteriormente por utilización de un anticuerpo específico dirigido a dicho epítipo. Un epítipo de este tipo ("Flag") está disponible comercialmente de Kodak (New Haven, Conn.).

60 Finalmente, uno o más pasos de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) que emplean medios RP-HPLC hidrófobos, v.g., gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes, pueden emplearse para purificar ulteriormente la proteína. Algunos o la totalidad de los pasos de purificación que anteceden, en diversas combinaciones, pueden emplearse también para proporcionar una proteína recombinante aislada sustancialmente homogénea. La proteína así purificada está sustancialmente exenta de otras proteínas de mamífero y se define de acuerdo con la presente invención como una "proteína aislada".

Los polipéptidos de la invención incluyen análogos o variantes de Interleuquina-1 Hy2. Esto abarca fragmentos de IL-1 Hy2 de la invención, así como análogos (variantes) de IL-1 Hy2 en los cuales uno o más aminoácidos han sido delecionados, insertados, o sustituidos. Los análogos de la invención abarcan también fusiones o modificaciones de IL-1 Hy2 en los cuales la IL-1 Hy2 o análoga está fusionada a otro resto o restos, v.g. resto de direccionamiento u otro agente terapéutico. Dichos análogos pueden exhibir propiedades mejoradas tales como actividad y/o estabilidad. Ejemplos de restos que pueden fusionarse a IL-1 Hy2 o un análogo incluyen, por ejemplo, restos de direccionamiento que proporcionan el suministro del polipéptido a células pancreáticas, v.g., anticuerpos para células pancreáticas, anticuerpos para células inmunes tales como células T, monocitos, células dendríticas, granulocitos, etc., así como receptores y ligandos expresados en células pancreáticas o inmunes. Otros restos que pueden fusionarse a IL-1 Hy2 o un análogo incluyen agentes terapéuticos que se utilizan para tratamiento, por ejemplo, fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina, SK506, azatioprina, anticuerpos CD3 y esteroides, o inmunoestimulantes, inmuno-moduladores, y otras citoquinas tales como interferón alfa o beta.

5. Depósito de clones

El clon siguiente, pIL-1 Hy2 fue depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Avenue, Manassas, Virginia, el 21 de mayo de 1999 de acuerdo con los términos del tratado de Budapest. El clon representa un clon de plásmido como se describe en los Ejemplos expuestos a continuación. Microorganismo/Clon pIL-1 Hy2 No. de Acceso en ATCC PTA-96

Microorganismo/Clon pIL-1 Hy2	No. de Acceso en ATCC PTA-96
----------------------------------	---------------------------------

6. Usos y actividad biológica

Se espera que los polinucleótidos y proteínas de la presente invención exhiban uno o más de los usos o actividades biológicas (con inclusión de los asociados con los ensayos citados en esta memoria) identificados a continuación. Los usos o actividades descritos para las proteínas de la presente invención pueden proporcionarse por administración o uso de tales proteínas o por administración o uso de polinucleótidos que codifican dichas proteínas (tales como, por ejemplo, en terapias génicas o vectores adecuados para introducción de DNA).

6.1. Usos y utilidades en investigación

Los polinucleótidos proporcionados por la presente invención pueden ser utilizados por la comunidad investigadora para varios fines. Los polinucleótidos pueden utilizarse para expresar proteínas recombinantes para análisis, caracterización o uso terapéutico; como marcadores para tejidos en los cuales la proteína correspondiente se expresa preferentemente (sea constitutivamente o en una etapa particular de la diferenciación o el desarrollo de tejidos o en estados de enfermedad); como marcadores de peso molecular en geles Southern; como marcadores o etiquetas cromosómicos (cuando están marcados) para identificar cromosomas o para mapear posiciones de genes afines; para comparar con secuencias de DNA endógenas en pacientes a fin de identificar trastornos genéticos potenciales; como sondas para hibridación y descubrimiento consiguiente de nuevas secuencias de DNA afines; como fuente de información para derivar iniciadores de PCR para la identificación de la huella dactilar genética; como sonda para "sustracción" de secuencias conocidas en el proceso de descubrimiento de otros polinucleótidos nuevos; para selección y marcación de oligómeros con fines de fijación a un "chip génico" u otro soporte, con inclusión del examen de patrones de expresión; para generar anticuerpos anti-proteína utilizando técnicas de inmunización de DNA; y como antígeno para generar anticuerpos anti-DNA o para provocar otra respuesta inmunitaria. En los casos en que el polinucleótido codifica una proteína que se fija o puede fijarse potencialmente a otra proteína (tal como, por ejemplo, en una interacción receptor-ligando), el polinucleótido puede utilizarse también en ensayos de trampa de interacción (tales como, por ejemplo, el descrito en Gyuris *et al.*, Cell 75: 791-803 (1993)) a fin de identificar polinucleótidos que codifican la otra proteína con la cual ocurre la fijación o para identificar inhibidores de la interacción de fijación.

Las proteínas proporcionadas por la presente invención pueden utilizarse análogamente en ensayos para determinar la actividad biológica, con inclusión de un panel de proteínas múltiples para selección de alta capacidad; a fin de generar anticuerpos o para provocar otra respuesta inmunológica; como reactivo (que incluye el reactivo marcado) en ensayos diseñados para determinar cuantitativamente los niveles de la proteína (o su receptor) en fluidos biológicos; como marcadores para tejidos en los cuales la proteína correspondiente se expresa preferentemente (sea constitutivamente o en una etapa particular de diferenciación o desarrollo del tejido o en un estado de enfermedad); y, por supuesto, para aislar receptores o ligandos correlativos. En los casos en que la proteína se fija o puede fijarse potencialmente a otra proteína (tal como, por ejemplo, en una interacción receptor-ligando), la proteína puede utilizarse para identificar la otra proteína con la cual ocurre fijación o para identificar inhibidores de la interacción de fijación. Proteínas implicadas en estas interacciones de fijación pueden utilizarse también para seleccionar inhibidores peptídicos o de moléculas pequeñas o agonistas de la interacción de fijación.

Cualquiera o la totalidad de estas utilidades de investigación son susceptibles de desarrollarse en formato de grado reactivo o formato de kit para comercialización como productos de investigación.

Métodos para realización de los usos arriba enumerados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Referencias que describen tales métodos incluyen, sin limitación, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis compiladores, 1989, y "Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques", Academic Press, Berger, S.L. and A.R. Kimmel compiladores, 1987.

6.2. Usos nutricionales

Los polinucleótidos y proteínas de la presente invención pueden utilizarse también como fuentes o suplementos nutricionales. Tales usos incluyen sin limitación uso como un suplemento de proteínas o aminoácidos, uso como fuente de carbono, uso como fuente de nitrógeno y uso como fuente de carbohidrato. En tales casos, la proteína o el polinucleótido de la invención pueden añadirse a la alimentación de un organismo particular o puede administrarse como una preparación sólida o líquida separada, por ejemplo en forma de polvo, píldoras, soluciones, suspensiones o cápsulas. En el caso de microorganismos, la proteína o el polinucleótido de la invención pueden añadirse al medio en el cual o sobre el cual se cultiva el microorganismo.

6.3. Actividad de citoquina y proliferación/diferenciación celular

Una proteína de la presente invención puede exhibir actividad de citoquina, de proliferación celular (sea inducción o inhibición) o de diferenciación celular (sea de inducción o inhibición), o puede inducir la producción de otras citoquinas en ciertas poblaciones de células. Un polinucleótido de la invención puede codificar un polipéptido que exhiba tales atributos. Muchos factores proteínicos descubiertos hasta la fecha, con inclusión de todas las citoquinas conocidas, han exhibido actividad en uno o más ensayos de proliferación de células dependientes de factores, y por tanto los ensayos sirven como confirmación conveniente de la actividad de citoquina. La actividad de una proteína de la presente invención se evidencia por uno cualquiera de cierto número de ensayos rutinarios de proliferación celular dependientes de factores para líneas de células que incluyen, sin limitación, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+(preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e y CMK. La actividad de una proteína de la invención puede, entre otros medios, medirse por los métodos siguientes:

Ensayos para proliferación de células T o timocitos incluyen, sin limitación, los descritos en: Current Protocols in Immunology, recopilado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Takai *et al.*, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Bertagnolli *et al.*, J. Immunol. 145:1706-1712, 1990; Bertagnolli *et al.*, Cellular Immunology 133: 327-3431, 1991; Bertagnolli *et al.*, J. Immunol. 149: 3778-3783, 1992; Bowman *et al.*, J. Immunol. 152:1756-1761, 1994.

Ensayos para la producción y/o proliferación de citoquinas de células de bazo, células de ganglios linfáticos o timocitos incluyen, sin limitación, los descritos en: Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A. M. and Shevach, E. M. En Current Protocols in Immunology, J. E. e.a. Coligan compiladores Vol 1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto, 1994; and Measurement of mouse and human interleukin.gamma., Schreiber, R. D. En Current Protocols in Immunology, J. E. e.a. Coligan compiladores Vol 1 pp. 6.8.1-6.8.8. John Wiley and Sons, Toronto, 1994.

Ensayos para la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y linfopoyéticas incluyen, sin limitación, los descritos en: Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4, Bottomly, K., Davis, L. S. and Lipsky, P. E. En Current Protocols in Immunology, J. E. e.a. Coligan compiladores Vol 1 pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto, 1991; deVries *et al.*, J. Exp. Med. 173:1205-1211, 1991; Moreau *et al.*, Nature 336:690-692, 1988; Greenberger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2931-2938, 1983; Measurement of mouse and human interleukin 6-Nordan, R. En Current Protocols in Immunology, J. E. e.a. Coligan compiladores Vol 1 pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto, 1991; Smith *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:1857-1861, 1986; Measurement of human Interleukin II-Bennet, F., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. En Current Protocols in Immunology, J. E. e.a. Coligan compiladores Vol 1 pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto, 1991; Measurement of mouse and human Interleukin 9-Ciarletta, A., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. En Current Protocols in Immunology, J. E. e.a. Coligan compiladores Vol 1 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto, 1991.

Ensayos para respuestas de clones de células T a antígenos (que identificarán entre otras, las proteínas que afectan a las interacciones APC-células T así como efectos directos de las células T por medida de la proliferación y producción de citoquinas) incluyen, sin limitación, los descritos en: Current Protocols in Immunology, recopilado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function; Capítulo 6, Cytokines and their cellular receptors; Capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Weinberger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6091-6095, 1980; Weinberger *et al.*, Eur. J. Immun. 11: 405-411, 1981; Takai *et al.*, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140: 508-512, 1988.

6.4. Actividad inmuno-estimulante o inmuno-supresora

Una proteína de la presente invención puede exhibir también actividad inmunoestimulante o inmunosupresora, incluyendo, sin limitación, las actividades para las cuales se describen ensayos en esta memoria. Un polinucleótido de la invención puede codificar un polipéptido que exhibe tales actividades. Una proteína puede ser útil en el tratamiento

de diversas deficiencias y trastornos inmunitarios (con inclusión de inmunodeficiencia combinada severa (SCID)), v.g., en la regulación (creciente o decreciente) del crecimiento y la proliferación de linfocitos T y/o B, así como para efectuar la actividad citolítica de las células NK y otras poblaciones de células. Estas deficiencias inmunitarias pueden ser genéticas o estar causadas por infecciones virales (v.g., HIV) así como bacterianas o fúngicas, o pueden ser resultado de trastornos autoinmunes. Más específicamente, enfermedades infecciosas causadas por infección viral, bacteriana, fúngica o de otro tipo pueden tratarse utilizando una proteína de la presente invención, con inclusión de infecciones por HIV, virus de hepatitis, herpesvirus, microbacterias, *Leishmania spp.*, *malaria spp.* y diversas infecciones fúngicas tales como candidiasis. Por supuesto, a este respecto, una proteína de la presente invención puede ser útil también en casos en que puede ser deseable un refuerzo del sistema inmune en general, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer. Se ha indicado que IL-1 promueve el crecimiento de células tumorales en cánceres de diversos órganos que incluyen adenocarcinoma de mama, tumores cerebrales, melanoma, mieloma, tumores de células gigantes de huesos, leucemia mielógena aguda, carcinoma epidermoide oral, y carcinoma de células escamosas; por tanto, es de esperar que el tratamiento de tales estados de enfermedad cancerosa que implican niveles elevados de IL-1 con los polipéptidos IL-1 Hy2 de la presente invención mejore los signos y síntomas del cáncer.

Trastornos autoinmunes que pueden ser tratados utilizando una proteína de la presente invención incluyen, por ejemplo, enfermedad del tejido conectivo, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, inflamación pulmonar autoinmune, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis autoinmune, diabetes mellitus dependiente de insulina, miastenia grave, enfermedad de rechazo inverso y enfermedad oftálmica inflamatoria autoinmune. Dicha proteína (o antagonistas de la misma, con inclusión de anticuerpos) de la presente invención puede ser útil también en el tratamiento de reacciones alérgicas (v.g., anafilaxis, enfermedad del suero, reacciones a los fármacos, alergias alimentarias, alergias por venenos de insectos, mastocitosis, rinitis alérgica, neumonitis de hipersensibilidad, urticaria, angioedema, eccema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica por contacto, eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, conjuntivitis alérgica, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis venérea, conjuntivitis papilar gigante y alergias por contacto) y afecciones, tales como asma (particularmente asma alérgica) u otros problemas respiratorios. Otras afecciones, en las cuales se desea inmunosupresión (que incluyen, por ejemplo, trasplante de órganos), pueden ser tratables también utilizando una proteína de la presente invención. Los efectos terapéuticos de los polipéptidos IL-1 Hy2 o antagonistas de los mismos en reacciones alérgicas pueden ser evaluados por modelos animales *in vivo* tales como el ensayo de mejora acumulativa por contacto (Lastborn *et al.*, Toxicology 125: 59-66, 1998), el ensayo de pinchazo en la piel (Hoffmann *et al.*, Allergy 54: 446-54, 1999), ensayo de sensibilización de la piel del cobayo (Vohr *et al.*, Arch. Toxicol. 73: 501-9), y el ensayo de los ganglios linfáticos locales murina (Kimber *et al.*, J. Toxicol. Environ. Health 53: 563-79).

Por utilización de las proteínas de la invención puede ser posible también modular las respuestas inmunes, de diversas maneras. La regulación decreciente puede presentarse en la forma de inhibición o bloqueo de una respuesta inmunitaria ya en progreso o puede implicar la prevención de la inducción de una respuesta inmunitaria. Las funciones de las células T activadas pueden inhibirse por supresión de las respuestas de las células T o por inducción de la tolerancia específica en las células T, o ambas. La inmunosupresión de la respuesta de las células T es generalmente un proceso activo, no específico de antígeno, que requiere la exposición continua de las células T al agente supresor. La tolerancia, que implica la inducción de falta de sensibilidad o anergia en las células T, puede diferenciarse de la inmunosupresión en que aquélla es generalmente específica del antígeno y persiste después que ha cesado la exposición al agente tolerante. Operativamente, la tolerancia puede demostrarse por la falta de una respuesta de las células T después de reexposición al antígeno específico en ausencia del agente de tolerancia.

La regulación decreciente o prevención de una o más funciones del antígeno (con inclusión, pero sin carácter limitante, de funciones de antígeno de los linfocitos B (tales como, por ejemplo, B7)), v.g., prevención de la síntesis de linfoquinas de nivel alto por las células T activadas, será útil en situaciones de trasplante de tejidos, piel y órganos y en la enfermedad de rechazo inverso (GVHD). Por ejemplo, el bloqueo de la función de las células T debería dar como resultado una destrucción reducida de tejido en el trasplante de tejidos. Típicamente, en los trasplantes de tejidos, el rechazo del trasplante se inicia por su reconocimiento como extraño por las células T, seguido por una reacción inmunitaria que destruye el trasplante. La administración de una molécula que inhibe o bloquea la interacción de un antígeno de linfocitos B7 con su o sus ligandos naturales en células inmunes (tales como una forma monómera soluble de un péptido que tiene actividad B7-2 solo o en asociación con una forma monómera y un péptido que tiene actividad de otro antígeno de linfocitos B (v.g., B7-1, B7-3) o anticuerpo bloqueante), antes del trasplante puede conducir a la fijación de la molécula al o los ligandos naturales de las células inmunes sin transmisión de la señal coestimuladora correspondiente. El bloqueo de la función del antígeno de los linfocitos B en esta materia evita la síntesis de citoquinas por las células inmunes, tales como células T y por tanto actúa como inmunosupresor. Además, la falta de coestimulación puede ser suficiente también para anergizar las células T, induciendo con ello tolerancia en un individuo. La inducción de tolerancia a largo plazo por los reactivos bloqueantes del antígeno de los linfocitos B puede evitar la necesidad de administración repetida de estos reactivos bloqueantes. Para alcanzar inmunosupresión o tolerancia suficientes en un individuo, puede ser también necesario bloquear la función de una combinación de antígenos de linfocitos B.

La eficacia de reactivos de bloqueo particulares en la prevención del rechazo de trasplantes de órganos o GVHD puede evaluarse utilizando modelos animales que son predictivos de eficacia en humanos. Ejemplos de sistemas apropiados que pueden utilizarse incluyen injertos cardíacos alogénicos en ratas e injertos de células de los islotes pancreáticos xenógenos en ratones, los dos cuales se han utilizado para examinar los efectos inmunosupresores de proteínas de fusión CTLA4Ig *in vivo* como se describe en Lenschow *et al.*, Science 257: 789-792 (1992) y Turka *et al.*, Proc.

Natl. Acad. USA, 89: 11102-11105 (1992). Adicionalmente, pueden utilizarse modelos murinos de GVHD (véase Paul, compilador, Fundamental Immunology, Raven Press, Nueva York, 1989, pp. 846-847) para determinar el efecto del bloqueo de la función del antígeno de los linfocitos B *in vivo* en el desarrollo de dicha enfermedad.

El bloqueo de la función del antígeno puede ser también terapéuticamente útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Muchos trastornos autoinmunes son el resultado de una alteración inadecuada de células T que son reactivas contra el tejido propio y que promueven la producción de citoquinas y auto-anticuerpos implicados en la patología de las enfermedades. La prevención de la activación de las células T autorreactivas puede reducir o eliminar los síntomas de enfermedad. La administración de reactivos que bloquean la coestimulación de las células T por destrucción de las interacciones receptor:ligando de los antígenos de linfocitos B puede utilizarse para inhibir la activación de las células T y evitar la producción de auto-anticuerpos o citoquinas derivadas de las células T que pueden estar implicadas en el proceso de la enfermedad. Adicionalmente, reactivos de bloqueo pueden inducir la tolerancia específica del antígeno de las células T autorreactivas que podría conducir a un alivio de la enfermedad a largo plazo. La eficacia de los reactivos de bloqueo en la prevención o el alivio de trastornos auto-inmunes puede determinarse utilizando varios modelos animales bien caracterizados de enfermedades humanas autoinmunes. Ejemplos incluyen encefalitis autoinmune murina experimental, lupus eritematoso sistémico en ratones MRL/lpr/lpr o ratones híbridos NZB, artritis de colágeno autoinmune murina, diabetes mellitus en ratones NOD y ratas BB, y miastenia grave experimental murina (véase Paul, compilador, Fundamental Immunology, Raven Press, Nueva York, 1989, pp. 840-856).

La regulación creciente de una función de antígeno (preferiblemente una función de antígeno de linfocitos B), como medio de regulación creciente de respuestas inmunes, puede ser también útil en terapia. La regulación creciente de respuestas inmunes puede tener lugar en forma de mejora de una respuesta inmunitaria existente o de provocación de una respuesta inmunitaria inicial. Por ejemplo, la mejora de una respuesta inmunitaria por estimulación de la función del antígeno de los linfocitos B puede ser útil en casos de infección viral. Adicionalmente, enfermedades virales sistémicas tales como la gripe, el resfriado común, y la encefalitis podrían aliviarse por la administración de formas estimuladoras de antígenos de linfocitos B sistémicamente.

Alternativamente, las respuestas inmunitarias antivirales pueden mejorarse en un paciente infectado por eliminación de células T del paciente, coestimulación de las células T *in vitro* con APCs pulsados con antígenos virales que expresan un péptido de la presente invención o junto con una forma estimulante de un péptido soluble de la presente invención y reintroducción de las células T activadas *in vitro* en el paciente. Otro método de mejora de las respuestas inmunes anti-virales podría consistir en aislar células infectadas de un paciente, transfectar las mismas con un ácido nucleico codificante de una proteína de la presente invención como se describe en esta memoria de tal manera que las células expresen la totalidad o una porción de la proteína en su superficie, y reintroducir las células transfectadas en el paciente. Las células infectadas serían entonces capaces de suministrar una señal co-estimulante a, y con ello activar, las células T *in vivo*.

La presencia del péptido de la presente invención que tiene la actividad de uno o más antígenos de linfocitos B en la superficie de la célula tumoral proporciona la señal de coestimulación necesaria a las células T para inducir una respuesta inmunitaria mediada por las células T contra las células tumorales transfectadas. Adicionalmente, células tumorales que carecen de moléculas MHC clase I o MHC clase II, o que fallan respecto a la reexpresión de cantidades suficientes de moléculas MHC clase I o de MHC clase II, pueden transfectarse con ácido nucleico codificante de la totalidad o una porción de (v.g., una porción truncada en el dominio citoplásmico) de una proteína de la cadena alfa del MHC clase I, y una proteína microglobulina beta.sub.2 o una molécula de la cadena alfa MHC clase II, y una proteína de la cadena beta del MHC clase II, para expresar con ello proteínas de MHC clase I o MHC clase II en la superficie celular. La expresión del MHC clase I o clase II apropiado en asociación con un péptido que tenga la actividad de un antígeno de linfocitos B (v.g. B7-1, B7-2, B7-3) induce una respuesta inmunitaria mediada por las células T contra la célula tumoral transfectada. Opcionalmente, un gen que codifica un constructo antisentido que bloquea la expresión de una proteína asociada al MHC clase II, tal como la cadena invariante, puede cotransfectarse también con un DNA que codifica un péptido que tiene la actividad de un antígeno de los linfocitos B para promover la presentación de antígenos asociados a tumores e inducir inmunidad específica contra los tumores. Así, la inducción de una respuesta inmunitaria mediada por las células T en un individuo humano puede ser suficiente para vencer la tolerancia específica al tumor en el individuo.

La actividad de una proteína de la invención puede, entre otros medios, medirse por los métodos siguientes:

Ensayos adecuados para citotoxicidad de los timocitos o esplenocitos incluyen, sin limitación, los descritos en: Current Protocols in Immunology, recopilado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Herrmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa *et al.*, J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai *et al.*, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140:508-512, 1988; Herrmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa *et al.*, J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai *et al.*, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Bowman *et al.*, J. Virology 61:1992-1998; Takai *et al.*, J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnoli *et al.*, Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Brown *et al.*, J. Immunol. 153:3079-3092, 1994.

Ensayos para respuestas de inmunoglobulina dependientes de células T y cambios de isotipo (que identificarán, entre otras, proteínas que modulan las respuestas de anticuerpos dependientes de las células T y que afectan a los perfiles Th1/Th2) incluyen, sin limitación, los descritos en Maliszewski, J. *Immunol.* 144:3028-3033, 1990; y Assays for B cell function: *In vitro* antibody production, Mond, J. J. and Brunswick, M. En *Current Protocols in Immunology*, J. E. e.a. Coligan compiladores, Vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto, 1994.

Ensayos de reacción de linfocitos mixtos (MLR) (que identificarán, entre otras, proteínas que generan predominantemente respuestas Th1 y CTL) incluyen, sin limitación, los descritos en: *Current Protocols in Immunology*, recopilado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach. W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Capítulo 7, *Immunologic studies in Humans*); Takai *et al.*, *J. Immunol.* 137:3494-3500, 1986; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 140:508-512, 1988; Bertagnoli *et al.*, *J. Immunol.* 149:3778-3783, 1992.

Ensayos dependientes de células dendríticas (que identificarán, entre otras, proteínas expresadas por células dendríticas que activan las células T ingenuas) incluyen, sin limitación, los descritos en: Guery *et al.*, *J. Immunol.* 134:536-544, 1995; Inaba *et al.*, *Journal of Experimental Medicine* 173:549-559, 1991; Macatonia *et al.*, *Journal of Immunology* 154:5071-5079, 1995; Porgador *et al.*, *Journal of Experimental Medicine* 182:255-260, 1995; Nair *et al.*, *Journal of Virology* 67:4062-4069, 1993; Huang *et al.*, *Science* 264:961-965, 1994; Macatonia *et al.*, *Journal of Experimental Medicine* 169: 1255-1264, 1989; Bhardwaj *et al.*, *Journal of Clinical Investigation* 94:797-807, 1994; e Inaba *et al.*, *Journal of Experimental Medicine* 172:631-640, 1990.

Ensayos para supervivencia/apoptosis de los linfocitos (que identificarán, entre otras, proteínas que previenen la apoptosis después de inducción de superantígeno y proteínas que regulan la homeostasis de los linfocitos) incluyen, sin limitación, los descritos en: Darzynkiewicz *et al.*, *Cytometry* 13:795-808, 1992; Gorczyca *et al.*, *Leukemia* 7:659-670, 1993; Gorczyca *et al.*, *Cancer Research* 53:1945-1951, 1993; Itoh *et al.*, *Cell* 66:233-243, 1991; Zacharchuk, *Journal of Immunology* 145:4037-4045, 1990; Zamai *et al.*, *Cytometry* 14:891-897, 1993; Gorczyca *et al.*, *International Journal of Oncology* 1:639-648, 1992.

Ensayos para proteínas que influyen en las etapas iniciales del compromiso y desarrollo de las células T incluyen, sin limitación, los descritos en: Antica *et al.*, *Blood* 84: 111-117, 1994; Fine *et al.*, *Cellular Immunology* 155: 111-122, 1994; Galy *et al.*, *Blood* 85:2770-2778, 1995; Toki *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:7548-7551, 1991.

6.5. Actividad reguladora de la hematopoyesis

Una proteína de la presente invención puede ser útil en la regulación de la hematopoyesis y, como consecuencia, en el tratamiento de deficiencias de células mieloides o linfoides. Incluso una actividad biológica marginal en el soporte de células formadoras de colonias o de líneas de células dependientes de factores indica implicación en la regulación de la hematopoyesis, v.g. en el soporte del crecimiento y la proliferación de células eritroides progenitoras solas o en combinación con otras citoquinas, indicando por tanto utilidad, por ejemplo, en el tratamiento de diversas anemias o para uso en conjunción con irradiación/quimioterapia para estimular la producción de precursores eritroides y/o células eritroides; en el soporte del crecimiento y la proliferación de células mieloides tales como granulocitos y monocitos/macrófagos (esto es, actividad CSF tradicional) útiles, por ejemplo, en conjunción con quimioterapia para prevenir o tratar la mielo-supresión consiguiente; en el soporte del crecimiento y la proliferación de megacariocitos y consiguientemente de plaquetas haciendo posible con ello la prevención o el tratamiento de diversos trastornos plaquetarios tales como trombocitopenia, y generalmente para uso en lugar de o complementariamente a transfusiones de plaquetas; y/o en el soporte del crecimiento y la proliferación de células madre hematopoyéticas que son capaces de madurar en cualquiera y la totalidad de las células hematopoyéticas arriba mencionadas y encuentran por consiguiente utilidad terapéutica en diversos trastornos de las células madre (tales como los tratados usualmente con trasplante, incluyendo, sin limitación, anemia aplásica y hemoglobinuria paroxísmica nocturna), así como en la repoblación del compartimiento de células madre después de irradiación/quimioterapia, sea *in vivo* o *ex vivo* (por ejemplo, en asociación con trasplante de médula ósea o con trasplante de células progenitoras periféricas (homólogas o heterólogas)) como células normales o manipuladas genéticamente para terapia génica.

La actividad de una proteína de la invención puede, entre otros medios, medirse por los métodos siguientes:

Ensayos adecuados para proliferación y diferenciación de diversas líneas hematopoyéticas se han citado arriba.

Ensayos para diferenciación de células madre embrionarias (que identificarán, entre otras, proteínas que incluyen en la hematopoyesis de diferenciación embrionaria) incluyen, sin limitación, los descritos en: Johansson *et al.* *Cellular Biology* 15:141-151, 1995; Keller *et al.*, *Molecular and Cellular Biology* 13:473-486, 1993; McClanahan *et al.*, *Blood* 81:2903-2915, 1993.

Ensayos para supervivencia y diferenciación de células madre (que identificarán, entre otras, proteínas que regulan la linfo-hematopoyesis) incluyen, sin limitación, los descritos en: Methylcellulose colony forming assays, Freshney, M. G. En *Culture of Hematopoietic Cells*, R. I. Freshney, *et al.* compiladores, Vol pp. 265-268, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994; Hirayama *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5907-5911, 1992; Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potential. McNiece, I. K. and Briddell R. A. En *Culture of Hematopoietic Cells*, R. I. Freshney *et al.* compiladores, Vol pp. 23-39. Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994; Neben *et al.*, *Experimental*

Hematology 22:353-359. 1994; Cobblestone area forming cell assay, Ploemacher, R. E. En Culture of Hematopoietic Cells, R. I. Freshney, *et al.* compiladores, Vol pp. 1-21, Wiley-Liss. Inc., New York, N.Y. 1994; Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells, Spooncer, E., Dexter, M. and Allen, T. En Culture of Hematopoietic Cells, R. I. Freshney, *et al.* compiladores Vol pp. 163-179, Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. 1994; Long term culture initiating cell assay, Sutherland, H. J. En Culture of Hematopoietic Cells, R. I. Freshney, *et al.* compiladores Vol. pp. 139-162, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994.

6.6. Actividad de crecimiento de tejidos

Una proteína de la presente invención puede tener también utilidad en composiciones utilizadas para crecimiento o regeneración de huesos, cartílagos, tendones, ligamentos y/o nervios, así como para curación de las heridas y reparación y reposición de tejido, y en atamamiento de quemaduras, cortes y úlceras.

Una proteína de la presente invención, que induce crecimiento de cartílago y/o hueso en circunstancias en las que no se forma hueso normalmente, tiene aplicación en la curación de fracturas óseas y deterioro de cartílagos o defectos en humanos y otros animales. Una preparación de este tipo que emplea una proteína de la invención puede tener uso profiláctico en la reducción de fracturas tanto cerradas como abiertas así como en la fijación mejorada de articulaciones artificiales. La formación nueva de hueso inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumatismos, o inducidos por resección oncológica, y es también útil en cirugía plástica cosmética.

Una proteína de esta invención puede utilizarse también en el tratamiento de la enfermedad periodontal, y en otros procesos de reparación de los dientes. Tales agentes pueden proporcionar un ambiente para atraer células formadoras de hueso, estimular el crecimiento de células formadoras de hueso o inducir la diferenciación de progenitores de células formadoras de hueso. Una proteína de la invención puede ser útil también en el tratamiento de la osteoporosis u osteoartritis, por ejemplo por estimulación de la reparación de hueso y/o cartílago o por bloqueo de la inflamación o procesos de destrucción tisular (actividad de colagenasa, actividad de los osteoclastos, etc.) mediada por procesos inflamatorios.

Otra categoría de actividad de regeneración de tejidos que puede ser atribuible a la proteína de la presente invención es la formación de tendones/ligamentos. Una proteína de la presente invención, que induce tejido semejante a tendón/ligamento o formación de otro tejido en circunstancias en las que dicho tejido no se forma normalmente, tiene aplicación en la curación de roturas de tendones o ligamentos, deformidades y otros defectos en tendones o ligamentos en humanos y otros animales. Una preparación de este tipo que emplea una proteína inductora de tejidos semejantes a tendón/ligamento puede tener uso profiláctico en la prevención del deterioro de tejido de tendones o ligamentos, así como uso en la fijación mejorada de tendones o ligamentos a huesos u otros tejidos, y en la reparación de defectos en tendones o ligamentos. La formación nueva de tejido semejante a tendón/ligamento inducida por una composición de la presente invención contribuye a la reparación de defectos congénitos, inducidos por traumatismos, u otros defectos de tendones o ligamentos de otro origen, y es útil también en la cirugía plástica cosmética para fijación o reparación de tendones o ligamentos. Las composiciones de la presente invención pueden proporcionar ambiente para atraer células formadoras de tendones o ligamentos, estimular el crecimiento de células formadoras de tendones o ligamentos, inducir la diferenciación de progenitores de células formadoras de tendones o ligamentos, o inducir el crecimiento de células o progenitores de tendones/ligamentos *ex vivo* para renovación *in vivo* a fin de efectuar la reparación de tejido. Las composiciones de la invención pueden ser útiles también en el tratamiento de tendinitis, síndrome tunelar carpiano y otros defectos de tendones o ligamentos. Las composiciones pueden incluir también una matriz y/o agente secuestrante apropiada(o) como vehículo, como es bien conocido en la técnica.

La proteína de la presente invención puede ser útil también para proliferación de células neurales y para regeneración de tejido nervioso y cerebral, es decir para el tratamiento de enfermedades y neuropatías del sistema nervioso central y periférico, así como trastornos mecánicos y traumáticos, que implican degeneración, muerte o traumatismo de células neurales o tejido nervioso. Más específicamente, una proteína puede utilizarse en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso periférico, tales como lesiones de nervios periféricos, neuropatía periférica y neuropatías localizadas, así como enfermedades del sistema nervioso central, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis amiotrófica lateral, y síndrome de Shy-Drager. Condiciones adicionales que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen trastornos mecánicos y traumáticos, tales como trastornos de la columna vertebral, traumatismos de cabeza y enfermedades cerebrovasculares tales como derrame cerebral. Neuropatías periféricas resultantes de quimioterapia u otras terapias médicas pueden tratarse también utilizando una proteína de la invención.

Las proteínas de la invención pueden ser útiles también para promover una cicatrización mejor o más rápida de heridas que no se curan, incluyendo, sin limitación, úlceras de presión, úlceras asociadas con insuficiencia vascular, heridas quirúrgicas y traumáticas, etcétera.

Es de esperar que una proteína de la presente invención pueda exhibir también actividad para generación o regeneración de otros tejidos, tales como órganos (con inclusión, por ejemplo, de páncreas, hígado, intestino, riñón, piel, endotelio), músculos (musculatura lisa, esquelética o cardíaca) y tejido vascular (con inclusión del endotelio vascular), o para promover el crecimiento de células que comprenden dichos tejidos. Parte de los efectos deseados puede producirse por inhibición o modulación de la formación de escaras fibróticas a fin de permitir que se regenere el tejido normal. Una proteína de la invención puede exhibir también actividad angiogénica.

Una proteína de la presente invención puede ser útil también para protección o regeneración del intestino y tratamiento de la fibrosis pulmonar o hepática, lesión de reperusión en diversos tejidos, y condiciones que son resultado del deterioro sistémico por las citoquinas.

- 5 Una proteína de la presente invención puede ser útil también para promover o inhibir la diferenciación de tejidos arriba descrita a partir de tejidos o células precursores; o para inhibir el crecimiento de tejidos arriba descritos.

La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, por el método siguiente:

- 10 Ensayos para actividad de generación de tejidos incluyen, sin limitación, los descritos en: Publicación de Patente Internacional No. WO95/16035 (hueso, cartílago, tendón); Publicación de Patente Internacional No. WO95/05846 (nervio, neuronal); Publicación de Patente Internacional No. WO91/07491 (piel, endotelio).

- 15 Ensayos para actividad de curación de heridas incluyen, sin limitación, los descritos en: Winter, Epidermal Wound Healing, pps. 71-112 (Maibach, H. I. and Rovee, D. T. compiladores), Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, modificado por Eaglstein and Mertz, J. Invest. Dermatol 71:382-84 (1978).

6.7. Actividad de activina/inhibina

- 20 Una proteína de la presente invención puede exhibir también actividades relacionadas con activina o inhibina. Un polinucleótido de la invención puede codificar un polipéptido que exhiba tales características. Las inhibinas se caracterizan por su capacidad para inhibir la liberación de hormona estimulante del folículo (FSH), mientras que las activinas se caracterizan por su capacidad para estimular la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH). Así pues, una proteína de la presente invención, sola o en heterodímeros con un miembro de la familia de las inhibinas
25 α , puede ser útil como anticonceptivo basado en la capacidad de las inhibinas para disminuir la fertilidad en los mamíferos hembra y reducir la espermatogénesis en los mamíferos macho. La administración de cantidades suficientes de otras inhibinas puede inducir infertilidad en estos mamíferos. Alternativamente, la proteína de la invención, como homodímero o como heterodímero con otras subunidades de proteínas del grupo de las inhibinas- β , puede ser útil como agente terapéutico inductor de fertilidad, basado en la capacidad de las moléculas de activina para estimular
30 la liberación de FSH por las células de la hipófisis anterior. Véase, por ejemplo, la patente U.S. No. 4.798.885. Una proteína de la invención puede ser útil también para adelanto del comienzo de la fertilidad en mamíferos sexualmente inmaduros, a fin de aumentar la eficiencia de la vida útil reproductora de animales domésticos tales como vacas, ovejas y cerdos.

- 35 La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, por los métodos siguientes:

- Ensayos para actividad de activina/inhibina incluyen, sin limitación, los descritos en: Vale *et al.*, Endocrinology 91:562-572, 1972; Ling *et al.*, Nature 321:779-782, 1986; Vale *et al.*, Nature 321:776-779, 1986; Mason *et al.*, Nature 318:659-663, 1985; Forage *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3091-3095, 1986.

40 6.8. Actividad quimiotáctica/quimiocinética

- Una proteína de la presente invención puede tener actividad quimiotáctica o quimiocinética (es decir, actuar como quimioquina) para células de mamífero, con inclusión, por ejemplo, de monocitos, fibroblastos, neutrófilos, células T,
45 células cebadas, eosinófilos, células epiteliales y/o endoteliales. Un polinucleótido de la invención puede codificar un polipéptido que exhiba tales atributos. Las proteínas quimiotácticas y quimiocinéticas pueden utilizarse para movilizar o atraer una población de células deseada a un sitio de acción deseado. Las proteínas quimiotácticas o quimiocinéticas proporcionan ventajas particulares en el tratamiento de heridas y otros traumatismos de tejidos, así como en el tratamiento de infecciones localizadas. Por ejemplo, la atracción de linfocitos, monocitos o neutrófilos a tumores o sitios
50 de infección puede dar como resultado respuestas inmunitarias mejoradas contra el tumor o el agente infectante.

- Una proteína o péptido tiene actividad quimiotáctica para una población de células particular si la misma puede estimular, directa o indirectamente, la orientación o el movimiento dirigidos de dicha población de células. Preferiblemente, la proteína o péptido tiene la capacidad para estimular directamente el movimiento dirigido de las células. La
55 posibilidad de que una proteína particular tiene actividad quimiotáctica para una población de células puede determinarse fácilmente por empleo de dicha proteína o péptido en cualquier ensayo conocido de quimiotaxis de células.

La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, por los métodos siguientes:

- 60 Ensayos para la actividad quimiotáctica (que identificarán proteínas que inducen o previenen la quimiotaxis) están constituidos por ensayos que miden la capacidad de una proteína para inducir la migración de células a través de una membrana así como la capacidad de una proteína para inducir la adhesión de una población de células a otra población de células. Ensayos adecuados para movimiento y adhesión incluyen, sin limitación, los descritos en: Current Protocols in Immunology, recopilado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marguiles, E. M. Shevach, W. Strober, Pub.
65 Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 6.12, Measurement of alpha and beta Chemokines 6.12.1-6.12.28; Taub *et al.* J. Clin. Invest. 95:1370-1376, 1995; Lind *et al.* APMIS 103:140-146, 1995; Muller *et al.* Eur. J. Immunol. 25:1744-1748; Gruber *et al.* J. of Immunol. 152:5860-5867, 1994; Johnston *et al.* J. of Immunol. 153:1762-1768, 1994.

6.9. *Actividad hemostática y trombolítica*

Una proteína de la invención puede exhibir también actividad hemostática o trombolítica. Un polinucleótido de la invención puede codificar un polipéptido que exhiba tales atributos. Es de esperar que una proteína de este tipo sea útil en el tratamiento de diversos trastornos de la coagulación (con inclusión de trastornos hereditarios, tales como hemofilias) o mejorar la coagulación y otros sucesos hemostáticos en el tratamiento de heridas resultantes de traumatismos, cirugía u otras causas. Una proteína de la invención puede ser útil también para disolver o inhibir la formación de trombosis y para tratamiento y prevención de afecciones resultantes de ello (tales como, por ejemplo, infarto de los vasos cardíacos y del sistema nervioso central (v.g., derrame cerebral).

La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, por los métodos siguientes:

Ensayos para actividad hemostática y trombolítica incluyen, sin limitación, los descritos en: Linet *et al.*, J. Clin. Pharmacol. 26: 131-140, 1986; Burdick *et al.*, Thrombosis Res. 45:413-419, 1987; Humphrey *et al.*, Fibrinolysis 5:71-79 (1991); Schaub, Prostaglandins 35:467-474, 1988.

6.10. *Actividad receptor/ligando*

Una proteína de la presente invención puede demostrar también actividad como receptores, ligandos de receptores o inhibidores o agonistas de interacciones receptor/ligando. Un polinucleótido de la invención puede codificar un polipéptido que exhiba tales características. Ejemplos de tales receptores y ligandos incluyen, sin limitación, receptores de citoquinas y sus ligandos, quinasas receptoras y sus ligandos, fosfatasas receptoras y sus ligandos, receptores implicados en interacciones célula-célula y sus ligandos (incluyendo, sin limitación, moléculas de adhesión celular (tales como selectinas, integrinas y sus ligandos) y pares receptor/ligando implicados en la presentación de antígeno, el reconocimiento de antígeno y el desarrollo de respuestas inmunitarias celulares y humorales). Los receptores y ligandos son útiles también para la selección de inhibidores potenciales de péptidos o moléculas pequeñas de la interacción receptor/ligando relevante. Una proteína de la presente invención (incluyendo, sin limitación, fragmentos de receptores y ligandos) puede ser útil en sí misma como inhibidor de las interacciones receptor/ligando.

La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, por los métodos siguientes:

Ensayos adecuados para actividad receptor-ligando incluyen, sin limitación, los descritos en: Current Protocols in Immunology, recopilado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 7.28, Measurement of Cellular Adhesion under static conditions 7.28.1-7.28.22), Takai *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6864-6868, 1987; Bierer *et al.*, J. Exp. Med. 168: 1145-1156, 1988; Rosenstein *et al.*, J. Exp. Med. 169: 149-160, 1989; Stoltenborg *et al.*, J. Immunol. Methods 175:59-68, 1994; Stitt *et al.*, Cell 80:661-670, 1995.

A modo de ejemplo, los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención puede utilizarse como ligando para un receptor de citoquinas modulando con ello (es decir, intensificando o inhibiendo) la actividad biológica de dicho receptor. Ejemplos de receptores de citoquinas que pueden utilizarse incluyen, pero sin carácter limitante, los receptores de Interleuquina-1 Tipo I o Tipo II. Que los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención exhiban actividad agonista, agonista parcial, antagonista, o antagonista parcial para un receptor particular, tal como un receptor de citoquinas, en un tipo de célula particular puede determinarse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos más adelante en las secciones 6.11.1 y 6.11.2 y en los ejemplos que siguen. En una realización, una o varias células que expresan un receptor de citoquinas (v.g., los Receptores de Interleuquina-1 Tipo I o Tipo II) están en contacto con la proteína de la invención. Ejemplos de células que pueden ponerse en contacto con la proteína de la invención incluyen, pero sin carácter limitante, células de mamífero tales como fibroblastos y células T. Preferiblemente, la nueva proteína de la invención actúa como antagonista para un receptor de citoquinas (v.g. el Receptor de Interleuquina-1) de tal modo que se inhiben las actividades biológicas de dicho receptor.

Estudios que caracterizan fármacos o proteínas como agonista o antagonista, o agonista parcial o antagonista parcial requieren el uso de otras proteínas como ligandos competitivos. Se espera que los polipéptidos de la presente invención exhiban afinidad para el Receptor de Interleuquina-1. Así pues, los polipéptidos de la presente invención pueden utilizarse, por ejemplo, como competidores en ensayos que implican Receptores de Interleuquina-1. Alternativamente, los polipéptidos de la invención pueden marcarse por acoplamiento a radioisótopos, moléculas colorimétricas o moléculas de toxina por métodos convencionales. ("Guide to Protein Purification", Murray P. Deutscher (compilador), Methods in Enzymology Vol. 182 (1990) Academic Press, Inc. San Diego) y utilizarse tanto *in vivo* como *in vitro* para fijarse al Receptor de Interleuquina-1. Ejemplos de radioisótopos incluyen, pero sin carácter limitante, tritio y carbono 14. Ejemplos de moléculas colorimétricas incluyen, pero sin carácter limitante, moléculas fluorescentes tales como fluorescamina, rodamina u otras moléculas colorimétricas. Ejemplos de toxinas incluyen, pero sin carácter limitante, ricina. A modo de ejemplo, las proteínas acopladas a tales moléculas son útiles en estudios que implican metabolismo *in vivo* o *in vitro* del Receptor de Interleuquina-1.

6.11. *Selección de fármacos con polipéptidos de Interleuquina-1 Hy2*

Esta invención es particularmente útil para selección de compuestos por utilización de los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención, particularmente fragmentos de fijación, en cualquiera de una diversidad de técnicas de selección de

fármacos. Los polipéptidos empleados en dicho ensayo pueden encontrarse libres en solución, fijados a un soporte sólido, transportados sobre una superficie celular o localizados intracelularmente. Un método de selección de fármacos utiliza células hospedadoras eucariotas o procariotas que se transforman de manera estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido IL-1 Hy2 deseado. Los fármacos se evalúan contra tales células transformadas en ensayos de fijación competitivos. Dichas células, sea en forma viable o fija, pueden utilizarse para ensayos estándar de fijación. Uno de ellos puede medir, por ejemplo, la formación de complejos entre los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención y el agente que se ensaya o examinar la disminución en la formación de complejo entre los polipéptidos IL-1 Hy2 y una línea de células apropiada, que son bien conocidos en la técnica.

6.11.1 Ensayo Para Actividad Anti-Receptor de Interleuquina-1

En una realización, la actividad antagonista del receptor Interleuquina-1 de los polipéptidos de la invención se determina utilizando un método que implica (1) formar una mezcla que comprende Interleuquina-1, el receptor de Interleuquina-1, y los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención y/o sus agonistas y antagonistas (o candidatos de fármacos agonistas o antagonistas) y/o anticuerpos específicos para los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención; (2) incubar la mezcla en condiciones por las cuales, a no ser por la presencia de dicho polipéptido IL-1 Hy2 de la invención y/o sus agonistas o antagonistas (o candidatos de fármacos agonistas o antagonistas) y/o anticuerpos específicos para los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención, la Interleuquina-1 se fija al receptor de Interleuquina-1; y (3) detectar la presencia o ausencia de fijación específica de Interleuquina-1 al receptor de Interleuquina-1.

6.11.2 Ensayo para antagonistas y agonistas

Se incuban células humanas HepG2 a 37°C durante 18-24 horas en medio Eagle modificado de Dulbecco exento de suero. Monocapas separadas de células se incuban en el mismo medio suplementado con Interleuquina-1 a diversas concentraciones y en el mismo medio complementado con un polipéptido IL-1 Hy2 de la invención a diversas concentraciones.

Las monocapas se lavan enérgicamente con tampón isotónico y se incuban en (35-S)-metionina, 250 μ Ci/ml de medio exento de metionina y se pulsan durante un periodo de 15-30 minutos para evaluar la síntesis neta. El fluido de cultivo de las células se desecha y las monocapas se lavan de nuevo y se suspenden nuevamente en tampón de lisis de células. Las proteínas hepáticas radiomarcadas sintetizadas nuevamente en estos lisados de células se detectan por inmunoprecipitación, SDS-PAGE y fluorografía.

6.12. Actividad anti-inflamatoria

Las proteínas de la presente invención pueden exhibir también actividad anti-inflamatoria. La actividad anti-inflamatoria puede lograrse por aporte de un estímulo a células implicadas en la respuesta inflamatoria, por inhibición o promoción de las interacciones célula-célula (tales como, por ejemplo, adhesión celular), por inhibición o promoción de la quimiotaxis de células involucradas en el proceso inflamatorio, inhibición o promoción de la extravasación de células, o por estimulación o supresión de la producción de otros factores que inhiben o promueven más directamente una respuesta inflamatoria. Las proteínas que exhiben tales actividades pueden utilizarse para tratar afecciones inflamatorias que incluyen afecciones crónicas o agudas), con inclusión, pero sin limitación, de la indicación asociada con infección (tal como choque séptico, sepsis o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), lesión isquemia-reperfusión, letalidad por endotoxinas, artritis, rechazo hiperagudo mediado por el complemento, nefritis, lesión pulmonar inducida por citoquinas o quimioquinas, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn o resultante de la superproducción de citoquinas tales como TNF o IL-1. Las proteínas de la invención pueden ser útiles también para tratar la anafilaxis e hipersensibilidad a una sustancia o material antigénico. En particular, los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención pueden utilizarse para prevenir o tratar condiciones tales como, pero sin carácter limitante, las que se utilizan, por ejemplo, como parte de métodos para la prevención y/o el tratamiento de trastornos que implican sepsis, pancreatitis aguda, choque endotóxico, choque inducido por citoquinas, artritis reumatoide, artritis inflamatoria crónica, deterioro de las células pancreáticas causado por diabetes mellitus Tipo I, enfermedad de rechazo inverso, enfermedad intestinal inflamatoria, inflamación asociada con enfermedad pulmonar, otras enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias, un agente antiproliferativo tal como en el caso de la leucemia mielógena aguda o crónica, o en la prevención de parto prematuro secundario a infecciones intrauterinas.

6.13. Modulación de trastornos relacionados con IL-18, IL-12 e IFN- γ

La administración de polinucleótidos, polipéptidos y agonistas IL-1 Hy2 se espera que sea útil también para el tratamiento de trastornos relacionados con IL-18 y/o IL-12 y/o IFN- γ . IL-1 Hy2 inhibe la actividad de IL-18 e IL-12, con inclusión de la producción de IFN- γ inducida por IL-18 e IL-12.

Se ha encontrado que IL-18 tiene una diversidad de actividades biológicas que incluyen la estimulación de la proliferación de células T activadas, intensificación de la actividad lítica de las células NK, inducción de la secreción de IFN- γ , intensificación de la expresión y función del ligando Fas, y estimulación de la producción del factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF) por las células T activadas. Se ha demostrado que IL-18 contrarresta las infecciones víricas e intracelulares, y suprime la formación de tumores. Sin embargo, IL-18 está involucrada también en la progresión patógena de enfermedades inflamatorias crónicas, con inclusión del choque inducido por endotoxinas, lesión hepática (con inclusión de lesión hepática inducida por endotoxinas, hepatitis, atresia

biliar e hígado graso relacionado con la obesidad) y enfermedades autoinmunes. Otros trastornos relacionados con la producción de IL-18 incluyen melioidosis, deficiencia en la purina nucleosido-fosforilasa, susceptibilidad incrementada a infección por *Leishmania major* y *Staphylococcus aureus*, linfocitosis hemofagocítica, mononucleosis, meningitis/encefalitis viral, meningitis/encefalitis bacteriana e isquemia o lesión por isquemia-reperusión.

La inflamación puede ser resultado de infección con organismos patógenos (con inclusión de bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas, virus, hongos, y parásitos tales como protozoos y lombrices), rechazo de trasplantes (con inclusión de rechazo de órganos sólidos tales como riñón, hígado, corazón, pulmón o córnea, así como rechazo de trasplante de médula ósea con inclusión de la enfermedad de rechazo inverso (GVHD)), o de reacciones localizadas autoinmunes o alérgicas crónicas o agudas. Enfermedades autoinmunes incluyen glomerulonefritis aguda; artritis reumatoide o reactiva; glomerulonefritis crónica, enfermedades intestinales inflamatorias tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enterocolitis necrotizante; síndromes asociados con transfusiones de granulocitos; dermatosis inflamatorias tales como dermatitis de contacto, dermatitis atópica y psoriasis; lupus eritematoso sistémico (SLE), tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, algunas formas de diabetes, o cualquier otro estado autoinmune en el cual el ataque por el sistema inmune del propio individuo da como resultado destrucción tisular patológica. Reacciones alérgicas incluyen asma alérgica, bronquitis crónica, rinitis alérgica, e hipersensibilidad aguda y retardada. Estados de enfermedad inflamatoria sistémica incluyen inflamación asociada con traumatismos, quemaduras, sucesos isquémicos subsiguientes a reperusión (v.g. sucesos trombóticos en corazón, cerebro, intestinos o vasculatura periférica, con inclusión de infarto de miocardio y derrame cerebral), sepsis, ARDS o síndrome de disfunción orgánica múltiple. Se produce también reclutamiento de células inflamatorias en las placas ateroscleróticas.

La activación por endotoxinas de la respuesta inflamatoria sistémica conduce a cierto número de trastornos que incluyen choque bacteriano y/o relacionado con endotoxinas, fiebre, taquicardia, taquipnea, sobreestimulación con citoquinas, permeabilidad vascular incrementada, hipotensión, activación del complemento, coagulación intravascular diseminada, anemia, trombocitopenia, leucopenia, edema pulmonar, síndrome de ansiedad respiratoria de los adultos, isquemia intestinal, insuficiencia y fracaso renal, y acidosis metabólica.

La hepatitis representa trastornos hepáticos que se caracterizan por inflamación hepática y necrosis que pueden manifestarse como una condición aguda o crónica. Estos trastornos hepáticos incluyen hepatitis inducida por virus tal como hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C (hepatitis no-A, no-B), hepatitis D, hepatitis E; hepatitis inducida por toxinas y fármacos tal como hepatotoxicidad por acetaminofeno, hepatotoxicidad por halotano, hepatotoxicidad por metildopa, hepatotoxicidad por isoniazida, hepatotoxicidad por valproato de sodio, hepatotoxicidad por fenitona, hepatotoxicidad por clorpromazina, hepatotoxicidad por amiodarona, hepatotoxicidad por amiodarona, hepatotoxicidad por eritromicina, hepatotoxicidad con anticonceptivos orales, hepatotoxicidad de los esteroides anabólicos sustituidos con 17- α -alquilo y hepatotoxicidad por trimetoprima-sulfametoxazol; hepatitis colestática, hepatitis alcohólica; hepatitis activa crónica autoinmune; y hepatitis mediada por las células T. Otras afecciones que causan lesión hepática incluyen atresia biliar congénita, hígado graso relacionado con obesidad y la enfermedad recesiva autosómica linfocitosis hemofagocítica (HLH).

El IFN- γ inducido por IL-18 juega un papel en la lesión hepática. Se ha demostrado que IFN- γ media la lesión hepática inducida por LPS subsiguiente a Infección de *Propionibacterium acnes* como se describe en Tsuji *et al.* (J. Immunol. 162:1049-55, 1999). Un gran número de macrófagos y linfocitos infiltran el área portal en respuesta a infección de *P. acnes*, lo que da como resultado formación de granulomas intrahepáticos. Los ratones "knockout" por IFN- α exhibían menos infiltración de macrófagos y una reducción en el número y tamaño de granulomas. El tratamiento subsiguiente con dosis bajas de LPS causaba necrosis hepática masiva y aumentaba los niveles séricos de IL-12, IL-18 y TNF- α en los ratones normales, mientras que los ratones knockout exhibían disminuciones drásticas en los niveles séricos de IL-12, IL-18 y TNF- α . La adición de anticuerpo neutralizante de IFN- γ causaba también una disminución en los niveles de IL-18 e IL-12. Este modelo de lesión hepática indica que la lesión hepática inducida por LPS está asociada con niveles incrementados de IL-18, IL-12 e IFN- α . Actualmente, no se conoce un papel de IL-1 β en este modelo de lesión hepática. Dado que se sabe que IL-1 β es inducida por LPS, es posible que IL-1 β juegue también un papel en el trastorno. El tratamiento con IL-1Ra puede modular la gravedad de la lesión hepática debida a la producción de IFN- γ inducida por IL-18 e IL-1 β .

Se ha demostrado también que IL-18 está implicada en el modelo de hepatitis inmunomediada en el que el tratamiento con concanavalina A induce hepatitis en ratones como ha sido descrito por Fiorucci *et al.* (Gastroenterology 118: 404-21, 2000). En este modelo, las células T CD4+ y las citoquinas semejantes a Th1 causan la muerte de las células hepáticas mediada por Fas. El tratamiento con un derivado de óxido nítrico de aspirina protegía contra esta muerte celular por reducción de la producción de IFN- γ , IL-18, IL-12, IL-1 β y TNF- α . Además, un anticuerpo neutralizante de IL-18 causaba una disminución en la producción de IFN- γ y reducía la lesión hepática inducida por conA.

La HLH es una enfermedad recesiva autosómica fatal que se manifiesta en la primera infancia. Esta enfermedad se caracteriza por fiebre, hepatoesplenomegalia, citopenia e infiltración generalizada de órganos vitales por linfocitos y macrófagos activados. Los pacientes con HLH exhiben niveles séricos elevados de IL-18. IL-18 juega un papel importante en la inducción de células Th1 en los pacientes de HLH. (Takara *et al.*, Br. J. Haematol. 106:182-9, 1999).

IL-1 Hy2 inhibe la producción de IFN- γ inducida por IL-18. En los modelos arriba descritos, el grado de actividad de IL-1 β no se conoce. Dado que se sabe que IL-1 β es inducida por LPS, es posible que IL-1 β juegue también un papel en la patogenicidad de estas afecciones. La presencia de la cantidad apropiada de polinucleótidos IL-1 Hy2,

polipéptidos u otros agonistas puede modular la gravedad de los estados de enfermedad debidos tanto a la producción de IFN- γ inducida por IL-18 como a la de IL-1 β .

Se sabe que IL-12 potencia la producción de IFN- γ , y la actividad citolítica de las células NK y los linfocitos T citotóxicos. Estos efectos inmunomoduladores han implicado un papel para IL-12 en las terapias para cánceres y enfermedades infecciosas. Sin embargo, estos mismos efectos terapéuticos pueden promover también trastornos autoinmunes y afecciones inflamatorias crónicas tales como esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes y citotoxicidad.

IL-12 e IFN- γ están implicados en la patogénesis de la esclerosis múltiple (MS). En el modelo animal de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), el efecto desmielinante sobre el sistema nervioso central se produce análogamente al de los humanos que padecen MS. actualmente, se utiliza IFN- β para tratar la MS. El mecanismo del tratamiento con IFN- β puede consistir en la disminución del número de células T productoras de IFN- γ en los pacientes de MS. (Rep *et al.*, J. Neuroimmunol. 96:92-100, 1999). Adicionalmente, se ha encontrado que la producción de IFN- γ en los linfocitos de la sangre está en correlación con el registro de incapacidad en los pacientes de MS. (Petcreit *et al.*, Mult. Scler. 6:19-23, 2000). Se encontró que los anticuerpos contra IL-12 previenen los relapsos inducidos por superantígeno y espontáneos de la EAE en los ratones (Constantinescu *et al.*, J. Immunol. 161:5097-5104, 1998). Todos estos estudios apuntan a la implicación de la producción de IFN- γ inducida por IL-12 en la progresión de la MS en pacientes humanos. Por esta razón, el tratamiento con polinucleótidos, polipéptidos u otros agonistas IL-1 Hy2 para reducir la producción de IFN- γ puede ser una terapia útil para los pacientes de MS.

La combinación de IL-12 e IL-2 tiene actividad antitumoral sinérgica *in vivo*. Sin embargo, en pruebas clínicas la combinación dio como resultado una toxicidad importante y choque y mortalidad subsiguientes. (Cohen, Science 270:908, 1995). En un modelo murino investigado por Carson *et al.* (J. Immunol., 162:4943-5, 1999) se determinó que la respuesta inflamatoria sistémica fatal era dependiente de las células NK pero no estaba en relación con otras moléculas efectoras en el sistema tales como IL-1, TNF- α , e IFN- γ . Se espera que los polinucleótidos, polipéptidos u otros agonistas de IL-1 Hy2 inhiban la producción de IFN- γ inducida por IL-12 y se espera que inhiban otras actividades biológicas de IL-12 tales como la actividad citolítica de las células NK. La inhibición de la actividad de las células NK, por administración de IL-Ra, puede reducir la toxicidad resultante del tratamiento antitumoral con IL-12.

El efecto de IL-1 Hy2 sobre la actividad de IL-12 y/o IL-18 puede determinarse por medida de las actividades biológicas de estas citoquinas. Se sabe que tanto IL-12 como IL-18 inducen la producción de IFN- γ en células T. Además de IFN- γ , la combinación de IL-12 e IL-18 aumenta la producción de IL-3, IL-6 y TNF. Se espera que el tratamiento con IL-1 Hy2 reduzca la producción de IFN- γ inducida por IL-12 e IL-18. Los niveles circulantes o locales de IFN- γ en muestras de tejidos o fluidos de pacientes tratados con polinucleótidos IL-1 Hy2, polipéptidos u otros agonistas será una indicación de los efectos terapéuticos de IL-1 Hy2 sobre los trastornos relacionados con IL-18 e IL-12. Muestras de tejidos incluyen muestras de tejido de un área implicada en la inflamación u otra enfermedad. Las muestras de fluidos incluyen, por ejemplo, sangre entera, plasma, suero, fluido cerebroespinal, fluido sinovial, fluidos peritoneales (con inclusión de fluidos de lavado o exudado), fluidos pleurales (con inclusión de fluidos de lavado o exudado), fluidos de heridas (con inclusión de fluidos de lavado o exudado).

Adicionalmente, se sabe que IL-12 activa las células NK y reduce los niveles séricos de IgE. Estos ensayos pueden utilizarse también para medir la efectividad del tratamiento con IL-1 Hy2 para trastornos relacionados con IL-12. La actividad citolítica de las células NK en pacientes tratados con polinucleótidos, polipéptidos u otros agonistas de IL-1 Hy2 puede ensayarse por medida de la aptitud de las muestras de sangre de los pacientes para la lisis de las células de carcinoma de colon o linfoma *in vitro*. (Lieberman *et al.*, J. Sur. Res., 50:410-415, 1992). Adicionalmente, los niveles séricos de IgE de pacientes tratados con IL-1 Hy2 pueden medirse para determinar la efectividad del tratamiento para trastornos relacionados con IL-12. (Kiniwa *et al.* J. Clin. Invest., 90:262-66, 1992).

6.14. Leucemias

Las leucemias y trastornos afines pueden tratarse o prevenirse por administración de un agente terapéutico que promueve o inhibe la función de los polinucleótidos y/o polipéptidos de la invención. Tales leucemias y trastornos afines incluyen, pero sin carácter limitante, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia crónica, leucemia crónica mielocítica (granulocítica) y leucemia crónica linfocítica (para una revisión de tales trastornos, véase Fishman *et al.*, 1985, Medicine, 2ª Edición, J. B. Lippincott Co., Philadelphia).

6.15. Trastornos del sistema nervioso

Los trastornos del sistema nervioso, que implican tipos de células que pueden ensayarse en cuanto a eficacia de la intervención con compuestos que modulan la actividad de los polinucleótidos y/o polipéptidos de la invención, y que pueden ser tratados observando así una indicación de utilidad terapéutica, incluyen, pero sin carácter limitante, lesiones del sistema nervioso, y enfermedades o trastornos que dan como resultado desconexión de axones, disminución o degeneración de neuronas, o desmielinación. Lesiones del sistema nervioso que pueden ser tratadas en un paciente (con inclusión de pacientes humanos y mamíferos no humanos) de acuerdo con la invención incluyen, pero sin carácter limitante, las lesiones siguientes de los sistemas nerviosos central (con inclusión de la médula espinal y el cerebro) o periférico:

(i) lesiones traumáticas, con inclusión de lesiones causadas por lesión física o asociadas con cirugía, por ejemplo, lesiones que cortan una porción del sistema nervioso, o lesiones de compresión;

(ii) lesiones isquémicas, en las cuales una falta de oxígeno en una porción del sistema nervioso da como resultado lesión o muerte neuronal, con inclusión de infarto cerebral o isquemia, o infarto o isquemia de la médula espinal;

(iii) lesiones infecciosas, en las cuales una porción del sistema nervioso se destruye o se lesiona como resultado de infección, por ejemplo, por un absceso o asociada a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, virus del herpes zóster, o virus del herpes simplex o con enfermedad de Lyme, tuberculosis o sífilis;

(iv) lesiones degenerativas, en las cuales una porción del sistema nervioso es destruida o lesionada como resultado de un proceso degenerativo con inclusión, pero sin carácter limitante, de degeneración asociada con la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington, o esclerosis amiotrófica lateral;

(v) lesiones asociadas con enfermedades o trastornos nutricionales, en los cuales una porción del sistema nervioso es destruida o lesionada por un trastorno nutricional o trastorno de metabolismo con inclusión, pero sin carácter limitante, de deficiencia en vitamina B12, deficiencia en ácido fólico, enfermedad de Wernicke, ampliopia tabaco-alcohol, enfermedad de Marchiafava-Bignami (degeneración primaria del cuerpo calloso), y degeneración cerebelar alcohólica;

(vi) lesiones neurológicas asociadas con enfermedades sistémicas con inclusión, pero sin carácter limitante, de diabetes (neuropatía diabética, parálisis de Bell), lupus eritematoso sistémico, carcinoma, o sarcoidosis;

(vii) lesiones causadas por sustancias tóxicas que incluyen alcohol, plomo, o neurotoxinas particulares; y

(viii) lesiones de desmielinación en las cuales una porción del sistema nervioso se destruye o lesiona por una enfermedad desmielinante con inclusión, pero sin carácter limitante, de esclerosis múltiple, mielopatía asociada con el virus de la inmunodeficiencia humana, mielopatía transversa de diversas etiologías, leucoencefalopatía multifocal progresiva, y mielínolisis pontina central.

Los agentes terapéuticos que son útiles de acuerdo con la invención para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso pueden seleccionarse por ensayo de la actividad biológica en la producción de la supervivencia o diferenciación de las neuronas. Por ejemplo, y sin carácter de limitación, agentes terapéuticos que provocan cualquiera de los efectos siguientes pueden ser útiles de acuerdo con la invención:

(i) tiempo de supervivencia incrementado de neuronas en cultivo;

(ii) brote incrementado de neuronas en cultivo o *in vivo*;

(iii) producción incrementada de una molécula asociada a neuronas en cultivo o *in vivo*, v.g., colina-acetiltransferasa o acetilcolinesterasa con respecto a neuronas motoras; o

(iv) disminución de los síntomas de disfunción neuronal *in vivo*.

Tales efectos pueden medirse por cualquier método conocido en la técnica. En realizaciones preferidas, no limitantes, la supervivencia incrementada de las neuronas puede medirse por el método expuesto en Arakawa *et al.* (1990, J. Neurosci. 10:3507-3515); el brote incrementado de neuronas puede ser detectado por métodos expuestos en Pestronk *et al.* (1980, Exp. Neurol. 70:65-82) o Brown *et al.* 81981, Ann. Rev. Neurosci. 4:17-42); la producción incrementada de moléculas asociadas a neuronas puede medirse por bioensayo, ensayo enzimático, fijación de anticuerpos, ensayo de transferencia Northern, etc., dependiendo de la molécula a medir; y la disfunción de neuronas motoras puede medirse por evaluación de la manifestación física del trastorno de las neuronas motoras, v.g., debilidad, velocidad de conducción de las neuronas motoras, o discapacidad funcional.

En una realización específica, trastornos de neuronas motoras que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen, pero sin carácter limitante, trastornos tales como infarto, infección, exposición a toxinas, traumatismos, deterioro quirúrgico, enfermedad degenerativa o enfermedad maligna que pueden afectar a las neuronas motoras así como a otros componentes del sistema nervioso, así como trastornos que afectan selectivamente las neuronas tales como esclerosis amiotrófica lateral, y que incluyen, pero sin carácter limitante, atrofia muscular espinal progresiva, parálisis vulvar progresiva, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular infantil y juvenil, parálisis vulvar progresiva de la infancia (síndrome de Fazio-Londe), poliomieltis y síndrome post-polio, así como Neuropatía Motosensorial Hereditaria (enfermedad dental de Charcot-Marie).

6.16. Otras actividades

Una proteína de la invención puede exhibir también una o más de las actividades o efectos adicionales: inhibición del crecimiento, infección o función de agentes infecciosos o destructores, que incluyen, sin limitación, bacterias, virus, hongos y otros parásitos; características corporales efectoras (supresoras o intensificadoras), que incluyen, sin limitación, estatura, peso, color del pelo, color de los ojos, piel, relación grasa a magra u otra pigmentación tisular,

o tamaño o forma de órganos o partes del cuerpo (tales, por ejemplo, aumento o disminución de las mamas, cambio en la forma o el perfil óseos); efectos sobre los biorritmos o los ciclos o ritmos circadianos; efectos sobre la fertilidad de individuos macho o hembra; efectos sobre el metabolismo, catabolismo, anabolismo, procesamiento, utilización, almacenamiento o eliminación de la grasa dietética, lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, co-factores u otros factores o componentes de la nutrición; efectos sobre las características de comportamiento, incluyendo, sin limitación, apetito, libido, estrés, cognición (con inclusión de trastornos cognitivos), depresión (con inclusión de trastornos depresivos) y comportamientos violentos; el aporte de efectos analgésicos u otros efectos reductores del dolor; la promoción de la diferenciación y el crecimiento de células madre embrionarias en linajes distintos de los linajes hematopoyéticos; actividad hormonal o endocrina; en el caso de las enzimas, corrección de deficiencias de la enzima y tratamiento de enfermedades tratadas con la deficiencia; tratamiento de trastornos hiperproliferativos (tales como, por ejemplo, psoriasis); actividad afín a las inmunoglobulinas (tales como, por ejemplo, la capacidad para fijar antígenos o complemento); y la aptitud para actuar como antígeno en una composición de vacuna a fin de generar una respuesta inmunitaria contra dicha proteína u otro material o entidad que reacciona cruzadamente con dicha proteína.

6.17. Identificación de polimorfismos

La demostración de polimorfismos, por ejemplo, los polimorfismos T125C, C184T y A205C ilustrados en el Ejemplo 2 siguiente, hace posible la identificación de polimorfismos de este tipo en individuos humanos y el uso farmacogenético de esta información para diagnóstico y tratamiento. Tales polimorfismos pueden estar asociados con, p.ej., predisposición o susceptibilidad diferencial a diversos estados de enfermedad (tales como trastornos que implican inflamación o respuesta inmunitaria) o una respuesta diferencial a la administración de fármacos, y esta información genética puede utilizarse para elaborar adecuadamente el tratamiento preventivo o terapéutico. Por ejemplo, la existencia de un polimorfismo asociado con una predisposición a inflamación o enfermedad autoinmune hace posible el diagnóstico de esta condición en humanos por identificación de la presencia del polimorfismo.

Los polimorfismos pueden identificarse por una diversidad de vías conocidas en la técnica todas las cuales implican generalmente obtener una muestra de un paciente, analizar el DNA de la muestra, lo que implica opcionalmente aislamiento o amplificación de DNA, e identificar la presencia del polimorfismo en el DNA. Por ejemplo, puede utilizarse PCR para amplificar un fragmento apropiado de DNA genómico que puede secuenciarse luego. Alternativamente, el DNA puede someterse a hibridación de oligonucleótidos alelo-específicos (en la cual oligonucleótidos apropiados se hibridan al DNA en condiciones que permiten la detección de un desapareamiento de una sola base) o a un ensayo de extensión de un solo nucleótido (en el cual un oligonucleótido que se hibrida inmediatamente adyacente a la posición del polimorfismo se extiende con uno o más nucleótidos marcados). Adicionalmente, puede realizarse el análisis tradicional de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (utilizando enzimas de restricción que proporcionan digestión diferencial del DNA genómico dependiendo de la presencia o ausencia del polimorfismo).

Alternativamente, podría detectarse también un polimorfismo que dé como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos por detección de un cambio correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la proteína, v.g., por un anticuerpo específico para la secuencia variante.

7. Métodos terapéuticos

Los nuevos polipéptidos IL-1 Hy2 (con inclusión de fragmentos, análogos y variantes) de la invención tienen numerosas aplicaciones de una diversidad de métodos terapéuticos. Ejemplos de aplicaciones terapéuticas incluyen, pero sin carácter limitante, los ilustrados a continuación.

7.1. Sepsis

Una realización de la invención es la administración de una cantidad efectiva de los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención a individuos que se encuentran en riesgo elevado de contraer sepsis, o que han contraído sepsis. Un ejemplo de la primera categoría son los pacientes que están a punto de ser sometidos a cirugía. Si bien el modo de administración no es particularmente importante, se prefiere la administración parenteral debido al progreso rápido de la sepsis, y por tanto, la necesidad de hacer que el inhibidor se extienda rápidamente por todo el cuerpo. Así, el modo preferido de administración consiste en suministrar un bolus I.V. poco antes, durante, o después de la cirugía. La dosificación de los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención será determinada normalmente por el médico que prescriba el tratamiento. Debe esperarse que la dosificación varíe de acuerdo con la edad, el peso y la respuesta del paciente individual. Típicamente, la cantidad de inhibidor administrada por dosis estará comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 25 mg/kg de peso corporal, siendo la dosis preferida aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal del paciente. Para administración parenteral, los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención se formularán en una forma inyectable combinada con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos son bien conocidos en la técnica y ejemplos de los mismos incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y soluciones constituidas por pequeñas cantidades de la sero-albúmina humana. El vehículo puede contener cantidades menores de aditivos que mantienen la isotonicidad y estabilidad del inhibidor. La preparación de estas soluciones está dentro de la experiencia en la técnica. Típicamente, el inhibidor de citoquinas se formulará en tales vehículos a una concentración de aproximadamente 1-8 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml.

7.2. Artritis e inflamación

Los efectos inmunosupresores del inhibidor de la Interleuquina-1 contra la artritis reumatoide se determinan en un sistema modelo animal experimental. El sistema modelo experimental es la artritis inducida por adyuvantes en ratas, y el protocolo ha sido descrito por J. Holoshitz, *et al.*, 1983, Science, 219:56, o por B. Waksman *et al.*, 1963, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 23:129. La inducción de la enfermedad puede causarse por una sola inyección, generalmente por vía intradérmica, de una suspensión de *Mycobacterium tuberculosis* muertos en adyuvante de Freund completo (CFA). La ruta de la inyección puede variar, pero las ratas pueden inyectarse en la base de la cola con una mezcla adyuvante. El inhibidor se administra en solución tamponada con fosfato (PBS) a una dosis de aproximadamente 1-5 mg/kg. El control consiste en la administración de PBS exclusivamente.

El procedimiento para ensayar los efectos del inhibidor de Interleuquina-1 consistiría en inyectar por vía intradérmica *Mycobacterium tuberculosis* muertos en CFA seguido por administración inmediata del inhibidor y tratamiento subsiguiente en días alternos hasta el día 24. Los días 14, 15, 18, 20, 22 y 24 después de la inyección de *Mycobacterium* CFA, puede obtenerse un registro global de artritis como ha sido descrito por J. Holoskitz anteriormente. Un análisis de los datos revelaría que el inhibidor tendría un efecto espectacular sobre el hinchamiento de las articulaciones tal como se mide por una disminución del registro de artritis.

7.3. Diabetes

Se ha demostrado que la Interleuquina-1 está implicada en la destrucción de las células de los islotes en diabetes mellitus (DM) (Mandrup-Paulsen, T., K. Bendtzen, J. Nerup, C.A. Dinarello, M. Svenson, y J.H. Nielson [1986] Diabetologia 29:63-67). Los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención limitan el deterioro mediado por linfocitos y macrófagos a las células de los islotes en casos incipientes de DM identificados por susceptibilidad a la enfermedad por antecedentes genéticos e historia familiar. La destrucción inflamatoria de las células de los islotes pancreáticos beta en tales individuos con DM inicial se reduce por la administración parenteral de los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención que tienen un efecto anti-Interleuquina-1 en el páncreas.

7.4. Formulaciones anti-hipotensivas exentas de arginina

La formulación parenteral del régimen terapéutico se define como inclusiva de: aproximadamente 3,4 g/l de isoleucina, aproximadamente 4-6 g/l de leucina, aproximadamente 3-4 g/l de lisina, aproximadamente 1,2 g/l de metionina, aproximadamente 1,2 g/l de fenilalanina, aproximadamente 2-3 g/l de treonina, aproximadamente 0,5-1,5 g/l de triptófano, aproximadamente 3-4 g/l de valina, aproximadamente 4,5 g/l de alanina, aproximadamente 1-2 g/l de histidina, aproximadamente 3-4 g/l de prolina, aproximadamente 1-2 g/l de serina, aproximadamente 0,25-0,75 g/l de tirosina, aproximadamente 4-5 g/l de glicina y aproximadamente 2-3 g/l de ácido aspártico, juntos en un excipiente farmacológicamente aceptable. En otra realización preferida de la formulación parenteral descrita, la formulación puede incluir adicionalmente ornitina, de modo más particular a una concentración de aproximadamente 1-2 g/l. En otra realización adicional de la formulación parenteral descrita, la formulación puede incluir citrulina, muy preferiblemente a una concentración comprendida entre aproximadamente 1 g/l y aproximadamente 2 g/l. Tanto citrulina como ornitina pueden incluirse en otra realización adicional de la formulación, de nuevo a las concentraciones indicadas.

El método incluye una formulación exenta de arginina que comprende los aminoácidos y concentraciones de los mismos ya descritos en esta memoria, juntos en un excipiente farmacológicamente aceptable. De nuevo, la formulación puede incluir adicionalmente ornitina, citrulina, o ambas, para suministrar aún más concentraciones fisiológicamente requeridas de sustratos del ciclo de la urea al animal. Muy preferiblemente, la formulación se proporciona como una formulación parenteral.

Otro aspecto del método comprende un método para tratar hipotensión relacionada con agentes quimioterapéuticos. En una realización muy preferida, el método comprende monitorizar un animal que recibe un agente quimioterapéutico para una disminución en la presión sanguínea sistólica hasta menos de aproximadamente 100 mm Hg a fin de detectar un animal con hipotensión sistémica, tratar el animal que tiene hipotensión sistémica con un régimen terapéutico que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación exenta de arginina suficiente para reducir las concentraciones de arginina en plasma o suero administrada simultáneamente con o seguida por la administración de una concentración terapéuticamente eficaz de un polipéptido IL-1 Hy2, y mantener el animal en el régimen terapéutico hasta que se hace detectable un aumento de la presión sanguínea sistólica hasta al menos aproximadamente 100 mm Hg. Muy preferiblemente, la formulación exenta de arginina es una formulación parenteral.

En una realización preferida, los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención se utilizan en combinación con la formulación anti-hipotensiva exenta de arginina para tratar la hipotensión en un animal, particularmente la hipotensión causada por exposición a choque endotóxico o séptico.

Un paciente que tiene una presión sanguínea sistólica menor que aproximadamente 100 mm Hg será utilizado como diana para el presente tratamiento. Dicho paciente debe someterse a una alimentación continua de una formulación exenta de arginina que incluye una mezcla de aminoácidos esenciales y no esenciales como se describe en la patente U.S. No. 5.334.380. El paciente se trata simultáneamente con los polipéptidos antagonistas de Interleuquina-1 de la invención. Se extraerán muestras de sangre del paciente y se determinarán los niveles de arginina en la fracción de suero o plasma.

7.5. Formulaciones farmacéuticas y rutas de administración

Una proteína de la presente invención (derivada de cualquier fuente, incluyendo sin limitación de fuentes recombinantes y no recombinantes) puede administrarse a un paciente que se encuentra en necesidad, en sí misma, o en composiciones farmacéuticas en las cuales aquélla está mezclada con vehículos o excipientes adecuados a las dosis de tratamiento o mejora de una diversidad de trastornos. Dicha composición puede contener también (además de proteína y un vehículo) diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores, solubilizadores, y otros materiales bien conocidos en la técnica. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del o de los ingredientes activos. Las características del vehículo dependerán de la ruta de administración. La composición farmacéutica de la invención puede contener también citoquinas, linfoquinas, u otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, trombopoyetina, factor de células madre, y eritropoyetina.

La composición farmacéutica puede contener adicionalmente otros agentes que mejoran la actividad de la proteína o complementan su actividad o uso en tratamiento. Tales factores y/o agentes adicionales pueden incluirse en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con la proteína de la invención, o para minimizar efectos secundarios. La proteína que puede administrarse con IL-1 Hy2 incluye otros polipéptidos antagonistas de receptores de IL-1 tales como IL-1Ra e IL-1 Hy1. Inversamente, la proteína de la presente invención puede incluirse en formulaciones de los agentes particulares citoquina, linfoquina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o anti-trombótico, o agente anti-inflamatorio a fin de minimizar los efectos secundarios de la citoquina, linfoquina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o anti-trombótico, o agente anti-inflamatorio. Una proteína de la presente invención puede ser activa en multímeros (v.g., heterodímeros u homodímeros) o complejos consigo misma o con otras proteínas. Como resultado, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender una proteína de la invención en dicha forma multímera o complejada.

Técnicas para formulación y administración de los compuestos de la presente solicitud pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere adicionalmente a aquella cantidad del compuesto que es suficiente para dar como resultado mejora de los síntomas, v.g., tratamiento, curación, prevención o mejora de la afección médica relevante, o un aumento en la tasa de tratamiento, curación, prevención o mejora de dichas afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado exclusivamente, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a dicho ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado efecto terapéutico, tanto si se administran en combinación como serial o simultáneamente.

En la práctica del método de tratamiento o uso de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de la presente invención se administra a un mamífero que padece una afección a tratar. La proteína de la presente invención puede administrarse de acuerdo con el método de la invención, sea sola o en combinación con otras terapias tales como tratamientos que emplean citoquinas, linfoquinas u otros factores hematopoyéticos. Cuando se co-administra con una o más citoquinas, linfoquinas u otros factores hematopoyéticos, la proteína de la presente invención puede administrarse sea simultáneamente con la o las citoquinas, linfoquina(s), otro u otros factores hematopoyéticos, factores trombolíticos o anti-trombóticos, o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, el médico que tiene a su cargo el tratamiento decidirá en cuanto a la secuencia apropiada de administración de la proteína de la presente invención en combinación con una o más citoquinas, linfoquinas, u otros factores hematopoyéticos, factores trombolíticos o anti-trombóticos.

7.6. Rutas de administración

Rutas de administración adecuadas pueden, por ejemplo, incluir la administración oral, rectal, transmucosal, o intestinal; suministro parenteral, con inclusión de inyecciones intramusculares, subcutáneas, o intramedulares, así como inyección intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, o intraocular. La administración de la proteína de la presente invención utilizada en la composición farmacéutica o para practicar el método de la presente invención puede llevarse a cabo en una diversidad de vías convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, aplicación tópica o inyección cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral o intravenosa. La administración intravenosa al paciente es la preferida.

Alternativamente, el compuesto puede administrarse de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, por inyección del compuesto directamente en una articulación artrítica o en tejido fibrótico, a menudo en una formulación de tipo depósito o de liberación sostenida. Con objeto de prevenir el proceso de formación de escaras que ocurre frecuentemente como complicación de la cirugía del glaucoma, los compuestos pueden administrarse tópicamente, por ejemplo como gotas oftálmicas. Adicionalmente, es posible administrar el fármaco en un sistema de suministro de fármaco direccionado, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico, direccionado, por ejemplo, a un tejido artrítico o fibrótico. Los liposomas estarán direccionados a y serán capturados selectivamente por el tejido afectado.

7.7. *Composiciones/formulaciones*

Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse por tanto de manera convencional utilizando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden ser utilizadas farmacéuticamente. Estas composiciones farmacéuticas pueden fabricarse de una manera que es conocida en sí misma, v.g., por procesos de mezclado convencional, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. La formulación apropiada depende de la ruta de administración elegida. Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de la presente invención por vía oral, la proteína de la presente invención se encontrará en la forma de una tableta, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de tableta, la composición farmacéutica de la invención puede contener adicionalmente un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. La tableta, la cápsula, y el polvo contienen desde aproximadamente 5 a 95% de la proteína de la presente invención, y con preferencia desde aproximadamente 25 a 90% de la proteína de la presente invención. Cuando se administra en forma líquida, pueden añadirse un vehículo líquido tal como agua, éter de petróleo, aceites de origen animal o vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soja, aceite de sésamo o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener adicionalmente solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene desde aproximadamente 0,5 a 90% en peso de la proteína de la presente invención, y con preferencia desde aproximadamente 1 a 50% de la proteína de la presente invención.

Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de la presente invención por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la proteína de la presente invención se encontrará en forma de una solución acuosa exenta de pirógenos y parenteralmente aceptable. La preparación de dichas soluciones de proteína parenteralmente aceptables, en lo que respecta a pH, isotonicidad, estabilidad y análogos, está dentro de la experiencia de la técnica. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debería contener, además de la proteína de la presente invención, un vehículo isotónico tal como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa, Inyección de Dextrosa y Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer Lactada, u otro vehículo conocido en la técnica. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener también estabilizadores, conservantes, tampones, antioxidantes, u otros aditivos conocidos por los expertos en la técnica. Para la inyección, los agentes de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica. Para administración transmucosal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a atravesar. Dichos penetrantes son conocidos generalmente en la técnica.

Para la administración oral, los compuestos pueden formularse fácilmente por combinación de los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que los compuestos de la invención se formen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lodos, suspensiones y análogos, para ingestión oral por un paciente a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse [sic] excipiente sólido, triturar opcionalmente una mezcla resultante, y procesar la mezcla de gránulos, después de añadir adyuvantes adecuados, en caso deseado, para obtener tabletas o núcleos de gragea. Excipientes adecuados, son, en particular, cargas tales como azúcares, con inclusión de lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metil-celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes desintegrantes, tales como la polivinil-pirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Los núcleos de gragea se proveen de recubrimientos adecuados. Para este propósito, pueden utilizarse soluciones concentradas de azúcar, las cuales pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil-pirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de barniz, y disolventes o mezclas de disolventes orgánicos adecuados. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a las tabletas o recubrimientos de gragea para identificación o a fin de caracterizar diferentes combinaciones de dosis del compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que pueden utilizarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste sin holgura hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste sin holgura pueden contener los ingredientes activos en mezcla con una carga tal como lactosa, aglomerantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, aceite de parafina, o polietilenglicoles líquidos. Adicionalmente, pueden añadirse estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben encontrarse en dosis adecuadas para dicha administración. Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional.

Para administración por inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en la forma de una presentación de pulverización aerosol mediante envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, v.g., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula que suministre una cantidad medida. Cápsulas y cartuchos de, v.g., gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse de modo que contengan una mezcla de polvo del compuesto

y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Los compuestos pueden formularse para administración parenteral por inyección, v.g., por inyección de tipo bolus o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, v.g., en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes.

Formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección aceitosas apropiadas. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas de inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Alternativamente, el ingrediente activo puede encontrarse en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, v.g., agua estéril exenta de pirógenos, antes de su utilización.

Los compuestos pueden formularse también en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, v.g., que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos pueden formularse también como preparación de tipo depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales adecuados polímeros o hidrófobos (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas cambiadoras de iones, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Un vehículo farmacéutico para los compuestos hidrófobos de la invención es un sistema codisolvente que comprende alcohol bencílico, un agente tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible con el agua, y una fase acuosa. El sistema codisolvente puede ser el sistema codisolvente VPD. VPD es una solución con 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v del agente tensioactivo no polar polisorbato 80, y 65% p/v de polietilenglicol 300, llevada a volumen en etanol absoluto. El sistema codisolvente VPD (VPD:5W) está constituido por VPD diluida en relación 1:1 con una solución de dextrosa al 5% en agua. Este sistema codisolvente disuelve bien los compuestos hidrófobos, y produce por sí mismo poca toxicidad por administración sistémica. Naturalmente, las proporciones de un sistema codisolvente pueden modificarse considerablemente sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Adicionalmente, la identidad de los componentes del codisolvente puede variar: por ejemplo, pueden utilizarse otros agentes tensioactivos no polares de baja toxicidad en lugar de polisorbato 80; el tamaño de la fracción de polietilenglicol puede variar; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar el polietilenglicol, v.g. polivinil-pirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituir a la dextrosa. Alternativamente, pueden emplearse otros sistemas de suministro para compuestos farmacéuticos hidrófobos. Liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de suministro de vehículos o excipientes para fármacos hidrófobos. Ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido pueden emplearse también, aunque usualmente a costa de una mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos pueden suministrarse utilizando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Diversos materiales de liberación sostenida han sido establecidos y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos durante varias semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de la proteína.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender también vehículos o excipientes adecuados sólidos o en fase de gel. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero sin carácter limitante, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles. Muchos de los compuestos inhibidores de proteinasas de la invención pueden proporcionarse como sales con iones de carga opuesta farmacéuticamente compatibles. Tales sales de adición de base farmacéuticamente aceptables son aquellas sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los ácidos libres y que se obtienen por reacción con bases inorgánicas u orgánicas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de magnesio, amoníaco, trietilamina, dialquilamina, monoalquilamina, aminoácidos dibásicos, acetato de sodio, benzoato de potasio, trietanolamina y análogos.

La composición farmacéutica de la invención puede encontrarse en la forma de un complejo de la o las proteínas de la presente invención junto con antígenos proteicos o peptídicos. El antígeno proteico y/o peptídico suministrará una señal estimuladora a la vez a los linfocitos B y a los linfocitos T. Los linfocitos B responderán al antígeno a través de su receptor de inmunoglobulinas de la superficie. Los linfocitos T responderán al antígeno a través del receptor de las células T (TCR) después de la presentación del antígeno por las proteínas del MHC. El MHC y las proteínas estructuralmente afines, con inclusión de las codificadas por los genes del MHC clase I y clase II en las células hospedadoras servirán para presentar el o los antígenos peptídicos a los linfocitos T. Los componentes antigénicos podrían suministrarse también como complejos purificados MHC-peptidos solos o con moléculas co-estimuladoras que puedan señalar directamente las células T. Alternativamente, anticuerpos capaces de fijar inmunoglobulinas en la superficie y otras moléculas en las células B así como anticuerpos capaces de fijar el TCR y otras moléculas en las células T pueden combinarse con la composición farmacéutica de la invención. La composición farmacéutica de la invención puede encontrarse en la forma de un liposoma en el cual la proteína de la presente invención está combinada, además de otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en

forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, o capas de laminillas en solución acuosa. Lípidos adecuados para formulación de liposomas incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, y análogos. La preparación de tales formulaciones de liposomas está plenamente dentro del nivel de experiencia en la técnica, como se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. Nums. 4.235.871; 4.501.728; 4.837.028; y 4.737.323, todas las cuales se incorporan en esta memoria por regencia.

La cantidad de la proteína de la presente invención en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se esté tratando y de la naturaleza de los tratamientos anteriores a que haya sido sometido el paciente. Finalmente, el médico que tiene a su cargo el tratamiento decidirá la cantidad de la proteína de la presente invención con la que deba tratarse cada paciente individual. Inicialmente, el médico que atiende el tratamiento administrará dosis bajas de la proteína de la presente invención y observará la respuesta del paciente. Pueden administrarse dosis mayores de la proteína de la presente invención hasta que se alcance el efecto terapéutico óptimo en el paciente, y en dicho momento la dosis no se incrementa más. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas utilizadas para practicar el método de la presente invención deberían contener aproximadamente 0,01 μ g a aproximadamente 100 mg (con preferencia aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 10 mg, de modo más preferible aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 1 mg) de la proteína de la presente invención por kg de peso corporal. Para las composiciones de la presente invención que son útiles para regeneración de hueso, cartílago, tendón o ligamento, el método terapéutico incluye administrar la composición tópicamente, sistémicamente, o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para uso en esta invención se encuentra, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable y exenta de pirógenos. Además, la composición puede encapsularse o inyectarse deseablemente en una forma viscosa para suministro al sitio de deterioro del hueso, cartílago o tejido. La administración tópica puede ser adecuada para curación de heridas y reparación de tejidos. Agentes terapéuticamente útiles distintos de una proteína de la invención que pueden incluirse también opcionalmente en la composición como se ha descrito arriba, pueden, alternativa o adicionalmente, administrarse simultánea o secuencialmente con la composición en los métodos de la invención. Preferiblemente, para formación de hueso y/o cartílago, la composición incluiría una matriz capaz de suministrar la composición que contiene la proteína al sitio de deterioro del hueso y/o cartílago, proporcionando una estructura para el hueso y cartílago en desarrollo y susceptible óptimamente de ser reabsorbida en el cuerpo. Dichas matrices pueden estar formadas por materiales que se utilizan actualmente para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz está basada en biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cosmético y propiedades de interfaz. La aplicación particular de las composiciones definirá la formulación apropiada. Matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato tricálcico hidroxiapatito, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como colágeno óseo o dérmico. Matrices adicionales están constituidas por proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatito sinterizado, vidrio biológico, aluminatos, u otros materiales cerámicos. Las matrices pueden estar constituidas por combinaciones de cualquiera de los tipos de material arriba mencionados, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatito o colágeno y fosfato tricálcico. Los materiales biocerámicos pueden estar alterados en composición, por ejemplo en el caso de aluminato-fosfato de calcio y pueden procesarse para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de las partículas, y la biodegradabilidad. Actualmente se prefiere un copolímero 50:50 (peso molar) de ácido láctico y ácido glicólico en la forma de partículas porosas que tienen diámetros comprendidos entre 150 y 800 micrómetros. En algunas aplicaciones, puede ser útil utilizar un agente secuestrante, tal como carboximetil-celulosa o coágulos de sangre autólogos, a fin de prevenir que las composiciones de proteína se disocien de la matriz.

Una familia preferida de agentes secuestrantes es la de materiales celulósicos tales como alquilcelulosas (con inclusión de hidroxialquilcelulosas), que incluyen metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, y carboximetilcelulosa, siendo las más preferidas las sales catiónicas de carboximetilcelulosa (CMC). Otros agentes secuestrantes preferidos incluyen ácido hialurónico, alginato de sodio, poli(etilen-glicol), óxido de polioxietileno, polímero carboxivinílico y poli(alcohol vinílico). La cantidad de agente secuestrante útil en esta invención es 0,5-20% en peso, preferiblemente 1-10% en peso basada en el peso total de la formulación, lo que representa la cantidad necesaria para prevenir la desorción de la proteína de la matriz de polímero y proporcionar una manipulación apropiada de la composición, pero no tan grande que se evite que las células progenitoras infiltran la matriz, proporcionando con ello a la proteína la oportunidad de favorecer la actividad osteogénica de las células progenitoras. En otras composiciones, pueden combinarse las proteínas de la invención con otros agentes beneficiosos para el tratamiento del defecto de hueso y/o cartílago, herida, o tejido en cuestión. Estos agentes incluyen diversos factores de crecimiento tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformantes (TGF- α , y TGF- β), y factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF).

Las composiciones terapéuticas son también valiosas actualmente para aplicaciones veterinarias. Particularmente los animales domésticos y los caballos purasangre, además de los humanos, son pacientes deseados para dicho tratamiento con proteínas de la presente invención. El régimen de dosificación de una composición farmacéutica que contiene una proteína a utilizar en regeneración de tejidos será determinado por el médico que tiene a su cargo el tratamiento considerando diversos factores que modifican la acción de las proteínas, v.g., la cantidad de peso de tejido que se desea formar, el sitio del deterioro, la condición del tejido deteriorado, el tamaño de una herida, el tipo de tejido lesionado (v.g., hueso), la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de

administración y otros factores clínicos. La dosificación puede variar con el tipo de matriz utilizado en la reconstitución y con la inclusión de otras proteínas en la composición farmacéutica. Por ejemplo, la adición de otros factores de crecimiento conocidos, tales como IGF I (factor de crecimiento I semejante a la insulina), a la composición final, puede afectar también a la dosificación. El progreso puede monitorizarse por evaluación periódica del crecimiento y/o la reparación de tejido/hueso, por ejemplo, rayos X, determinaciones histomorfométricas y marcación con tetraciclina.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden utilizarse también para terapia génica. Tales polinucleótidos pueden introducirse *in vivo* o *ex vivo* en células para expresión en un individuo mamífero. Los polinucleótidos de la invención pueden administrarse también por otros métodos conocidos para introducción de ácido nucleico en una célula u organismo (incluyendo, sin limitación, la forma de vectores virales o DNA desnudo). Las células pueden cultivarse también *ex vivo* en presencia de proteínas de la presente invención con objeto de proliferar o producir un efecto deseado sobre o actividad en dichas células. Las células tratadas pueden introducirse luego *in vivo* para propósitos terapéuticos.

7.8. Dosis eficaz

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en la presente invención incluyen composiciones en las cuales los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar su finalidad propuesta. De modo más específico, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad eficaz para prevenir el desarrollo de o aliviar los síntomas existentes del individuo que se esté tratando. La determinación de las cantidades eficaces está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, teniendo en cuenta especialmente la exposición detallada proporcionada en esta memoria. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo de células. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración circulante que incluye el valor CI_{50} como se determina en cultivo de células (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que alcanza una inhibición semi-máxima de la actividad de proteinasa C). Dicha información puede utilizarse para determinar más exactamente las dosis útiles en humanos.

Una dosis terapéuticamente eficaz hace referencia a aquella cantidad del compuesto que da como resultado la mejora de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un paciente. La toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o en animales experimentales, v.g., para la determinación del valor DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y el valor DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación entre DL_{50} y DE_{50} . Se prefieren compuestos que exhiban altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos en cultivo de células y estudios en animales pueden utilizarse en la formulación de una gama de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos está comprendida preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen el valor DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. La formulación, ruta de administración y dosificación exactas pueden seleccionarse por el médico individual teniendo en cuenta el estado del paciente. Véase, v.g., Fingl *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1, p. 1. La cantidad y el intervalo de las dosis pueden ajustarse individualmente a fin de proporcionar niveles en del resto activo plasma que sean suficientes para mantener los efectos inhibidores de la proteinasa C, o la concentración eficaz mínima (MEC). El valor MEC variará para cada compuesto, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*; por ejemplo, la concentración necesaria para alcanzar 50-90% de inhibición de la proteinasa C utilizando los ensayos descritos en esta memoria. Las dosis necesarias para alcanzar el valor MEC dependerán de las características individuales y la ruta de administración. Sin embargo, pueden utilizarse ensayos HPLC o bioensayos a fin de determinar las concentraciones en plasma.

Los intervalos de dosificación pueden determinarse también utilizando el valor MEC. Los compuestos deben administrarse utilizando un régimen que mantenga niveles en plasma superiores al MEC durante el 10-90% del tiempo, con preferencia entre 30 y 90%, y muy preferiblemente entre 50 y 90%. En los casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración en plasma.

Un régimen de dosificación ilustrativo para los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención estará comprendido en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal diariamente, siendo la dosis preferida aproximadamente 0,1 a 25 mg/kg de peso corporal del paciente al día, variando en adultos y niños. La dosificación puede realizarse una sola vez al día, o pueden suministrarse dosis equivalentes a intervalos más largos o más cortos.

La cantidad de composición administrada dependerá, por supuesto, del individuo que se esté tratando, la edad y el peso del individuo, la gravedad de la afección, el modo de administración y el criterio del médico que prescribe el tratamiento.

7.9. Envasado

Las composiciones pueden, en caso deseado, presentarse en un envase o dispositivo de dispensación que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender lámina metálica o de plástico, tal como un envase burbuja. El envase o dispositivo suministrador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. También pueden prepararse composiciones que comprenden

un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéuticamente compatible, disponerse en un recipiente apropiado, y etiquetarse para tratamiento de una afección indicada.

8. Anticuerpos

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo que se fija específicamente al polipéptido de la invención. Tales anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, así como fragmentos de los mismos y formas humanizadas o formas totalmente humanas, tales como las producidas en animales transgénicos. La invención proporciona adicionalmente un hibridoma que produce un anticuerpo de acuerdo con la invención. Los anticuerpos de la invención son útiles para detección y/o purificación de los polipéptidos de la invención.

La proteína de la invención puede utilizarse también para inmunizar animales a fin de obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con la proteína. Tales anticuerpos pueden obtenerse utilizando la proteína entera o fragmentos de la misma como un inmunógeno. Los inmunógenos peptídicos pueden contener adicionalmente un residuo cisteína en el término carboxilo, y están conjugados a un hapteno tal como hemocianina de lapa bocallave (KLH). Métodos para sintetizar tales péptidos se conocen en la técnica, por ejemplo, como en R.P. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963); J.L. Krstenansky, *et al.*, FEBS Lett. 211, 10 (1987). Anticuerpos monoclonales que se fijan a la proteína de la invención pueden ser agentes de diagnóstico útiles para la inmunodetección de la proteína. Los anticuerpos monoclonales neutralizantes que se fijan a la proteína pueden ser también agentes terapéuticos útiles tanto para afecciones asociadas con la proteína como en el tratamiento de algunas formas de cáncer en las que está implicada una expresión anormal de la proteína. En el caso de las células cancerosas o células leucémicas, pueden ser útiles anticuerpos monoclonales neutralizantes contra la proteína en la detección y prevención de la propagación metastásica de las células cancerosas, que puede estar mediada por la proteína. En general, métodos para preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales, así como hibridomas capaces de producir el anticuerpo deseado son bien conocidos en la técnica (Campbell, A.M., *Monoclonal Antibodies Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1984); St. Groth *et al.*, J. Immunol. 35:1-21 (1990); Kohler and Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de las células B humanas (Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), pp. 77-96).

Cualquier animal (ratón, conejo, etc.) que se sabe produce anticuerpos puede inmunizarse con un péptido o polipéptido de la invención. Métodos para inmunización son bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen inyección subcutánea o intraperitoneal del polipéptido. Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad de la proteína codificada por el ORF de la presente invención utilizado para inmunización variará sobre la base del animal que se inmuniza, la antigenicidad del péptido y el sitio de inyección. La proteína que se utiliza como inmunógeno puede modificarse o administrarse en un adyuvante a fin de aumentar la antigenicidad de la proteína. Métodos para aumentar la antigenicidad de una proteína son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin carácter limitante, acoplamiento del antígeno con una proteína heteróloga (tal como globulina o β -galactosidasa) o la inclusión de un adyuvante durante la inmunización.

Para los anticuerpos monoclonales, se extraen células del bazo de los animales inmunizados, se fusionan con células de mieloma, tales como células de mieloma SP2/0-Ag14, y se deja que se conviertan en células de hibridoma productoras de anticuerpos monoclonales. Puede utilizarse uno cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica para identificar la célula de hibridoma que produce un anticuerpo con las características deseadas. Éstos incluyen selección de los hibridomas con un ensayo ELISA, análisis por transferencia Western, o radioinmunoensayo (Lutz *et al.*, *Exp. Cell. Research*. 175:109-124 (1988)).

Los hibridomas que secretan los anticuerpos deseados se clonan y se determinan la clase y subclase utilizando procedimientos conocidos en la técnica (Campbell, A.M., *Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos (1984)). Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente U.S. 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios para las proteínas de la presente invención.

Para los anticuerpos policlonales, el antisero que contiene los anticuerpos se aísla del animal inmunizado y se explora en cuanto a la presencia de anticuerpos con la especificidad deseada utilizando uno de los procedimientos arriba descritos. La presente invención proporciona adicionalmente los anticuerpos arriba descritos en forma marcada de modo detectable. Los anticuerpos pueden marcarse del modo detectable mediante el uso de radioisótopos, marcadores de afinidad (tales como biotina, avidina, etc.), marcadores enzimáticos (tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), marcadores fluorescentes (tales como FITC o rodamina, etc.), átomos paramagnéticos, etc. Los procedimientos para realizar dicha marcación son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, véase (Sternberger, L.A. *et al.*, J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A. *et al.*, *Meth. Enzym.* 62:308 (1979); Engval, E. *et al.*, *Immunol.* 109:129 (1972); Goding, J.W. J. *Immunol. Meth.* 13:215 (1976)).

Los anticuerpos marcados de la presente invención pueden utilizarse para ensayos *in vitro*, *in vivo*, e *in situ* a fin de identificar células o tejidos en los cuales se expresa un fragmento del polipéptido de interés. Los anticuerpos pueden utilizarse también directamente en terapias u otros diagnósticos. La presente invención proporciona adicionalmente los anticuerpos arriba descritos inmovilizados sobre un soporte sólido. Ejemplos de tales soportes sólidos incluyen plásticos tales como policarbonato, carbohidratos complejos tales como agarosa y sefarsa, resinas acrílicas y tales

como bolitas de poliacrilamida y látex. Métodos para acoplamiento de anticuerpos a tales soportes sólidos son bien conocidos en la técnica (Weir, D.M. *et al.*, "Handbook of Experimental Immunology" 4th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, Inglaterra, Capítulo 10 (1986); Jacoby, W.D. *et al.*, Meth. Enzym. 34 Academic Press, N.Y. (1977)). Los anticuerpos inmovilizados de la presente invención pueden utilizarse para ensayos *in vitro*, *in vivo* e *in situ* así como para purificación por inmuno-afinidad de las proteínas de la presente invención.

9. Secuencias legibles por ordenador

En una aplicación de esta realización, una secuencia de nucleótidos de la presente invención puede registrarse en medios legibles por ordenador. Tal como se utiliza en esta memoria, "medios legibles por ordenador" hace referencia a cualquier medio que pueda ser leído y al cual pueda accederse directamente por un ordenador. Medios de este tipo incluyen, pero sin carácter limitante: medios de almacenamiento magnéticos, tales como discos flexibles, medios de almacenamiento en disco duro, y cinta magnética; medios de almacenamiento ópticos tales como CD-ROM; medios de almacenamiento eléctricos tales como RAM o ROM; e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnético/ópticos. Un profesional experto puede apreciar fácilmente de qué modo pueden utilizarse cualquiera de los medios legibles por ordenador conocidos actualmente para crear un producto fabricado que comprenda un medio legible por ordenador que tenga registrada en él una secuencia de nucleótidos de la presente invención. Tal como se utiliza en esta memoria, "registrado" hace referencia a un proceso para almacenar información en un medio legible por ordenador. Un profesional experto puede adoptar fácilmente cualquiera de los medios conocidos actualmente para registrar información en un medio legible por ordenador a fin de generar productos fabricados que comprendan la información de secuencias de los nucleótidos de la presente invención.

Una diversidad de estructuras de almacenamiento de datos están disponibles para un profesional experto a fin de crear un medio legible por ordenador que tenga registrada en el mismo una secuencia de nucleótidos de la presente invención. La elección de la estructura de almacenamiento de datos estará basada generalmente en el medio seleccionado para acceder a la información almacenada. Adicionalmente, pueden utilizarse una diversidad de programas y formatos de procesamiento de datos a fin de almacenar la información de secuencias de nucleótidos de la presente invención en un medio legible por ordenador. La información de secuencias puede representarse en un archivo de texto de tratamiento de textos, formateado en un soporte lógico disponible comercialmente tal como WordPerfect y Microsoft Word, o representarse en la forma de un archivo ASCII, almacenado en una aplicación de base de datos, tal como DB2, Sybase, Oracle, o análogas. Un profesional experto puede adaptar fácilmente cualquier número de formatos de estructuración de procesadores de datos (v.g., archivo de texto o base de datos) con objeto de obtener un medio legible por ordenador que tenga registrada en el mismo la información de secuencias de nucleótidos de la presente invención. Por proporcionar la secuencia de nucleótidos de SEQ ID: 1, 12, 14 o un fragmento representativo de las mismas, o una secuencia de nucleótidos que es idéntica al menos en un 99,9% a SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14 en forma legible por ordenador, un profesional experto puede acceder rutinariamente a la información de secuencias para una diversidad de fines. Está disponible comercialmente soporte lógico por ordenador que permite a un profesional experto acceder a la información de secuencias proporcionada en un medio legible por ordenador. Los ejemplos que siguen demostrarán de qué modo se utiliza un soporte lógico que implementa los algoritmos de búsqueda BLAST (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 315:403-410 (1990)) y BLAZE (Brutlag *et al.*, Comp. Chem. 17:203-207 (1993)) en un sistema Sybase para identificar marcos de lectura abiertos (ORFs) en una secuencia de ácido nucleico. Tales ORFs pueden ser fragmentos codificantes de proteínas y pueden ser útiles en la producción de proteínas comercialmente importantes tales como las enzimas utilizadas en reacciones de fermentación y en la producción de metabolitos comercialmente útiles.

Como se utiliza en esta memoria, "un sistema basado en ordenador" hace referencia al medio de soporte físico, al medio de soporte lógico, y a los medios de almacenamiento de datos utilizados para analizar la información de secuencias de nucleótidos de la presente invención. El medio de soporte físico mínimo de los sistemas basados en el ordenador de la presente invención comprende una unidad central de procesamiento (CPU), medios de entrada, medios de salida, y medios de almacenamiento de datos. Un profesional experto puede apreciar fácilmente que uno cualquiera de los sistemas basados en ordenador disponibles actualmente es adecuado para uso en la presente invención. Como se ha expuesto anteriormente, los temas basados en ordenador de la presente invención comprenden un medio de almacenamiento de datos que tiene almacenada en él una secuencia de nucleótidos de la presente invención y los medios de soporte físico y soporte lógico necesarios para soportar e implementar un medio de búsqueda. Como se utiliza en esta memoria, "medios de almacenamiento de datos" se refiere a una memoria que puede almacenar información de secuencias de los nucleótidos de la presente invención, o un medio de acceso a la memoria que puede dar acceso a productos fabricados que tienen registrada en ellos la información de secuencias de los nucleótidos de la presente invención.

Como se utiliza en esta memoria, "medios de búsqueda" hace referencia a uno o más programas que están implementados en el sistema basado en ordenador para comparar una secuencia diana o un contenido estructural diana con la información de secuencias almacenada en los medios de almacenamiento de datos. Los medios de búsqueda se utilizan para identificar fragmentos o regiones de una secuencia conocida que coinciden con una secuencia diana o motivo diana particular. Existen una diversidad de algoritmos conocidos se han descrito públicamente y una diversidad de soportes lógicos disponibles comercialmente para conducir medios de búsqueda, y pueden utilizarse en los sistemas basados en ordenador de la presente invención. Ejemplos de dicho soporte lógico incluyen, pero sin carácter limitante, MacPattern (EMBL), BLASTN y BLASTA (NPOLYPEPTIDEIA). Un profesional experto puede conocer fácilmente que uno cualquiera de los algoritmos disponibles o la implementación de paquetes de soporte lógico para conducir búsquedas de homología puede adaptarse para uso en los presentes sistemas basados en ordenador. Como se utiliza

en esta memoria, una “secuencia diana” puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de seis o más nucleótidos o dos o más aminoácidos. Un profesional experto puede reconocer fácilmente que cuanto más larga es una secuencia diana, tanto menos probablemente estará presente una secuencia diana como aparición aleatoria en la base de datos. La longitud de secuencia más preferida de una secuencia diana es de aproximadamente 10 a 100 aminoácidos o de aproximadamente 30 a 300 residuos de nucleótidos. Sin embargo, está perfectamente reconocido que las búsquedas para fragmentos comercialmente importantes, tales como fragmentos de secuencias implicados en la expresión génica y el procesamiento de proteínas, pueden ser de longitud más corta.

Como se utiliza en esta memoria, “un motivo estructural diana”, o “motivo diana”, hace referencia a cualquier secuencia o combinación de secuencias seleccionada racionalmente en la cual la o las secuencias se seleccionan sobre la base de una configuración tridimensional que se forma después del plegamiento del motivo diana. Existen una diversidad de motivos diana conocidos en la técnica. Motivos diana proteínicos incluyen, pero sin carácter limitante, sitios de enzimas activas y secuencias señal. Motivos diana de ácido nucleico incluyen, pero sin carácter limitante, secuencias promotoras, estructuras en horquilla y elementos de expresión inducibles (secuencias de fijación de proteínas).

10. Formación de la triple hélice

Adicionalmente, los fragmentos de la presente invención, como se ha descrito en líneas generales, pueden utilizarse para controlar la expresión génica por la formación de la triple hélice o de DNA o RNA antisentido, estando basados ambos métodos en la fijación de una secuencia de polinucleótidos a DNA o RNA. Los polinucleótidos adecuados para uso en estos métodos tienen usualmente una longitud de 20 a 40 bases y están diseñados para ser complementarios a una región del gen implicada en la transcripción (triple hélice - véase Lee *et al.*, Nucl. Acids Res. 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, Science 15241:456 (1988); y Dervan *et al.*, Science 251: 1360 (199)) o al propio mRNA (antisentido - Olmo, J. Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (198)). La formación de la triple hélice da como resultado óptimamente una interrupción de la transcripción de RNA a partir de DNA, en tanto que la hibridación de RNA antisentido bloquea la traducción de una molécula de mRNA en polipéptido. Ambas técnicas han demostrado ser eficaces en sistemas modelo. La información contenida en las secuencias de la presente invención es necesaria para el diseño de un oligonucleótido antisentido o de triple hélice.

11. Ensayos y kits de diagnóstico

La presente invención proporciona adicionalmente métodos para identificar la presencia o expresión de uno de los ORFs de la presente invención, u homólogo del mismo, en una muestra de ensayo, utilizando una sonda de ácido nucleico o los anticuerpos de la presente invención.

En general, los métodos para inyectar un polinucleótido de la invención pueden comprender poner en contacto una muestra con un compuesto que se fija a y forma un complejo con el polinucleótido durante un periodo de tiempo suficiente para formar el complejo, y detectar el complejo, de tal manera que si se detecta un complejo, se detecta un polinucleótido de la invención en la muestra. Tales métodos pueden comprender también poner en contacto una muestra en condiciones de hibridación severa con iniciadores de ácido nucleico que se reasocian a un polinucleótido de la invención en tales condiciones, y amplificar los polinucleótidos reasociados, de tal modo que si se amplifica un polinucleótido, se detecta un polinucleótido de la invención en la muestra.

En general, los métodos para detectar un polipéptido de la invención pueden comprender poner en contacto una muestra con un compuesto que se fija a y forma un complejo con el polipéptido durante un periodo suficiente para formar el complejo, y detectar el complejo, de tal modo que si se detecta un complejo, se detecta un polipéptido de la invención en la muestra. En detalle, tales métodos comprenden incubar una muestra de ensayo con uno o más de los anticuerpos o una o más de las sondas de ácido nucleico de la presente invención y ensayar en cuanto a la fijación de las sondas de ácido nucleico o anticuerpos a componentes existentes en la muestra de ensayo.

Las condiciones para incubar una sonda de ácido nucleico o anticuerpo con una muestra de ensayo varían. Las condiciones de incubación dependen del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección empleados, y del tipo y la naturaleza de la sonda de ácido nucleico o anticuerpo utilizados en el ensayo. Un experto en la técnica reconocerá que uno cualquiera de los formatos de ensayo de hibridación, amplificación o inmunológicos disponibles comúnmente puede adaptarse fácilmente para emplear las sondas de ácido nucleico o anticuerpos de la presente invención. Ejemplos de tales ensayos pueden encontrarse en Chard, T., An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986); Bullock, G.R. *et al.*, Techniques in Immunocytochemistry, Academic Press, Orlando, FL Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985); Tijssen, P., Practice and Theory of immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985). Las muestras de ensayo de la presente invención incluyen células, extractos de proteínas o de membranas celulares, o fluidos biológicos tales como esputos, sangre, suero, plasma, u orina. La muestra de ensayo utilizada en el método arriba descrito variará dependiendo del formato de ensayo, la naturaleza del método de detección y los tejidos, células o extractos utilizados como la muestra a ensayar. Métodos para preparación de extractos de proteínas o extractos de membranas celulares son bien conocidos en la técnica y pueden adaptarse fácilmente con objeto de obtener una muestra que sea compatible con el sistema utilizado.

En otra realización de la presente invención, se proporcionan kits que contienen los reactivos necesarios para realizar los ensayos de la presente invención. Específicamente, la invención proporciona un kit de compartimientos que aloja, en confinamiento estrecho, uno o más recipientes que comprenden: (a) un primer recipiente que comprende una o más de las sondas o anticuerpos de la presente invención; y (b) uno o más recipientes adicionales que comprenden uno o más de los siguientes: reactivos de lavado, reactivos capaces de detectar la presencia de una sonda o anticuerpo fijado(a).

En detalle, un kit de compartimientos incluye cualquier kit en el cual los reactivos están contenidos en recipientes separados. Tales recipientes incluyen pequeños recipientes de vidrio, recipientes de plástico o tiras de plástico o papel. Tales recipientes permiten a una persona transferir eficientemente reactivos desde un compartimiento a otro compartimiento de tal modo que las muestras y reactivos no se contaminen cruzadamente, y los agentes o soluciones de cada recipiente pueden añadirse de manera cuantitativa desde un compartimiento a otro. Dichos recipientes incluirán un recipiente que aceptará la muestra de ensayo, un recipiente que contiene los anticuerpos utilizados en el ensayo, recipientes que contienen reactivos de lavado (tales como solución salina tamponada con fosfato, tampones Tris, etc.), y recipientes que contienen los reactivos utilizados para detectar el anticuerpo o sonda fijado(a). Tipos de reactivos de detección incluyen sondas de ácido nucleico marcadas, anticuerpos secundarios marcados, o como alternativa, si el anticuerpo primario está marcado, los reactivos enzimáticos o reactivos de fijación de anticuerpos que son capaces de reaccionar con el anticuerpo marcado. Una persona con experiencia en la técnica reconocerá fácilmente que las sondas y anticuerpos descritos(as) de la presente invención pueden incorporarse fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

12. Obtención de imágenes médicas

Los nuevos polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención son útiles en la obtención de imágenes médicas, v.g., obtención de imágenes del sitio de infección, inflamación, y otros sitios que tienen moléculas receptoras antagonistas del receptor de Interleuquina-1. Véase, v.g., Kunkel *et al.*, patente U.S. No. 5.413.778. Tales métodos implican fijación química de un agente marcador, administración del polipéptido IL-1 Hy2 marcado a un individuo en un vehículo farmacéuticamente aceptable, y obtención de imágenes del polipéptido IL-1 Hy2 marcado *in vivo* en el sitio diana.

13. Ensayos de Selección

Utilizando las proteínas y polinucleótidos aislados de la invención, la presente invención proporciona adicionalmente métodos de obtención e identificación de agentes que se fijan a un polipéptido codificado por el ORF a partir de un polinucleótido con una secuencia de SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14 a un dominio específico del polipéptido codificado por el ácido nucleico, o a un ácido nucleico con una secuencia de SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14. En detalle, dicho método comprende los pasos de:

(a) poner en contacto una gente con una proteína aislada codificada por un ORF de la presente invención, o ácido nucleico de la invención; y

(b) determinar si el agente se fija a dicha proteína o dicho ácido nucleico.

En general, por tanto, tales métodos para identificación de compuestos que se fijan a un polinucleótido de la invención pueden comprender poner en contacto un compuesto con un polinucleótido de la invención durante un tiempo suficiente para formar un complejo polinucleótido/compuesto, y detectar el complejo, de tal modo que si se detecta un complejo polinucleótido/compuesto, se identifica un compuesto que se fija a un polinucleótido de la invención.

Análogamente, por lo general, por tanto, tales métodos para identificar compuestos que se fijan a un polipéptido de la invención pueden comprender poner en contacto un compuesto con un polipéptido de la invención durante un tiempo suficiente para formar un complejo polipéptido/compuesto, y detectar el complejo, de tal modo que si se detecta un complejo polipéptido/compuesto, se identifica un compuesto que se fija a un polinucleótido de la invención.

Métodos para identificar compuestos que se fijan a un polipéptido de la invención pueden comprender también poner en contacto un compuesto con un polipéptido de la invención en una célula durante un tiempo suficiente para formar un complejo polipéptido/compuesto, en el cual el complejo dirige la expresión de una secuencia de gen receptor en la célula, y detectar el complejo por detección de la expresión de la secuencia del gen informador, de tal manera que si se detecta un complejo polipéptido/compuesto, se identifica un compuesto que se fija a un polipéptido de la invención.

Compuestos identificados por dichos métodos pueden incluir compuestos que modulan la actividad de un polipéptido de la invención (es decir, aumentan o disminuyen su actividad, con relación a la actividad observada en ausencia del compuesto). Alternativamente, los compuestos identificados por tales métodos pueden incluir compuestos que modulan la expresión de un polinucleótido de la invención (es decir, aumentan o disminuyen la expresión con relación a los niveles de expresión observados en ausencia de compuestos). Compuestos, tales como los compuestos identificados por los métodos de la invención, pueden ensayarse utilizando ensayos estándar bien conocidos por los expertos en la técnica por su capacidad para modular la actividad/expresión.

Los agentes seleccionados en el ensayo anterior pueden ser, pero sin carácter limitante, péptidos, carbohidratos, derivados de vitaminas, u otros agentes farmacéuticos. Los agentes pueden seleccionarse y clasificarse aleatoriamente o seleccionarse o diseñarse racionalmente utilizando técnicas de modelización de proteínas.

Para exploración aleatoria, agentes tales como péptidos, carbohidratos, agentes farmacéuticos y análogos se seleccionan aleatoriamente y se ensayan respecto a su capacidad para fijarse a la proteína codificada por el ORF de la presente invención. Como alternativa, los agentes pueden seleccionarse o diseñarse racionalmente. Como se utiliza en esta memoria, se dice que un agente está "seleccionado o diseñado racionalmente" cuando el agente se selecciona sobre la base de la configuración de la proteína particular. Por ejemplo, un experto en la técnica puede adaptar fácilmente los procedimientos disponibles actualmente para generar péptidos, agentes farmacéuticos y análogos capaces de fijarse a una secuencia específica de péptidos con objeto de generar péptidos antipeptídicos diseñados racionalmente, por ejemplo véase Hurby *et al.*, "Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides", In Synthetic Peptides, A User's Guide, W.H. Freeman, NY (1992), pp. 289-307, y Kaspczak *et al.*, Biochemistry 28: 9230-8 (1989), o agentes farmacéuticos, o análogos.

Además de los agentes anteriores, una clase de agentes de la presente invención, como se describe en líneas generales, pueden utilizarse para controlar la expresión génica por fijación a uno de los ORFs o EMFs de la presente invención. Como se ha descrito arriba, tales agentes pueden seleccionarse aleatoriamente o diseñarse/seleccionarse racionalmente. El direccionamiento de ORF o EMF permite a un profesional experto diseñar agentes específicos de secuencia o específicos de elementos, modulando la expresión de un solo ORF o de ORFs múltiples que están basados en el mismo EMF para control de la expresión. Una clase de agentes de fijación de DNA son agentes que contienen residuos básicos que se hibridan o forman una formación de triple hélice por fijación a DNA o RNA. Tales agentes pueden estar basados en el fosfodiéster clásico, la cadena principal de ácido ribonucleico, o pueden ser una diversidad de derivados de sulfhidrilo o polímeros que tienen capacidad de fijación de bases.

Los agentes adecuados para uso en estos métodos contienen usualmente 20 a 40 bases y están diseñados para ser complementarios a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice - véase Lee *et al.*, Nucl. Acids Res. 6:3073 81979); Cooney *et al.*, Science 241:456 (1988); y Dervan *et al.*, Science 251: 1360 (1991)) o al mRNA propiamente dicho (antisentido - Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). La formación de triple hélice da ópticamente como resultado una parada de la transcripción de RNA por el DNA, mientras que la hibridación de RNA antisentido bloquea la traducción de una molécula de mRNA en polipéptido. Se ha demostrado que ambas técnicas son eficaces en sistemas modelo. La información contenida en las secuencias de la presente invención es necesaria para el diseño de un oligonucleótido antisentido o de triple hélice y otros agentes de fijación de DNA. Los agentes que se fijan a una proteína codificada por uno de los ORFs de la presente invención pueden utilizarse como agente de diagnóstico, en el control de infecciones bacterianas por modulación de la actividad de la proteína codificada por el ORF. Los agentes que se fijan a una proteína codificada por uno de los ORFs de la presente invención pueden formularse utilizando técnicas conocidas para generar una composición farmacéutica.

14. Uso de ácidos nucleicos como sondas

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar sondas de hibridación de ácido nucleico específicas de polipéptidos, capaces de hibridarse con secuencias de nucleótidos existentes naturalmente. Las sondas de hibridación de la presente invención pueden derivarse de la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14. Dado que el gen correspondiente se expresa únicamente en un número limitado de tejidos, especialmente tejidos adultos, puede utilizarse una sonda de hibridación derivada de SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14 como indicador de la presencia de RNA del tipo de célula de dicho tejido en una muestra.

Puede emplearse cualquier técnica de hibridación adecuada, tal como, por ejemplo, hibridación *in situ*. La PCR como se describe en las patentes US Núms. 4683195 y 4965188 proporciona usos adicionales para los oligonucleótidos basados en las secuencias de nucleótidos. Dichas sondas utilizadas en PCR pueden ser de origen recombinante, pueden sintetizarse químicamente, o una mezcla de ambos tipos. La sonda comprenderá una secuencia de nucleótidos discreta para la detección de secuencias idénticas o una agrupación degenerada de secuencias posibles para identificación de secuencias genómicas estrechamente afines.

Otros medios para producir sondas de hibridación específicas para ácidos nucleicos incluyen la clonación de secuencias de ácido nucleico en vectores para la producción de sondas de mRNA. Tales vectores son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, pudiendo utilizarse para sinterizar sondas de RNA *in vitro* por medio de la adición de la RNA-polimerasa apropiada tal como RNA-polimerasa T7 o SP6 y los nucleótidos apropiados marcados radiactivamente. Las secuencias de nucleótidos pueden utilizarse para construir sondas de hibridación para mapeado de sus secuencias genómicas respectivas. La secuencia de nucleótidos proporcionada en esta memoria puede mapearse a un cromosoma o regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas de mapeado genético y/o cromosómico bien conocidas. Estas técnicas incluyen hibridación *in situ*, análisis de enlaces contra marcadores cromosómicos conocidos, selección de hibridación con genotecas o preparaciones cromosómicas clasificadas por separación de flujo, específicas para cromosomas conocidos, etcétera. La técnica de hibridación fluorescente *in situ* de extensiones de cromosomas ha sido descrita, entre otros lugares, en Verma *et al* (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York, NY.

La hibridación fluorescente *in situ* de preparaciones cromosómicas y otras técnicas físicas de mapeado de cromosomas pueden correlacionarse con datos de mapas genéticos adicionales. Ejemplos de datos de mapas genéticos pueden encontrarse en la publicación 1994 Genome Issue of Science (265:1981f). La correlación entre la localización de un ácido nucleico en un mapa cromosómico físico y una enfermedad específica (o predisposición para una enfermedad específica) puede ayudar a delimitar la región del DNA asociada con dicha enfermedad genética. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden utilizarse para detectar diferencias en secuencias génicas entre individuos normales, portadores o afectados. La secuencia de nucleótidos puede utilizarse para producir polipéptidos purificados utilizando métodos bien conocidos de la tecnología del DNA recombinante. Entre las muchas publicaciones que proponen métodos para la expresión de genes después que los mismos han sido aislados se encuentra Goeddel (1990) Gene Expression Technology, Methods and Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego. Los polipéptidos pueden expresarse en una diversidad de células hospedadoras, sean procariotas o eucariotas. Las células hospedadoras pueden ser de la misma especie a partir de la cual se aisló una secuencia de nucleótidos de un polipéptido particular, o de una especie diferente. Las ventajas de producir polipéptidos por tecnología de DNA recombinante incluyen la obtención de cantidades adecuadas de la proteína para purificación y la disponibilidad de procedimientos de purificación simplificados.

14.1. Preparación de Chips y Redes de Secuenciación

Un ejemplo básico consiste en la utilización de 6-meros fijados a superficies de 50 micrómetros para dar un chip con dimensiones de 3 x 3 mm que puede combinarse para dar una red de 20 x 20 cm. Otro ejemplo consiste en la utilización de oligonucleótidos 9-meros fijados a una superficie de 10 x 10 micrómetros a fin de crear un chip 9-mero, con dimensiones de 5 x 5 mm. Pueden utilizarse 4000 unidades de tales chips para crear una red de 30 x 30 cm. En una red en la cual están dispuestos 4000 a 16.000 oligochips formando una red cuadrada [sic]. Una placa, o colección de tubos, como se representa también, puede empaquetarse con la red como parte del kit de secuenciación.

Las redes pueden estar separadas físicamente unas de otras o por superficies hidrófobas. Una posible vía para utilizar la separación por tiras hidrófobas consiste en utilizar tecnología tal como el Iso-Grid Microbiology System producido por QA Laboratories, Toronto, Canadá.

Se han utilizado filtros de membrana de rejilla hidrófoba (HGMF) en microbiología analítica de alimentos durante aproximadamente una década, donde los mismos exhiben atracciones singulares de intervalo numérico extendido y recuento automático de colonias. Una rejilla disponible comercialmente es ISO-GRID™/de QA Laboratories Ltd. (Toronto, Canadá) que está constituida por un cuadrado (60 x 60 cm) de polímero de polisulfona (Gelman Tuffryn HT-450, 0,45 µ de tamaño de poro) en el cual está impresa una rejilla negra de tinta hidrófoba constituida por 1600 (40 x 40) celdillas cuadradas. Se han inoculado previamente HGMFs con suspensiones bacterianas por filtración a vacío y se han incubado en los medios diferenciales o selectivos de elección.

Dado que el crecimiento microbiano está confinado a celdas de la rejilla de posición y tamaños conocidos en la membrana, el HGMF funciona más como un aparato MPN que como un filtro convencional de placa o de membrana. Peterkin *et al.* (1987) consignaron que estos HGMFs pueden utilizarse para propagar y almacenar genotecas genómicas cuando se utilizan con un replicador de HGMF. Un instrumento de este tipo replica el crecimiento de cada una de las 1600 celdas de la ISO-GRID y permite hacer muchas copias del HGMF maestro (Peterkin *et al.*, (1987).

Sharpe *et al.* (1989) utilizaron también el HGMF ISO-GRID de QA Laboratories y un contador de HGMF automático (MI-100 Interpreter) y RP-100 Replicator. Los mismos consignaron una técnica para mantenimiento y exploración de muchos cultivos microbianos.

Peterkin y sus colaboradores describieron posteriormente un método para exploración de sondas de DNA utilizando el filtro de rejilla-membrana hidrófobo (Peterkin *et al.*, 1989). Estos autores consignaron métodos para hibridación efectiva de colonias directamente en HGMFs. Previamente, se habían obtenido resultados pobres debido a la baja capacidad de fijación de DNA del polímero epoxisulfona en el cual están impresos los HGMFs. Sin embargo, Peterkin *et al.* (1989) consignaron que la fijación de DNA a la superficie de la membrana se mejoraba tratando el HGMF replicado e incubado con polietilenimina, un polication, antes del contacto con DNA. Aunque este trabajo inicial utiliza fijación celular de DNA, y tiene un objetivo diferente al de la presente invención, la metodología descrita puede adaptarse fácilmente para el Formato 3 SBH.

Con objeto de identificar rápidamente secuencias útiles, Peterkin *et al.* (1989) utilizaron DNA plasmídico radio-marcado procedente de diversos clones y ensayaron su especificidad contra el DNA en los HGMFs preparados. De este modo, el DNA de plásmidos recombinantes se exploró rápidamente por hibridación de colonias contra 100 organismos sobre réplicas de HGMF que pueden prepararse fácil y reproduciblemente.

Manipulación con chips pequeños (2-3 mm), y ejecución paralela de miles de las reacciones [sic]. La solución de la invención consiste en mantener los chips y las sondas en las redes correspondientes. En un ejemplo, se sintetizan chips que contienen 250.000 9-meros en una oblea de silicio en la forma de placas de 8 x 8 mm (15 µM/oligonucleótido, Pease *et al.*, (1994) dispuestas en formato de 8 x 12 (96 chips) con una ranura de 1 mM entre ellos. Las sondas se añaden sea por pipeta multicanal o red de clavijas, una sonda en cada chip. Para registrar la totalidad de 4000 6-meros tienen que utilizarse 42 redes de chips, sea utilizando redes diferentes, o por reutilización de una serie de redes de chips varias veces.

En el caso anterior, utilizando la nomenclatura previa de la solicitud, $F = 9$; $P = 6$; y $F+P = 15$. Los chips pueden tener sondas de fórmula B_xN_n , donde x es un número de bases B especificadas; y n es un número de bases no especificadas, de tal modo que $x = 4$ a 10 y $n = 1$ a 4 . Para conseguir una hibridación más eficiente, y evitar la posible influencia de cualesquiera oligonucleótidos de soporte, las bases especificadas pueden estar rodeadas por bases no especificadas, representándose así por una fórmula tal como $(N)_nB_x(N)_m$.

14.2. Preparación de Oligonucleótidos Fijados a Soportes

Los oligonucleótidos (es decir, pequeños segmentos de ácido nucleico), pueden prepararse fácilmente, por ejemplo por síntesis directa del oligonucleótido por medios químicos, como se practica comúnmente utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automático.

Pueden prepararse oligonucleótidos fijados a soportes por cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica utilizando cualquier soporte adecuado tal como vidrio, poliestireno o Teflón. Una estrategia consiste en aplicar por puntos con precisión oligonucleótidos sintetizados por sintetizadores estándar. La inmovilización puede realizarse utilizando adsorción pasiva (Inouye & Hondo, 1990); utilizando luz ultravioleta (Nagata *et al.*, 1985; Dahlen *et al.*, 1987; Morriey & Collins, 1989) o por fijación covalente de DNA modificado en bases (Keller *et al.*, 1988; 1989); incorporándose todas las referencias específicamente en esta memoria.

Otra estrategia que puede emplearse es el uso de la fuerte interacción biotina-estreptavidina como enlazador. Por ejemplo, Broude *et al.*, (1994) describen el uso de sondas biotiniladas, aunque éstas son sondas dúplex, que se inmovilizan sobre bolitas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Las bolitas recubiertas con estreptavidina pueden adquirirse de Dynal, Oslo. Por supuesto, la misma química de enlaces es aplicable para recubrir cualquier superficie con estreptavidina. Las sondas biotiniladas pueden adquirirse de diversas fuentes, tales como, v.g., Operon Technologies (Alameda, CA).

Nunc Laboratories (Naperville, IL) está vendiendo también material adecuado que podría utilizarse. Nunc Laboratories han desarrollado un método por el cual puede fijarse covalentemente DNA a la superficie de un micropocillo denominada CovaLink NH. CovaLink NH es una superficie de poliestireno injertada con grupos amino secundarios ($>NH$) que sirven como cabezas de puente para acoplamiento covalente adicional. Los módulos CovaLink pueden adquirirse de Nunc Laboratories. Las moléculas de DNA pueden fijarse a CovaLink exclusivamente en el extremo 5' por un enlace fosforamidato, permitiendo la inmovilización de más de 1 picomol de DNA (Rasmussen *et al.*, 1991).

El uso de tiras CovaLink NH para unión covalente de moléculas de DNA en el extremo 5' ha sido descrito (Rasmussen *et al.*, 1991). En esta tecnología, se emplea un enlace fosforamidato (Chu *et al.*, 1983). Esto es beneficioso dado que se prefiere la inmovilización utilizando un solo enlace covalente. El enlace fosforamidato une el DNA a los grupos amino secundarios de CovaLink NH que están posicionados en el extremo de ramas espaciadoras insertadas covalentemente en la superficie de poliestireno a través de una rama espaciadora de 2 nm de longitud. Para unir un oligonucleótido a CovaLink NH por un enlace fosforamidato, el término del oligonucleótido debe tener un grupo fosfato en el extremo 5'. Es quizás posible incluso fijar covalentemente biotina a CovaLink y utilizar luego estreptavidina para unir las sondas.

De modo más específico, el método de la unión incluye disolver DNA en agua (7,5 ng/ μ l) y desnaturalizar durante 10 min a 95°C seguido por enfriamiento en hielo durante 10 min. Se añade luego 1-metilimidazol 0,1 M enfriado en hielo, de pH 7,0 (1-MeIm₇), a una concentración final de 1-MeIm₇ 10 mM. Se dispensa luego una solución de ssDNA en tiras CovaLink NH (75 μ l/pocillo) que se mantienen en hielo.

Se prepara de nuevo la carbodiimida 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 0,2 M, disuelta en 1-MeIm₇ 10 mM, y se añaden 25 μ l por pocillo. Las tiras se incuban durante 5 horas a 50°C. Después de incubación, se lavan las tiras utilizando, v.g., Nunc-Immuno Wash; primeramente se lavan 3 veces los pocillos, se impregnan luego los mismos con solución de lavado durante 5 min, y finalmente se lavan 3 veces (donde la solución de lavado es NaOH 0,4 N, 0,25% SDS calentado a 50°C).

Se contempla que un método adicional adecuado para uso en la presente invención es el descrito en la Solicitud de Patente PCT WO90/03382 (Southern & Maskos), incorporada en esta memoria por referencia. Este método de preparación de un oligonucleótido fijado a un soporte implica fijación de un reactivo de nucleósido 3' a través del grupo fosfato por un enlace covalente fosfodiéster a los grupos hidroxilo alifáticos llevados por el soporte. El oligonucleótido se sintetiza luego en el nucleósido soportado y los grupos protectores se eliminan de la cadena de oligonucleótido sintética en condiciones estándar que no escinden el oligonucleótido del soporte. Reactivos adecuados incluyen nucleósido-fosforamidito y nucleósido-hidrógeno-fosforato.

Puede emplearse una estrategia que utiliza chips para la preparación de sondas de DNA para la preparación de redes de sondas de DNA. Por ejemplo, se puede emplear fotodesprotección direccionable activada por láser en la síntesis química de oligonucleótidos directamente sobre una superficie de vidrio, como ha sido descrito por Fodor *et al.* (1991), que se incorpora en esta memoria por referencia. Pueden inmovilizarse también sondas sobre soportes de nailon como ha sido descrito por Van Ness *et al.* (1991); o enlazarse a Teflón utilizando el método de Duncan & Cavalier (1988); incorporándose específicamente todas las referencias en esta memoria.

La unión de un oligonucleótido a un soporte de nailon, como ha sido descrito por Van Ness *et al.* (1991), requiere la activación de la superficie de nailon por alquilación y activación selectiva de la amina 5' de oligonucleótidos con cloruro cianúrico.

Una vía particular para preparar oligonucleótidos fijados a un soporte consiste en utilizar la síntesis generada por luz descrita por Pease *et al.*, (1994, incorporada en esta memoria por referencia). Estos autores utilizaron técnicas fotolitográficas corrientes para generar redes de sondas oligonucleotídicas inmovilizadas (chips de DNA). Estos métodos, en los cuales se utiliza luz para dirigir la síntesis de sondas oligonucleotídicas en redes de alta densidad miniaturizadas, utilizan *N*-acil-desoxinucleósido-fosforamiditos fotolábiles protegidos en 5', química de enlazadores de superficie y estrategias versátiles de síntesis combinatoria. De esta manera puede generarse una matriz de 256 sondas oligonucleotídicas definidas espacialmente y utilizarse luego en la secuenciación ventajosa de Formato 3, como se describe en esta memoria.

14.3. Preparación de Fragmentos de Ácido Nucleico

Los ácidos nucleicos a secuenciar pueden obtenerse de cualquier fuente apropiada, tal como cDNAs, DNA genómico, DNA cromosómico, bandas de cromosomas microdisseccionadas, inserciones de cósmidos o YAC, y RNA, con inclusión de mRNA sin paso de amplificación alguno. Por ejemplo, Sambrook *et al.*, (1989) describe tres protocolos para el aislamiento de DNA de peso molecular alto a partir de células de mamífero (p9.14-9.23).

Pueden prepararse fragmentos de DNA como clones en M13, vectores de plásmido o lambda y/o prepararse directamente a partir de DNA genómico o cDNA por PCR u otros métodos de amplificación. Pueden prepararse o dispensarse muestras en placas de pocillos múltiples. Aproximadamente 100-1000 ng de muestras de DNA pueden prepararse en 2-500 ml de volumen final.

Los ácidos nucleicos podrían fragmentarse luego por cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica que incluyen, por ejemplo, la utilización de enzimas de restricción como se describe en 9.24-9.28 de Sambrook *et al.* (1989), cizallamiento por ultrasonidos y tratamiento con NaOH.

Es también apropiado el cizallamiento a baja presión, como ha sido descrito por Schrieffer *et al.* (1990, que se incorpora en esta memoria por referencia). En este método, se hacen pasar muestras de DNA a través de una pequeña celdilla de presión Francesa a una diversidad de presiones bajas a intermedias. Un dispositivo de palanca permite la aplicación controlada de presiones bajas a intermedias a la celdilla. Los resultados de estos estudios indican que el cizallamiento a baja presión es una alternativa útil a los métodos de fragmentación de DNA sónicos y enzimáticos.

Se considera que una vía particularmente adecuada para fragmentación de DNA es la que utiliza la endonucleasa de reconocimiento de dos bases, *Cvi*JI, descrita por Fitzgerald *et al.* (1992). Estos autores describieron un enfoque para la fragmentación y el fraccionamiento rápidos de DNA en tamaños particulares que consideraron adecuados para clonación y secuenciación por perdigonada. El autor de la presente invención considera que esto será también particularmente útil para generar fragmentos aleatorios, pero relativamente pequeños, de DNA para uso en la presente tecnología de secuenciación.

La endonucleasa de restricción *Cvi*JI escinde normalmente la secuencia de reconocimiento PuGCPy entre la G y la C para dejar extremos romos. Condiciones de reacción atípicas, que alteran la especificidad de esta enzima (*Cvi*JI**) producen una distribución cuasialeatoria de fragmentos de DNA a partir de la molécula pequeña pUC19 (2688 pares de bases). Fitzgerald *et al.* (1992) evaluaron cuantitativamente la aleatoriedad de esta estrategia de fermentación, utilizando un material de pUC19 digerido con *Cvi*JI** que se fraccionó por tamaños por un método de filtración rápida en gel y se ligó directamente, sin reparación de los extremos, a un vector de clonación M13 Z menos. El análisis de la secuencia de 76 clones demostró que *Cvi*JI** restringe pyCCPy y PuGCPu, además de sitios PuCCPy, y que se acumulan nuevos datos de secuencia a una tasa consistente con la fragmentación aleatoria. Como se consigna en la bibliografía, ventajas de este enfoque comparadas con el tratamiento por ultrasonidos y el fraccionamiento en gel de agarosa incluyen: se requieren menores cantidades de DNA (0,2-0,5 µg en lugar de 2-5 µg); y están implicados un menor número de pasos (no son necesarias preligación, reparación de los extremos, extracción química, o electroforesis en gel de agarosa y elución). Se sugiere también que estas ventajas pueden ser útiles cuando se prepara DNA para secuenciación por el Formato 3.

Cualquiera que sea la manera en la que se obtienen o se preparan los fragmentos de ácido nucleico, es importante desnaturalizar el DNA para dar piezas monocatenarias disponibles para hibridación. Esto se consigue por incubación de la solución de DNA durante 2-5 minutos a 80-90°C. La solución se enfría luego rápidamente a 2°C para prevenir la renaturalización de los fragmentos de DNA antes que los mismos se pongan en contacto con el chip. Los grupos fosfato deben eliminarse también del DNA genómico por métodos conocidos en la técnica.

14.4. Preparación de Redes de DNA

Pueden prepararse redes mediante aplicación por puntos de muestras de DNA sobre un soporte tal como una membrana de nailon. La aplicación por puntos puede realizarse utilizando redes de clavijas metálicas (cuyas posiciones corresponden a una red de pocillos en una placa de microtitulación) que se repite [sic] por transferencia de aproxi-

madamente 20 nl de una solución de DNA a una membrana de nailon. Por impresión offset, se obtiene una densidad de puntos mayor que la densidad de los pocillos. Pueden acomodarse 1 a 25 puntos en 1 mm², dependiendo del tipo de marcador utilizado. Evitando la aplicación por puntos en un número preseleccionado de filas y columnas, pueden formarse subconjuntos separados (subredes). Las muestras en una subred pueden ser el mismo segmento genómico de DNA (o el mismo gen) de individuos diferentes, o pueden ser clones genómicos diferentes solapados. Cada una de las subredes puede representar la aplicación por puntos de réplicas de las mismas muestras. En un ejemplo, un segmento de gen seleccionado puede amplificarse a partir de 64 pacientes. Para cada paciente, el segmento de gen amplificado puede encontrarse en una placa de 96 pocillos (conteniendo la totalidad de los 96 pocillos la misma muestra). Se prepara una placa para cada uno de los 64 pacientes. Utilizando un dispositivo de 96 clavijas, pueden aplicarse por puntos todas las muestras sobre una sola membrana de 8 x 12 cm. Las subredes pueden contener 64 muestras, cada una de un paciente. En el caso en que las 96 subredes son idénticas, la amplitud de un punto puede ser 1 mm² y puede haber un espacio de 1 mm entre las subredes.

Otro enfoque consiste en utilizar membranas o placas (disponibles de NUNC, Naperville, Illinois) que pueden estar divididas por separadores físicos, v.g. una rejilla de plástico moldeada sobre la membrana, siendo la rejilla similar a la clase de membrana aplicada al fondo de placas multipocillo, o tiras hidrófobas. Un separador físico fijado no se prefiere para la formación de imágenes por exposición a filtros planos de almacenamiento de sustancias luminiscentes o películas de rayos X.

14.5. Comparaciones de Secuencias

La identidad y/o semejanza preferidas están diseñadas para dar la coincidencia máxima entre las secuencias ensayadas. Métodos para determinar identidad y semejanza están codificados en programas de ordenador disponibles públicamente que incluyen, pero sin carácter limitante, el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX, y FASTA (Altschul, S.F. *et al.*, J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990)). El programa BLAST X está disponible públicamente del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCB NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). El programa de ordenador preferido es FASTA versión 3, específicamente el programa FASTy dentro del paquete de programas FASTA. Otro algoritmo preferido es el bien conocido algoritmo Smith Waterman que puede utilizarse también para determinar identidad.

Las secuencias pueden compararse con secuencias contenidas en GenBank utilizando un algoritmo de búsqueda desarrollado por Applied Biosystems e incorporado en el Sistema de Análisis de Secuencias INHERITTM 670. En este algoritmo, se utiliza el Lenguaje de Especificación Pattern (desarrollado por TRW Inc., Los Angeles, CA) para determinar regiones de homología. Los tres parámetros que determinan de qué modo se ejecutan las comparaciones de secuencias son tamaño de ventana, desplazamiento de ventana, y tolerancia de error. Utilizando una combinación de estos tres parámetros, pueden buscarse en la base de datos de DNA secuencias que contengan regiones de homología con la secuencia consultada y las secuencias apropiadas pueden registrarse con un valor inicial. Subsiguientemente, estas regiones homólogas se examinan utilizando gráficos de homología de matriz de puntos para distinguir regiones de homología de las coincidencias casuales. Pueden utilizarse las alineaciones Smith-Waterman para presentar los resultados de la búsqueda de homología. Las homologías de secuencia de péptidos y proteínas pueden determinarse utilizando el Sistema de Análisis de Secuencias INHERITTM 670 de una manera similar a la utilizada en las homologías de secuencia de DNA. Se utilizan el Lenguaje de Especificación Pattern y ventanas de parámetros para buscar bases de datos de proteínas respecto a secuencias que contengan regiones de homología que han sido registradas con un valor inicial. Pueden examinarse gráficos de homología de matriz de puntos para distinguir regiones de homología significativa de las coincidencias fortuitas.

Alternativamente, BLAST, que significa Basic Local Alignment Search Tool, se utiliza para buscar alineaciones de secuencia locales (Altschul SF (1993) J Mol Evol 36: 290-300; Altschul, SF *et al.* (1990) J Mol Biol 215: 403-10). BLAST produce alineaciones de secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos para determinar semejanza de secuencias. Debido a la naturaleza local de las alineaciones, BLAST es especialmente útil en la determinación de las coincidencias exactas o en identificación de homólogos. Si bien es ideal para coincidencias que no contienen lagunas, es inadecuado para realizar búsqueda de estilos de motivo. La unidad fundamental de la producción por el algoritmo BLAST es el Par de Segmentos de Registro Alto (HSP). Un HSP está constituido por dos fragmentos de secuencias de longitudes arbitrarias pero iguales cuya alineación es localmente máxima y para las cuales el registro de la invención cumple o supera un umbral de registro de corte establecido por el usuario. El enfoque BLAST consiste en buscar HSPs entre una secuencia de consulta y una secuencia de base de datos, a fin de evaluar la significación estadística de cualesquiera coincidencias encontradas y consignar únicamente aquellas coincidencias que satisfacen el umbral de significación seleccionado por el usuario. El parámetro E establece el umbral estadísticamente significativamente para registrar coincidencias de secuencia en bases de datos. E se interpreta como el límite superior de la frecuencia esperada de aparición fortuita de una HSP (o un conjunto de HSPs) dentro del contexto de la búsqueda entera en la base de datos.

15. Terapia génica

Las mutaciones en los polinucleótidos del gen de la invención pueden dar como resultado la pérdida de la función normal de la proteína codificada. La invención proporciona por tanto terapia génica para restablecer la actividad normal

de los polipéptidos de la invención; o para tratar estados de enfermedad que implican los polipéptidos de la invención. El suministro de un gen funcional que codifique polipéptidos de la invención a células apropiadas se efectúa *ex vivo*, *in situ*, o *in vivo* mediante el uso de vectores, y más particularmente vectores virales (v.g., adenovirus, virus adeno-
 5 asociados, o un retrovirus), o *ex vivo* mediante el uso de métodos físicos de transferencia de DNA (v.g., liposomas o tratamientos químicos). Véase, por ejemplo, Anderson, Nature, suplemento a vol. 392, No. 6679, pp. 25-20 (1998). Para reseñas adicionales de tecnología de terapia génica véase Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); y Miller, Nature, 357: 455-460 (1992). La introducción de uno cualquiera de los nucleótidos de la presente invención o un gen que codifique los polipéptidos de la presente invención puede realizarse
 10 también con sustratos extracromosómicos (expresión transitoria) o cromosomas artificiales (expresión estable). Las células pueden cultivarse también *ex vivo* en presencia de proteínas de la presente invención a fin de proliferar o producir un efecto deseado sobre tales células o actividad en las mismas. Las células tratadas pueden introducirse luego *in vivo* para propósitos terapéuticos. Alternativamente, se contempla que en otros estados de enfermedad humana, la prevención de la expresión de o la inhibición de la actividad de los polipéptidos de la invención era útil en el tratamiento de los estados de enfermedad. Se contempla que podría aplicarse terapia antisentido o terapia génica para
 15 regular negativamente la expresión de los polipéptidos de la invención.

Otros métodos que inhiben la expresión de una proteína incluyen la introducción de moléculas antisentido en los ácidos nucleicos de la presente invención, sus complementos, o sus secuencias de RNA traducidas, por métodos conocidos en la técnica, la retirada de los ácidos nucleicos de la presente invención por ejemplo utilizando métodos de
 20 delección direccionada, o la inserción de un elemento regulador negativo tal como un silenciador, que es específico de tejido. Adicionalmente, los polipéptidos de la presente invención pueden inhibirse por la introducción de moléculas antisentido que se hibridan a ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la presente invención y por la retirada de un gen que codifica los polipéptidos de la presente invención.

La presente invención proporciona adicionalmente células modificadas por ingeniería genética *in vivo* para expresar los polinucleótidos de la invención, en donde tales polinucleótidos se encuentran en asociación operativa con una
 25 secuencia reguladora heteróloga para la célula hospedadora que dirige la expresión de los polinucleótidos en la célula. Estos métodos pueden utilizarse para aumentar o reducir la expresión de los polinucleótidos de la presente invención.

El conocimiento de secuencias de DNA proporcionadas por la invención permite la modificación de las células a fin de hacer posible aumentar, o disminuir, la expresión de polipéptidos endógenos. Las células pueden modificarse (v.g., por recombinación homóloga) a fin de proporcionar expresión incrementada de los polipéptidos mediante reemplazamiento, totalmente o en parte, del promotor existente naturalmente con la totalidad o una parte de un promotor
 30 heterólogo de tal manera que las células expresen la proteína a niveles más altos. El promotor heterólogo se inserta de tal manera que el mismo se enlaza operativamente a las secuencias codificantes de la proteína deseada. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT No. WO 94/12650, la Publicación Internacional PCT No. WO 92/20508, y la Publicación Internacional PCT No. WO 91/09955. Se contempla también que, además del DNA promotor heterólogo, DNA marcador amplificable (v.g., *ada*, *dhfr*, y el gen *CAD* multifuncional que codifica carbamil-fosfato-sintasa, aspartato-trans-carbamilasa, y dihidroorotasa) y/o DNA de intrón junto con el DNA promotor heterólogo. Si está enlazada a la secuencia codificante de la proteína deseada, la amplificación del DNA marcador por métodos de selección
 35 estándar da como resultado co-amplificación de las secuencias codificantes de proteína deseadas en las células.

En otra realización de la presente invención, células y tejidos pueden modificarse por ingeniería genética a fin de expresar un gen endógeno que comprende los polinucleótidos de la invención bajo el control de elementos regula-
 40 dores inducibles, en cuyo caso las secuencias reguladoras del gen endógeno pueden reemplazarse por recombinación homóloga. Como se describe en esta memoria, puede utilizarse direccionamiento de genes para reemplazar una región reguladora existente de un gen con una secuencia reguladora aislada de un gen diferente o una nueva secuencia reguladora sintetizada por métodos de ingeniería genética. Tales secuencias reguladoras pueden estar constituidas por promotores, intensificadores, regiones de fijación de entramado, elementos reguladores negativos, sitios de iniciación
 50 de la transcripción, sitios de fijación de proteínas reguladoras o combinaciones de dichas secuencias. Alternativamente, secuencias que afectan a la estructura o estabilidad del RNA o de la proteína producida pueden reemplazarse, eliminarse, añadirse, o modificarse de algún otro modo por direccionamiento. Estas secuencias incluyen señales de poliadenilación, elementos de estabilidad de mRNA, sitios de remodelación, secuencias conductoras para mejora o modificación de las propiedades de transporte o secreción de la proteína, u otras secuencias que alteran o mejoran la
 55 función o la estabilidad de las moléculas de proteína o RNA.

El suceso de direccionamiento puede ser una simple inserción de la secuencia reguladora, que ponga el gen bajo el control de la nueva secuencia reguladora, v.g., inserción de un nuevo promotor o intensificador o ambos aguas
 60 arriba de un gen. Alternativamente, el suceso de direccionamiento puede ser una simple delección de un elemento regulador, tal como la delección de un elemento regulador negativo específico de tejido. Alternativamente, el suceso de direccionamiento puede reemplazar un elemento existente; por ejemplo, un intensificador específico de tejido puede ser reemplazado por un intensificador que tiene una especificidad de tipo de célula más amplia o diferente que los elementos existentes naturalmente. En este caso, las secuencias existentes naturalmente se delecionan y se añaden secuencias nuevas. En todos los casos, la identificación del suceso de direccionamiento puede facilitarse por el uso de
 65 uno o más genes marcadores seleccionables que son contiguos al DNA de direccionamiento, permitiendo la selección de células en las cuales el DNA exógeno se ha integrado en el genoma de la célula. La identificación del suceso de direccionamiento puede facilitarse también por el uso de uno o más genes marcadores que exhiben la propiedad de selección negativa, de tal manera que el marcador seleccionable negativamente está enlazado al DNA exógeno, pero

configurado de tal manera que el marcador seleccionable negativamente flanquea la secuencia de direccionamiento, y de tal manera que un suceso de recombinación homóloga correcto con secuencias en el genoma de la célula hospedadora no da como resultado la integración estable del marcador seleccionable negativamente. Marcadores útiles para este propósito incluyen el gen de timidina-quinasa (TK) del Virus del herpes símplex o el gen de Xantina-guanina-fosforribosil-transferasa (GPT) bacteriana.

Las técnicas de direccionamiento de genes o activación de genes que pueden utilizarse de acuerdo con este aspecto de la invención se describen más particularmente en la Patente U.S. No. 5.272.071 concedida a Chappel; la Patente U.S. No. 5.578.461 concedida a Sherwin *et al.*, la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US 92/09627 (WO 93/09222) por Selden *et al.*, y la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US 90/06436 (WO 91/06667) por Skoultchi *et al.*, todas las cuales se incorporan por referencia en esta memoria en su totalidad.

16. Animales transgénicos

En métodos preferidos para determinar las funciones biológicas de los polipéptidos de la invención *in vivo*, uno o más genes proporcionados por la invención, o bien se sobre-expresan o se desactivan en la línea germinal de los animales utilizando recombinación homóloga [Capecchi, Science 244: 1288-1292 (1989)]. Los animales en los cuales se sobre-expresa el gen, bajo el control regulador de elementos promotores exógenos o endógenos, se conocen como animales transgénicos. Los animales en los cuales un gen endógeno se ha desactivado por recombinación homóloga se conocen como animales "knockout". Los animales knock-out, preferiblemente mamíferos no humanos, pueden prepararse como se describe en la Patente U.S. No. 5.557.032, que se incorpora en esta memoria por referencia. Los animales transgénicos son útiles para determinar los papeles que los polipéptidos de la invención juegan en los procesos biológicos, y preferiblemente en estados de enfermedad. Los animales transgénicos son útiles como sistemas modelo para identificar compuestos que modulan el metabolismo de los lípidos. Los animales transgénicos, preferiblemente mamíferos no humanos, se producen utilizando métodos como los descritos en la Patente U.S. No. 5.489.743 y la publicación PCT No. WO 94/28122, que se incorpora en esta memoria por referencia.

Pueden prepararse animales transgénicos en los cuales la totalidad o una parte de un polinucleótido del promotor de la invención está activada o desactivada para alterar el nivel de expresión de los polipéptidos de la invención. La desactivación puede llevarse a cabo utilizando métodos de recombinación homóloga descritos arriba. La activación puede realizarse por complementación o incluso reemplazamiento del promotor homólogo a fin de proporcionar una expresión incrementada de la proteína. El promotor homólogo puede complementarse por inserción de uno o más elementos intensificadores heterólogos que se sabe confieren activación promotora en un tejido particular.

La presente invención se ilustra en los ejemplos siguientes. Después de consideración de la presente exposición, una persona con experiencia en la técnica apreciará que pueden hacerse muchas otras realizaciones y variaciones en el alcance de la presente invención. De acuerdo con ello, se pretende que los aspectos más amplios de la presente invención no se limiten a la descripción de los ejemplos que siguen. El Ejemplo 1 aborda la clonación de cDNA de IL-1 Hy2, el Ejemplo 2 aborda la identificación de polimorfismos, el Ejemplo 3 aborda la expresión tisular de mRNA de IL-1 Hy2 y polipéptido, el Ejemplo 4 aborda la localización cromosómica de DNA de IL-1 Hy2, el Ejemplo 5 aborda la identificación de una región de fijación de receptores de IL-1 y fijación al receptor de IL-1, el Ejemplo 6 aborda la expresión de polipéptidos IL-1 Hy2 en *E. coli*, el Ejemplo 7 aborda la confirmación de las actividades biológicas de IL-1 Hy2 por evaluación de su efecto modulador sobre las actividades relativas de IL-1 y trastornos relacionados con IL-1, el Ejemplo 8 aborda la secuenciación del clon BAC genómico humano de IL-1 Hy2, el Ejemplo 9 aborda la secuenciación del clon BAC genómico de ratón de IL-1 Hy2, el Ejemplo 10 aborda la inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β por IL-1 Hy2, el Ejemplo 11 aborda la inhibición de la actividad de IL-18 por IL-1 Hy2, el Ejemplo 12 aborda la fijación de IL-1 Hy2 al receptor de IL-1, y el Ejemplo 13 aborda la expresión de IL-1 Hy2 en células de mamífero.

Ejemplo 1

Clonación de cDNA de IL-1 Hy2

Se obtuvieron una pluralidad de ácidos nucleicos nuevos a partir de la genoteca de cDNA FSK001 (preparada a partir de mRNA de tejido de piel humana fetal adquirido de Invitrogen, San Diego, CA) utilizando PCR, análisis de firma de secuencias SBH y técnicas de secuenciación Sanger estándar. Las inserciones de la genoteca se amplificaron con PCR utilizando iniciadores específicos para secuencias vectoras de pSport1 (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y.) que flanquean las inserciones. Estas muestras se aplicaron por puntos sobre membranas de nailon y se interrogaron con sondas oligonucleotídicas para dar firmas de secuencia. Los clones se agruparon en grupos de secuencias similares o idénticas, y se seleccionaron clones representativos simples de cada grupo para secuenciación en gel. La secuencia 5' de las inserciones amplificadas se dedujo luego utilizando el iniciador de secuenciación inversa M13 en un protocolo de secuenciación Sanger típico. Los productos PCR se purificaron y sometieron a secuenciación de ciclos terminadores con tinte fluorescente. La secuenciación en gel en un solo paso se realizó utilizando un secuenciador Applied Biosystems (ABI) 377. Se identificó una sola inserción de cDNA por secuenciación de varios centenares de pares de bases (aproximadamente 1-386 de SEQ ID NO: 1) como secuencia nueva relacionada con IL-1Ra que no había sido comunicada previamente en bases de datos públicas. La secuencia restante de SEQ ID NO: 1 se obtuvo por secuenciación ulterior de la inserción de cDNA entera del mismo clon; la secuencia se confirmó en parte por secuenciación de

productos PCR 5'RACE de genotecas de cDNA de piel fetal y cerebro adulto. Esta secuencia y el clon se designaron por el nombre de código CG149 y el nombre de clon RTA00003379F.h.20 (redesignada posteriormente pIL-1 Hy2 y depositada en la ATCC el 21 de mayo de 1999 bajo el No. de Acceso PTA-96), y el polipéptido codificado se designó IL-1Ra-Hy2 (redesignado más tarde IL-1 Hy2).

Ejemplo 2

Identificación de polimorfismos

La secuenciación de cierto número de productos PCR procedentes de diversas genotecas de cDNA reveló varios polimorfismos potenciales, que se describen con referencia a la numeración de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

En el nucleótido 125 de SEQ ID NO: 1, la "T" puede reemplazarse con una "C", dando como resultado un cambio de codón de "GAT" a "GAC" (una mutación silenciosa, dado que ambos codones codifican el aminoácido Asp). En el nucleótido 184 de SEQ ID NO: 1, la "C" puede reemplazarse como una "T", dando como resultado un cambio de codón de "ACA" (que codifica Thr) a "ATA" (que codifica Ile). En el nucleótido 205 de SEQ ID NO: 1, la "A" puede reemplazarse con una "C", dando como resultado un cambio de codón desde "GAC" (Asp) a "GCC" (Ala). Los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden reflejarse en diferencias en las actividades biológicas de las moléculas, lo cual puede confirmarse por prueba en cualquiera de los ensayos de actividad descritos en esta memoria.

Ejemplo 3

Estudio de la Expresión Tisular

3.1. Hibridación *in situ*

La expresión génica de IL-1 Hy2 humana se realizó utilizando una técnica semi-cuantitativa basada en PCR. Un panel de genotecas de cDNA derivadas de tejido humano (de Clontech e Invitrogen) se seleccionó con iniciadores específicos de IL-1 Hy2 [5'-CCGCACCAAGGTCCCCATTTTC-3' (nucleótidos 206-227), SEQ ID NO: 10 y 3'-GAGCCACAGGATAACCCAGG-5' (nucleótidos 728-707), SEQ ID NO: 11] para examinar la expresión en mRNA de IL-1 Hy2 en los tejidos y tipos de células humanos siguientes: corazón, riñón, pulmón, placenta, hígado, ovario, ganglios linfáticos, bazo, testículos, timo, hígado fetal, piel fetal, bazo fetal y macrófagos. Los ensayos PCR (94°C durante 30 s, 58°C durante 30 s, 72°C durante 30 s, durante 30 ciclos) se realizaron con 20 ng de cDNA derivado de tejidos y líneas de células humanas(as) y 10 picomoles de los iniciadores específicos del gen de IL-1 Hy2. El producto PCR de 522 pb se identificó por electroforesis en gel. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa, se transfirieron y se enlazaron químicamente a un filtro de nailon. El filtro de hibridó luego con una sonda bicatenaria marcada radiactivamente (³³Palfa-dCTP) generada a partir de la secuencia de longitud total SEQ ID NO: 1 utilizando un método de iniciación aleatoria con polimerasa Klenow. Los filtros se lavaron (severidad alta) y se utilizaron para impresionar una pantalla de obtención de imágenes por luminiscencia durante varias horas. Las bandas indicaban la presencia de secuencias SEQ ID NO: 1 que incluían cDNA en una genoteca específica, y por tanto la expresión de mRNA en el tipo de célula o tejido correspondiente.

Se observó que mRNA de IL-1 Hy2 se expresaba en riñón, bazo, y piel fetal. Análogamente a IL-1 Hy2, IL-1Ra e IL-1 Hy1 mRNA se expresan también en los tejidos de piel fetal humana, lo que sugiere que esta familia de proteínas puede compartir algunas funciones fisiológicas.

Se realizaron estudios adicionales para localizar la expresión de mRNA de IL-1 Hy2 como se describe por D'Andrea *et al.* (J. Sur. Pat., 1: 191-203, 1995). Se detectó mRNA de IL-1 Hy2 en secciones seriadas de amígdalas y riñón humanos normales por sondas marcadas con DIG constituidas por los nucleótidos 396 a 568 de SEQ ID NO: 14. Se hibridaron los portaobjetos con las sondas de IL-1Hy2 durante 2 horas a 54°C. Subsiguientemente, se lavaron los portaobjetos con 2x SSC a la temperatura ambiente y se lavaron luego con 0,1x SSC a 54°C. Después de los lavados severos, se utilizó 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/nitro-azul-tetrazolio (BCIP/NBT) como cromógeno. Para detección visual, los portaobjetos se sometieron a contra-tinción con eosina y se examinaron bajo un microscopio óptico.

3.2 Inmunohistoquímica

Las secciones seriadas de amígdala normal se tiñeron también con anticuerpos policlonales específicos para IL-1 Hy2 preparados por inmunización de conejos con el péptido IL-1 Hy2: 43-56 de SEQ ID NO: 2 utilizando métodos convencionales [véase, v.g. Harlow *et al.*, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1998)] y suero preinmune de control procedente de los conejos inmunizados. Adicionalmente, se tiñeron los portaobjetos con anticuerpos para CD20, Ki67, CD3, CD1a, CD14, CD68 y LN5. La fijación de anticuerpos se detectó con anticuerpos secundarios biotinilados y estreptavidina-HRP. Se utilizó AEC Haishen como el cromógeno para detección y los portaobjetos se sometieron a contra-tinción con hematoxilina. La expresión de IL-1 Hy2 se detectó visualmente bajo un microscopio óptico.

Se detectó mRNA de IL-1 Hy2 en los túbulos distales del riñón, los glomérulos del riñón, los epitelios de la cápsula de Bowman, los epitelios capilares, y un subconjunto de glóbulos blancos de la sangre dentro de los vasos sanguíneos. En la amígdala, se detectaron mRNA y proteína de IL-1 Hy2 en un subconjunto de células B (positivas a CD20) en el centro germinal, la mayoría de las cuales proliferaban de acuerdo con la tinción con Ki67. Se expresaba también IL-1 Hy2 en el epitelio escamoso basal de la piel que rodeaba la amígdala.

Ejemplo 4

10 *Estudio de Localización Cromosómica*

Las tecnologías de mapeado de cromosomas permiten a los investigadores enlazar los genes con regiones específicas de cromosomas. El mapeado cromosómico se realizó utilizando el panel de mapeado híbrido de células somáticas humanas/de roedor NIGMS, como ha sido descrito por Drwina, H.R. *et al.*, Genomics, 16, 311-314, 1993 (panel de mapeado híbrido de células somáticas humano/roedor #2, adquirido del Coriell Institute for Medical Research, Camden, New Jersey). Se utilizaron como molde 60 ng de DNA de cada muestra en el panel, y se utilizaron 10 picomoles de los mismos oligonucleótidos específicos del gen de IL-1 Hy2 utilizados en el Ejemplo 3 como iniciadores en un ensayo PCR (94°C durante 30 s, 58°C durante 30 s, 72°C durante 30 s, durante 30 ciclos). Los productos PCR se analizaron por electroforesis en gel. El producto PCR genómico de 800 pb se detectó únicamente en el DNA híbrido de células somáticas humano/roedor que contenían el cromosoma humano 2.

Los miembros de las familias de genes están enlazados a menudo a regiones específicas de cromosomas debido a sucesos de duplicación de genes intracromosómicos que dan lugar a familias de genes de miembros múltiples durante el proceso de evolución. La familia de genes de Interleuquina-1 ha sido mapeada al cromosoma 2. Más específicamente, se ha encontrado que la totalidad de los genes de interleuquina 1 (IL-1 α , IL-1 β) y los receptores (IL-1 RI e IL-1 RII), así como el antagonista receptor IL-1ra y la IL-1 Hy2 recién identificado están situados en el cromosoma 2. La identificación de secuencias IL-1 Hy2 en esta misma región establece su enlace físico al locus de Interleuquina-1 que indica que IL-1 Hy2 funciona como un modulador de la respuesta inflamatoria.

30 Ejemplo 5

Dominio de Fijación del Receptor de Interleuquina-1 y Ensayo del Receptor de Interleuquina-1

La región de fijación del receptor tanto de IL-1 β como IL-1 Ra se ha mapeado a una región de 18 aminoácidos en la mitad del terminal carboxi de las proteínas (es decir, los residuos 88-105 de IL-1 β) por mutagénesis orientada y estudios de modificación de proteínas.

IL-1 y2 y fragmentos de la misma que incluyen una región de fijación de receptores son útiles como reactivos para identificar células y tejidos que expresan receptores de IL-1. El gen de fijación de receptores de IL-1 descrito en Hannum *et al.* Nature, 343: 336-340 (1990) puede utilizarse. Resumidamente, se preparan SEQ ID NOS: 2, 4 ó 13 recombinantes altamente radiactivas por cultivo de *E. coli* que expresa cualquiera de SEQ ID NOS: 2, 4 ó 13 en medio M9 que contiene [³⁵S]-sulfato y purificación del polipéptido recombinante marcado por cromatografía en una columna Mono-S. El polipéptido marcado se incubaba con las células o tejido en condiciones estándar de ensayo de fijación de IL-1, y fijación de [³⁵S]. Una fijación significativa de [³⁵S] indica la presencia de receptores de IL-1.

Ejemplo 6

50 *Expresión de IL-1 Hy2 en E. coli*

SEQ ID NOS: 1, 12 ó 14 se expresan en *E. coli* por subclonación de la región codificante entera en un vector de expresión procariota. El vector de expresión (pQE16) utilizado pertenece al sistema de expresión de proteínas procariotas QIAExpression (Qiagen). Las características de este vector que lo hacen útil para expresión de proteínas incluyen: un promotor eficiente (fago T5) para impulsar la transcripción; control de la expresión proporcionado por el sistema operador lac, que puede ser inducido por adición de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), y un marcador His₆ codificado. El último es un tramo de 6 residuos del aminoácido histidina que pueden fijarse muy fuertemente a un átomo de níquel. El vector puede utilizarse para expresar una proteína recombinante con un marcador His₆ fusionado a su término carboxilo, que permite una purificación rápida y eficiente utilizando columnas de afinidad acopladas a Ni.

Se utiliza PCR para amplificar la región codificante que se liga luego en el vector pQE16 digerido. El producto de ligación se transforma por electroporación en células de *E. coli* electrocompetentes (cepa M15[pREP4] de Qiagen), y las células transformadas se extienden sobre placas que contienen ampicilina. Se seleccionan colonias respecto a la inserción correcta en la orientación apropiada utilizando una reacción PCR que emplea un iniciador específico de gen y un iniciador específico de vector. Los positivos se secuencian luego para asegurar orientación y secuencia correctas. Para expresar IL-1 Hy2, se inocula una colonia que contiene un clon recombinante correcto en caldo L que contiene 100 μ g/ml de ampicilina, 25 μ g/ml de kanamicina, y se deja que el cultivo crezca durante una noche a 37°C. El cultivo

ES 2 300 266 T3

saturado se diluye luego 20 veces en el mismo medio y se deja crecer hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,5. En este punto, se añade IPTG hasta una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de proteína. El cultivo se deja crecer durante 5 horas más, y después de ello se cosechan las células por centrifugación a 3000 x g durante 15 minutos.

El sedimento resultante se somete a lisis utilizando un detergente suave no iónico en Tris HCl 20 mM (pH 7,5) (reactivo B-PER™, de Pierce), o por sonicación hasta que la suspensión de células turbia se vuelve translúcida. El lisado obtenido se purifica ulteriormente utilizando una columna que contiene níquel (columna rotativa Ni-NTA, de Qiagen) en condiciones no desnaturalizantes. Resumidamente, el lisado se lleva hasta NaCl 300 mM e imidazol 10 mM y se centrifuga a 700 x g mediante la columna rotativa para permitir que la proteína recombinante marcada con His se fije a la columna de níquel. La columna se lava luego dos veces con Tampón de Lavado (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM; imidazol 20 mM) y se eluye con Tampón de Elución (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM; imidazol 250 mM). Todos los procedimientos anteriores se realizan a 4°C. La presencia de una proteína purificada del tamaño predicho se confirma con SDS-PAGE.

Ejemplo 7

Evaluación de las Actividades de IL-1 Hy2 In vitro e In Vivo

7.1. Fijación al Receptor de Interleuquina-1

Se lleva a cabo un ensayo de fijación de células para demostrar que IL-1 Hy2 se fija al receptor de Interleuquina-1. Resumidamente, se analiza la fijación a las células de la proteína recombinante con y sin la presencia de cantidades 100 veces mayores de ligando sin marcar de Interleuquina-1 beta (IL-1β) utilizando anticuerpos fluorescentes específicos para un polipéptido IL-1 Hy2 (v.g. específicos para un marcador rápido existente en el polipéptido recombinante) en el clasificador de células activadas fluorescentes (FACS). En cada reacción, se resuspenden 10⁶ células NHDF (fibroblastos dérmicos humados normales) en 100 μl de tampón FACS (PBS destilado, 3% de suero de ternero y 0,01% de azida). La fijación de células se realiza por adición de IL-1 Hy2 recombinante 5 nM en 100 μl de suspensión de células y como competición en una sola reacción se añaden también 500 nM de IL-1 β recombinante. Las células se incuban en hielo durante 1 hora. Se reducen las células a un pelet, se añaden 200 μl de BS3 (reticulador) 0,2 mM, y se dejan las células en hielo durante 30 minutos. A continuación, se añaden 10 μl de Tris 1M de pH 7,5, y las células se incuban durante 15 minutos en hielo. Se reducen las células a un pelet, se lavan una sola vez en tampón FACS, se resuspenden en un volumen de 100 μl de tampón FACS, se añaden 2 ml de anticuerpo primario (anticuerpo anti-marcar rápido, 1 mg/ml), y se incuban en hielo durante 30 minutos. Las células se reducen a un pelet, se lavan con tampón FACS, y se resuspenden en tampón FACS (volumen, 100 μl). Se añade el anticuerpo secundario (conjugado a ficoeritrina), 2 μl de Ig anti-ratón (1 mg/ml) y las células se incuban durante 30 minutos en hielo. Se reducen las células de nuevo a un pelet, se lavan dos veces con tampón FACS, se resuspenden en 0,5 ml de tampón FACS y se analizan en FACS. Es de esperar que se observe un cambio en la fluorescencia en las células tratadas con la IL-1 Hy2 recombinante marcada. Se demuestra que esta fijación es específica si la misma compete con la proteína IL-1 β sin marcar. Los resultados indicarán la fijación de IL-1 Hy2 al receptor de IL-1.

7.2. Actividad Antagonista de IL-1

Se determina la actividad antagonista de IL-1 utilizando un ensayo basado en prostaglandina E2 (PGE₂), como sigue. Las células se extienden en placas a razón de 20.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, 24 horas antes del ensayo. Se tratan luego las células con 25 pg/ml de IL-1β humana recombinante durante 7 horas. Para evaluar la inhibición de la liberación de PGE₂ estimulada por IL-1β por IL-1 Hy2 en comparación con IL-1 Ra, se pretratan las células con diversas cantidades de IL-1y2 o IL-1Ra durante 2 horas antes de la adición de IL-1β. Se recogen luego los sobrenadantes y se separan los residuos celulares por centrifugación. Las cantidades de PGE₂ en los sobrenadantes se determinan por ELISA utilizando el sistema de ensayo de PGE₂ (R&D Systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Este ensayo se llevó a cabo con IL-1 Hy2 como sigue. Para estimular la producción de PGE₂ inducida por IL-1β, se extendieron fibroblastos humanos (CCD 1098; No. de acceso CRL 2127) a razón de 20.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, 24 horas antes del ensayo. Las células se lavaron luego una sola vez con medio reciente y se incubaron durante 16 horas con medio reciente que contenía 1 ng/ml de IL-1 humana recombinante. Para evaluar la inhibición de la liberación de PGE₂ estimulada por IL-1β por IL-1 Hy2 en comparación con IL-1Ra, se trataron las células con diversas concentraciones de IL-2 Hy2 o IL-1Ra junto con IL-1β. Después de la estimulación durante 16 horas a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂, las placas de cultivo se centrifugaron durante 5 minutos a 4.000 rpm para separar los residuos celulares. Las cantidades de PGE₂ se determinaron ensayando 100 μl de sobrenadante con el kit de ensayo ELISA de PGE₂ (R&D Systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

La adición de IL-1 Hy2 a los cultivos estimulados por IL-1β dio como resultado una disminución parcial en la producción de PGE₂, dependiente de la dosis. A una concentración de exceso de 1000 veces, IL-1 Hy2 inhibía la producción de PGE₂ inducida por IL-1β en un 40-60%. Como control y medio de comparación, IL-1 Ra inhibía por completo la producción de PGE₂ a una concentración de exceso de 100 veces. El hecho de que IL-1 Hy2 inhibe sólo parcialmente la actividad de IL-1β puede ser beneficioso en el tratamiento de estados de enfermedad inflamatorios

debido a menores efectos secundarios. Es posible que preparaciones más purificadas de IL-1 Hy1 puedan exhibir una inhibición completa en este ensayo.

7.3. Inhibición de la Proliferación Celular Inducida por Interleuquina-1

Se obtienen células T murinas D10 de la American Type Culture Collection (Rockville, Md.). Las células se mantienen en medio de Eagle modificado de Dulbecco y medio F12 de Ham (1:1) que contiene tampón HEPES 10 mM (pH 7,4) y 10% de suero bovino fetal. Todos los reactivos de cultivo de tejidos contenían menos de 0,25 ng/ml de endotoxina como se determinó por el ensayo de amebocitos de limulus.

Las células D10 murinas, una línea de células T dependiente de Interleuquina-1, se utilizan para medir la actividad mitógena de Interleuquina-1. La proliferación de células en presencia de Interleuquina-1 con y sin los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención se evalúa por incorporación de (³H)-timidina como ha sido descrito previamente (Bakouche, O., *et al.*, J. Immunol. 138: 4249-4255, 1987). En una realización preferida, los antagonistas y agonistas de los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención se identifican en este ensayo por adición de los compuestos candidato con los polipéptidos de Interleuquina-1 e IL-1 Hy2 de la invención y medición del cambio en la proliferación celular causado por el compuesto candidato.

7.4. Inhibición de la Citotoxicidad Celular Inducida por Interleuquina-1

La inhibición de la citotoxicidad inducida por Interleuquina-1 se estudia utilizando una línea de células apropiada, tal como, por ejemplo, células tumorales A375 extendidas a una densidad de 6.000 células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de fijación durante una noche, se añade Interleuquina-1 (3-300 ng/ml) en presencia o ausencia de NAA o NMA. Después que las células se han incubado durante 3 días, se añade (³H)-timidina (1 µCi por pocillo) durante 2 horas más. Las células se cosechan sobre discos de fibra de vidrio (PHD Cell Harvested; Cambridge Technology, Inc. Watertown, Ma.). Los discos se secan al aire durante una noche, y se determina la radiactividad con un Contador de Centelleo modelo 1900TR (Packard Instruments Division, Downers Grove, Ill.).

7.5. Inducción de la Síntesis de Nitrito en Células Musculares Lisas

Se cultivan células musculares lisas aórticas por explante de segmentos de la capa media de aortas procedentes de ratas macho adultas Fischer 344. Se extirpan asépticamente las aortas y se liberan de células adventicias y endoteliales por rascado de ambas superficies luminal y abluminal. Se deja que se fijen los fragmentos centrales a matraces de cultivo de tejidos Primaria de 25 cm² (Becton-Dickinson, Lincoln Park, N.J.) que se mantienen húmedos con el medio de cultivo hasta que emergen las células. Los cultivos se alimentan dos veces por semana con medio 199 que contiene 10% de suero de bovino fetal, tampón HEPES 25 mM (pH 7,4), L-glutamina 2 mM, 40 µg/ml de suplemento de crecimiento de células endoteliales (Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Mass.) y 10 µg/ml de gentamicina (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y.). Cuando los cultivos primarios se hacen confluentes, se someten a pasos por tripsinización, y se desechan los explantes. Para estos estudios, se siembran células procedentes de los pasos 12-14 a razón de 20.000 por pocillo en placas de 96 pocillos y se utilizan en la confluencia (60.000-80.000 células por pocillo). Las células exhiben el fenotipo clásico de las células musculares lisas con morfología de colinas y valles, y se tiñen positivamente para la actina de la musculatura lisa.

Se incuban las células musculares lisas aórticas de rata con medio RPMI-1640 que contiene 10% de suero de ternero, tampón HEPES 25 mM, de pH 7,4), glutamina 2 mM, 80 U/ml de penicilina, 80 µg/ml de estreptomycin, 2 µg/ml de fungizona, e Interleuquina-1, IFN-gamma, y diversos inhibidores. En los momentos deseados, se mide la concentración de nitrito en el medio de cultivo utilizando el ensayo estándar Griess (Green, L., *et al.*, Anal. Biochem. 126: 131-138, 1982) adaptado a un lector de placas de microtitulación de 96 pocillos (Gross, S.S. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 178: 823-829, 1991). Así, se añaden 100 µl del reactivo de Griess (ácido sulfanílico al 0,5%, naftalenodiamina al 0,05%, y ácido fosfórico al 2,5%) a un volumen igual de medio de cultivo, y se mide la DO₅₅₀ que está relacionada con la concentración de nitrito por referencia a una curva estándar. El ruido de fondo de OD₅₅₀ del medio incubado en ausencia de células se resta de los valores experimentales.

Se incuban células musculares lisas aórticas de rata con medio RPMI-1640 que contiene suero de ternero al 10%, tampón HEPES 25 mM (pH 7,4), glutamina 2 mM, 80 µg/ml de penicilina, 80 µg/ml de estreptomycin, 2 µg/ml de fungizona, 30 µg/ml de lipopolisacárido (*Escherichia coli* 0111:B4), y 50 U/ml de IFN-γ. Se cosechan las células al cabo de 24 horas, y se prepara citosol (Gross, S.S., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 178: 823-829, 1991). Se ensaya la actividad citosólica de NO-sintasa por el método Fe²⁺-mioglobina (Gross, S.S., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 178: 823-829, 1991).

7.6. Alorreactividad Determinada por el Aumento de Peso de los Ganglios Linfáticos

Se realizan experimentos para demostrar que la administración sistémica de los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención suprime una respuesta inmunitaria localizada, dependiente de las células T al aloantígeno presentado por células alogénicas. Se inyectan ratones en la planta del pie con células de bazo alogénicas irradiadas. Se inyectan luego los ratones en la pata contralateral con células de bazo singénicas irradiadas. Se produce una respuesta alorreactiva (marcada por proliferación de linfocitos e inflamación) en la pata que recibe las células alogénicas, que puede medirse

por determinación del aumento en tamaño y peso del ganglio linfático poplíteo que drena el sitio de deposición de antígeno con relación a controles o por aumento en celularidad.

En este experimento se utilizan ratones BALB/c de 8-12 semanas específicos y exentos de patógenos (H-2^d) y C57BL/6 (H-2^b) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me.). Se dividen 48 ratones BALB/c en 16 grupos, cada uno de los cuales comprende 3 ratones (a no ser que se indique otra cosa). Cada grupo de ratones recibe un modo de tratamiento diferente. El día 0, se inyectan intracutáneamente las patas izquierdas de todos los ratones con 10⁷ células de bazo alogénicas irradiadas (2500 R), de ratones C57BL/6 en 50 µl de RPMI-1640 (Gibco) como antígeno y se inyectan las patas derechas contralaterales de los mismos ratones con 10⁷ células de bazo singénicas irradiadas (2500 R), de ratones BALB/c.

Siete días después de la administración del antígeno, se sacrifican los ratones y se extirpan los ganglios linfáticos poplíteos (PLN) de las fosas poplíteas derecha e izquierda por disección quirúrgica. Se pesan los ganglios linfáticos y los resultados se expresan como la diferencia (DELTA) de peso (mg) del ganglio linfático que drena el sitio de inyección de las células alogénicas y el peso del ganglio que drena el sitio de inyección de las células singénicas. Los ganglios linfáticos que drenan el sitio de inyección de las células singénicas pesaban aproximadamente 1 mg, con indiferencia de si los mismos se obtienen de ratones tratados con MSA o polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención, y no diferían significativamente en peso de los ganglios obtenidos de ratones a los que no se administró inyección de células alguna.

7.7. Supresión del Rechazo de Injerto de Órganos *In Vivo*

Se transplantan corazones neonatales C57BL/6 (H-2^b) en los pabellones de la oreja de receptores BALB/c (H-2^d) adultos utilizando el método de Fulmer *et al.*, Am. J. Anat. 113: 273, 1963, modificado como ha sido descrito por Trager *et al.*, Transplantation 47: 587, 1989, y Van Buren *et al.*, Transplant. Proc. 15: 2967, 1983. La supervivencia de los corazones transplantados se evalúa por inspección visual de los injertos respecto a actividad pulsátil. La actividad pulsátil se determina por examen de los injertos oreja-corazón de receptores anestesiados bajo un microscopio de disección con luz reflejada suave comenzando el día 5 ó 6 después del trasplante. El tiempo de rechazo del injerto se define como el día después del trasplante en el cual cesa la actividad contráctil.

Se transplantan los ratones receptores el día 0 y se inyectan con los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención más MSA (seroalbúmina de ratón, 100 ng) o con MSA sola los días 0 a 6, alternando rutas i.p. y s.c. En un segundo experimento de trasplante de corazón, los ratones se inyectan con MSA sola los días 0 a 2, únicamente por ruta i.p.

7.8. Supresión de la Artritis Inflamatoria

Se dividen 20 ratas en 4 grupos, designados grupos G-J, cada uno de los cuales comprende 5 ratas. Se inmunizan todas las ratas por inyección subcutánea. El día 21 después de la inmunización con mBSA, se provoca una respuesta de artritis inflamatoria. El mismo día, se inyecta un grupo de control negativo con un volumen de 0,2 ml de solución salina. Se inyectan los grupos con cantidades crecientes de los polipéptidos IL-1 Hy2 de la invención. Se inyecta Interleuquina-1 en un grupo como control positivo. Se mide el diámetro de la región mayor de las articulaciones tratadas utilizando un calibre los días 2, 4, 6 y 8 con relación al día 0 de la inyección intra-articular de antígeno.

7.9. Actividad en un Modelo de Pancreatitis

Se induce pancreatitis edematosa necrotizante aguda en ratones Swiss macho adultos que pesan más de 35 gramos utilizando ceruleína - un análogo de la colecistoquinina. Se dividen los ratones en cuatro grupos, recibiendo tres de los grupos ceruleína, 50 µg/kg por inyección intraperitoneal (IP) en 4 dosis a lo largo de 3 horas como se ha descrito previamente. (Murayama *et al.*, Arch Surg 1990; 125: 1570-1572; Tani *et al.*, International J Pancreatolgy 1987; 2:337-348; Schoenberg *et al.*, Free Radical Biology & Medicine 1992; 12:515-522; Heath *et al.*, Pancreas 1993; 66:41-45; Saluja *et al.*, Amer Physiological Society 1985: G702-G710; Manso *et al.*, Digestive Disease and Sciences 1992; 37:364-368). El grupo 1 es un grupo de control (n = 9) que recibe únicamente inyecciones de solución salina IP. El grupo 2 (n = 12) es un control de la enfermedad sin tratar. El grupo 3 (n = 12) recibe tres inyecciones de fármaco (10 mg/kg/h) comenzando una hora antes de la inducción de la pancreatitis. El grupo 4 (n = 12) recibe tres inyecciones de fármaco (10 mg/kg/h) comenzando una hora después de la inyección de la pancreatitis.

Después de un periodo de tiempo adecuado, se practica la eutanasia a todos los animales, se recoge la sangre, y se extirpan quirúrgicamente y pesan los páncreas. Se ensaya el suero respecto a los niveles de amilasa, lipasa, IL-6 y TNF. Cada uno de los páncreas se fija, se tiñe, y se clasifica histológicamente de manera ciega respecto a edema intersticial, infiltración de granulocitos, vacuolización acinar, y células acinares. Adicionalmente, se determinan los niveles de IL-1 Hy2 en suero, permitiendo por tanto comparaciones entre dosificación, nivel en suero, respuesta sistémica de citoquinas, y grado de deterioro pancreático.

Se miden Interleuquina-6, Interleuquina-1, antagonista de los receptores de Interleuquina-1, y TNF por medio de kits ELISA disponibles comercialmente (Genzyme Corp., Boston, Mass.). Todas las muestras se tratan por triplicado. Los niveles en suero de amilasa y lipasa Se miden en un analizador automático Kodak Ectachem 700 (Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y.).

Se preparan portaobjetos histológicos como es conocido en la técnica después de extirpación rápida y fijación subsiguiente en formalina al 10%. Los tejidos se incrustan en parafina como es conocido en la técnica y se tiñen luego con hematoxilina y eosina de manera estándar. Estos portaobjetos se examinan y se clasifican de manera ciega por un patólogo certificado legalmente.

Ejemplo 8

Secuenciación del Clon BAC Genómico Humano de IL-1 Hy2

Para comprender la organización genómica del gen de IL-1 Hy2, se seleccionó una genoteca de BAC humano comercial (Research Genetics) con el cDNA de IL-1 Hy2 de longitud total utilizando procedimientos estándar. El clon BAC que contenía el gen de IL-1 Hy2 genómico humano se secuenció por métodos convencionales y se expone como SEQ ID NO: 15. Basándose en las secuencias, se predijeron los exones del gen de IL-1 Hy2 utilizando el soporte lógico GenScan (Universidad de Stanford). Este análisis indicó que el cDNA de IL-1 Hy2 debería contener secuencias adicionales en el extremo 5' además de las indicadas en SEQ ID NO: 1.

La secuencia de cDNA predicha basada en la secuencia de DNA genómico que codifica IL-1 Hy2 se comparó con la secuencia de cDNA correspondiente. Este análisis indicó que la secuencia de cDNA predicha basada en la secuencia genómica humana de IL-1 Hy2 (SEQ ID NO: 12) contiene una timidina (T) en el nucleótido 279 (véase la Figura 2), mientras que la secuencia de cDNA de IL-1 Hy2 (SEQ ID NO: 14; Figura 4) contiene una citosina (C) en la posición 279. El cambio de nucleótidos (C → T) extendería el marco de lectura abierto de IL-1 Hy2 en la dirección 5', dando como resultado un polipéptido de 200 aminoácidos, mientras que la secuencia de cDNA (SEQ ID NO: 14; Figura 4) codifica un polipéptido de 152 aminoácidos (SEQ ID NO: 2).

La secuencia de cDNA predicha (SEQ ID NO: 12) tiene 1366 nucleótidos y contiene un marco de lectura abierto (nucleótidos 278 a 880) que codifica un polipéptido predicho de 200 aminoácidos (SEQ ID NO: 13; Figura 2). Sin embargo, las secuencias que rodean el codón de iniciación de la traducción en el nucleótido 422 de SEQ ID NO: 12 son más similares al consenso del sitio de inicio de la traducción Kozak que las secuencias que rodean el nucleótido 278. Por esta razón, es también posible que el polipéptido IL-1 Hy2 esté codificado por un marco de lectura abierto más corto entre los nucleótidos 422 y 880 de SEQ ID NO: 12, que codifica un polipéptido predicho de 152 aminoácidos (SEQ ID NO: 2).

Ejemplo 9

Secuenciación del Clon BAC Genómico de Ratón IL-1 Hy2

Se exploró una genoteca de BAC comercial de ratón (Research Genetics) con el cDNA de IL-1 Hy2 de longitud total utilizando procedimientos estándar. El clon BAC que contenía el gen IL-1 Hy2 de ratón se secuenció por métodos convencionales y se representa como SEQ ID NO: 17. Basándose en las secuencias, se predijeron los exones del gen de IL-1 Hy2 de ratón utilizando el soporte lógico GenScan (Universidad de Stanford). Este análisis indicó que el gen IL-1 Hy2 de ratón contiene 4 exones. El cDNA predicho que codifica la proteína IL-4 Hy2 de ratón se representa como SEQ ID NO: 16. La traducción del polipéptido IL-1 Hy2 murino se inicia en el nucleótido 1 y termina en el nucleótido 457 de SEQ ID NO: 17. Las secuencias de los polipéptidos IL-1 Hy2 de ratón y humano comparten 81,7% de homología. La secuencia de DNA genómico murino puede utilizarse para generar animales transgénicos que sobreexpresan el polipéptido IL-1 Hy2 o tienen el gen IL-1 Hy2 "knockout" como se ha descrito arriba en la sección 16.

Ejemplo 10

Inhibición de la Producción de IL-6 Inducida por IL-1 β

La inhibición de la producción de IL-6 inducida por Interleuquina-1 β se estudió utilizando células endoteliales humanas de la vena umbilical (Huvec). Se sembraron células Huvec a razón de 2×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos el día antes de la estimulación de las células. El día de la estimulación, se lavaron las células una sola vez con medio reciente (medio F12 con 100 $\mu\text{g/ml}$ de heparina, 50 $\mu\text{g/ml}$ de suplemento de crecimiento endotelial y 10% de suero bovino fetal) y se extendieron de nuevo con 200 μl de medio reciente [sin suplementos] en cada pocillo. Las células Huvec se estimularon luego con 100 pg/ml (volumen final) de IL-1 β . Aunque este ensayo se realizó con IL-1 β , puede utilizarse cualquier citoquina de interés. Para ensayar la inhibición de IL-6, se añadieron a los pocillos con la IL-1 β concentraciones diferentes de IL-1 Hy2 (en las que la concentración de IL-1 β variaba desde 10x a 1000x) o IL-1ra (en las que la concentración de IL-1 β variaba desde 10x a 1000x) con la IL-1 β .

Después de 16 horas de estimulación de las células, se centrifugó la placa de cultivo durante 5 minutos a 4000 rpm para eliminar los residuos celulares. Para ensayar respecto a la presencia de IL-6, se retiraron 100 μl de sobrenadante y se ensayaron con un kit de inmunoensayo de IL-6 humana (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

ES 2 300 266 T3

IL-1 Hy2 inhibía parcialmente la producción de IL-6 estimulada por IL-1 β de una manera dependiente de la dosis. Teniendo en cuenta el hecho de que IL-6 bloquea la producción del factor de necrosis tumoral (TNF), una citoquina pro-inflamatoria, el hecho de que IL-1 Hy2 inhiba sólo parcialmente la producción de IL-6 por IL-1 Hy2 puede ser beneficioso en el tratamiento de estados de enfermedad inflamatorios con IL-1 Hy2 debido a sus efectos secundarios reducidos. Es posible que preparaciones más purificadas de IL-1 Hy2 puedan exhibir inhibición completa en este ensayo.

Ejemplo 11

Inhibición de la Actividad de IL-18 por IL-1 Hy2

El experimento siguiente evaluó la capacidad de IL-1 Hy2 para inhibir la actividad de IL-18, tal como se mide por inducción de IFN- γ . Se obtuvieron linfocitos humanos (PBMC) por separación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque de sangre periférica de donantes voluntarios sanos. Inmediatamente después del aislamiento, se lavaron dos veces los PBMC con medio de crecimiento, que contenía RPMI 1640-10% suero bovino fetal, y se sembraron 3×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se estimularon por adición del anticuerpo anti-CD3 (R&D Systems, Minneapolis, MN) a todas las muestras a una concentración final de 0,5 μ g/ml. En el momento de la estimulación, todos menos un pocillo de control por placa se trataron con 100 ng/ml de IL-18 recombinante (R&D Systems) durante 36 horas a 37°C con 5% de CO₂. El pocillo sin tratar sirvió como medida de los niveles de ruido de fondo de IFN γ producida por las células PBMC estimuladas. El tratamiento con IL-18 causa que las células PBMC aumenten la producción de IFN- γ con relación a los niveles de ruido de fondo.

Para ensayar respecto a la inhibición por IL-1 Hy2 de la producción de IFN γ estimulada por IL-18, se añadieron a los pocillos concentraciones de 100x veces a 1000x veces de IL-1 Hy2 (con relación a la concentración de IL-18) junto con IL-18 en el momento de la estimulación. Después de 36 horas de estimulación de las células, la placa de cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm para eliminar los residuos celulares. El sobrenadante se ensayó respecto a IFN γ utilizando el kit ELISA IFN γ Quantikine (R&D Systems) de acuerdo con el protocolo propuesto por el fabricante.

Los resultados indicaban que IL-18 estimulaba por sí sola la producción de IFN γ y que IL-1 Hy2 tenía ciertas actividades inhibitorias sobre la estimulación por IL-18. Con objeto de evaluar el mecanismo por el cual IL-1 Hy2 reducía la producción de IFN γ , se llevó a cabo el ensayo siguiente.

Se obtuvieron linfocitos humanos (PBMC), se lavaron, se sembraron, se estimularon con anticuerpo anti-CD3 y se trataron con una concentración final de 100 ng/ml de IL-18 (R&D Systems) como se ha descrito arriba. Se utilizaron luego varios anticuerpos bloqueantes para ensayar la inhibición de la producción de IFN γ , con inclusión de anticuerpo receptor anti-IL-18, anticuerpo de la proteína accesoria del receptor anti-IL-1, anticuerpo anti-receptor de IL-1 tipo I y anticuerpo anti-receptor de IL-1 tipo II (obtenidos todos ellos de R&D Systems, Minneapolis, MN). Se añadieron cantidades diferentes de cada anticuerpo a los pocillos con IL-18, y después de 36 horas de estimulación de las células, se centrifugó la placa de cultivo durante 5 minutos a 4000 rpm para eliminar los residuos celulares. El sobrenadante se ensayó respecto a IFN γ utilizando el kit ELISA IFN γ Quantikine (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En ausencia de un anticuerpo, IL-18 estimulaba la producción de IFN γ con relación a los niveles de ruido de fondo como se ha observado arriba. Sin embargo, el anticuerpo receptor anti-IL-18, el anticuerpo de la proteína anti-accesoria y el anticuerpo del receptor anti-IL-1 tipo I pero no el tipo II inhibían la producción de IFN γ inducida por IL-18.

Estos resultados indican que los compuestos que antagonizan la acción del receptor IL-1 inhiben la actividad de IL-18 tal como se mide por inducción de la producción de IFN γ .

Ejemplo 12

Fijación de IL-1 Hy2 al Receptor de Interleuquina-1

Se llevó a cabo un ensayo de fijación de células, en una modificación del procedimiento como se ha descrito arriba en el Ejemplo 7.1, a fin de determinar si la IL-1 Hy2 de la invención se fija al receptor de Interleuquina-1 (IL-1). Resumidamente, se utilizó clasificación de células activadas fluorescentes (FACS) para medir la fijación celular de la proteína recombinante (véase Ejemplo 6) utilizando anticuerpo fluorescentes específicos para el marcador rápido en la proteína recombinante IL-1 Hy2. En cada reacción, se suspendieron 10^6 células de fibroblastos humanos (CCD 1089) en 100 μ l de tampón FACS (que contenía PBS destilada, suero de ternero al 3% y azida al 0,01%). Las reacciones de fijación de células incluían IL-1 Hy2 recombinante 5 mM en 100 μ l de suspensión de células. Las células se incubaron en hielo durante 1 hora. Se redujeron las células a un sedimento por centrifugación, se añadieron 200 μ l de BS3 0,2 mM (reticulador), y se mantuvieron las células en hielo durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 10 μ l de Tris 1M de pH 7,5 y se incubaron las células durante 15 minutos en hielo. Se redujeron las células a un sedimento por centrifugación, se lavaron una sola vez en tampón FACS, se suspendieron de nuevo en un volumen de

ES 2 300 266 T3

100 μ l de tampón FACS, se añadieron 2 μ l de anticuerpo primario (anticuerpo anti-marcador rápido, 1 mg/ml), y se continuó la incubación en hielo durante 30 minutos más. Se redujeron las células a un sedimento por centrifugación, se lavaron con tampón FACS, y se suspendieron de nuevo en tampón FACS (volumen 100 μ l). Se añadió el anticuerpo secundario (conjugado a ficoeritrina), 2 μ l de Ig anti-ratón (1 mg/ml) y se incubaron las células durante 30 minutos en
5 hielo. Se redujeron de nuevo las células a un sedimento por centrifugación, se lavaron dos veces con tampón FACS, se resuspendieron en 0,5 ml de tampón FACS y se analizaron en FACS.

Se observó un cambio en la fluorescencia para las células tratadas con la IL-1 Hy2 marcada recombinante. Esta fijación era específica, dado que no se observaba fijación con la misma molaridad de proteínas no afines, tales como
10 seroalbúmina bovina (BSA). Se demostró también la fijación específica de IL-1 Hy2 en la línea de células T murina D10 y la línea de células monoclonales murinas RAW 264.7. Estos resultados indican la fijación de la proteína IL-1 Hy2 de la invención al receptor de IL-1.

15 Ejemplo 13

Expresión del Polipéptido IL-1 Hy2 en Células de Mamífero

Para expresar IL-1 Hy2 en células de mamífero, se transfectaron células de ovario de hámster chino (CHO) con
20 un vector de expresión de mamífero y se detectó la secreción de IL-1 Hy2. La región codificante de la proteína de IL-1 Hy2 se obtuvo por PCR. Se utilizó el cDNA de IL-1 Hy2 como molde para los iniciadores específicos de IL-1 Hy2 (5' ATGGTTCCCTCCCCATGGCAAG3' y 5' GCTACCAGCTCTGTT-CAAAGTAAAAC3'; SEQ ID NO: 19 y 20, respectivamente) diseñados para amplificar el ORF más corto. La reacción PCR se realizó durante 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. El producto PCR se insertó
25 en el vector pcDNA3.1/V5-His-Topo (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El constructo de expresión resultante se secuenció para confirmar que la secuencia insertada de IL-1 Hy2 era correcta.

Se transfectaron transitoriamente células CHO con el vector de expresión de mamífero, pcDNA IL-1 Hy2, utilizando el reactivo de transfección FuGene (Roche Molecular Biochemicals) de acuerdo con las instrucciones del
30 fabricante. Se recogió el medio de cultivo 48 horas después de la transfección y se pasó a través de un filtro de 0,2 μ para eliminar los residuos celulares.

El medio acondicionado recogido se concentró 10 veces utilizando microcolumnas (Amicon) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se analizó por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% seguido por hibridación mediante transferencia Western. Se detectó IL-1 Hy2 en la transferencia Western con un anticuerpo policlonal
35 específico para IL-1 Hy2 utilizando el BCIP/NBT (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo policlonal utilizado para la transferencia Western era el anticuerpo específico IL-1 Hy2 descrito en el Ejemplo 3. Se detectó el polipéptido IL-1 Hy2 tanto en el medio de cultivo de las células como en el lisado celular, lo que sugería que IL-1 Hy2 es un polipéptido secretado de peso molecular aparente 25 kD cuando se expresa en células de
40 mamífero. El polipéptido IL-1 Hy2 expresado en células de mamífero puede secuenciarse para confirmar la secuencia del término amino de la proteína madura.

La presente invención no debe considerarse limitada en alcance por las realizaciones citadas como ejemplo, que tienen por objeto servir como ilustración de aspectos singulares de la invención, y composiciones y métodos que son
45 funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. De hecho, se espera que numerosas modificaciones y variaciones en la práctica de la invención sean ideadas por los expertos en la técnica una vez consideradas las presentes realizaciones preferidas. Por consiguiente, las únicas limitaciones que deben establecerse sobre el alcance de la invención son las que aparecen en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por:

- (a) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 12 ó 14;
- (b) un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico que codifica SEQ ID no: 2.

2. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido con actividad de IL-1 Hy2, que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por:

- (a) polinucleótidos que codifican la secuencia de amino-ácidos de SEQ ID NO: 2 y
- (b) polinucleótidos que codifican la secuencia de amino-ácidos de SEQ ID NO: 13.

3. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido con actividad antagonista de IL-1 Hy2 que se hibrida en condiciones severas al complemento del polinucleótido de SEQ ID NO: 1 en las condiciones severas siguientes:

- (a) hibridación a 65°C en una solución que contiene NaHPO₄ 0,5M, 7% de dodecil-sulfato de sodio (SDS), y EDTA 1 mM; y
- (b) lavado a 68°C en una solución que contiene 0,1 X SSC y 0,1% de SDS.

4. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que es un DNA.

5. El polinucleótido de la reivindicación 4 que se selecciona del grupo constituido por polinucleótidos que tienen la secuencia codificante de la proteína IL-1 Hy2 de SEQ ID NO: 1 y que comprende uno o más de los cambios de nucleótidos siguientes: T125C, C184T y A205C.

6. Un polinucleótido aislado que comprende un complemento del polinucleótido de la reivindicación 1.

7. Un vector de expresión que comprende el DNA de la reivindicación 4.

8. Una célula hospedadora modificada por ingeniería genética para contener el DNA de la reivindicación 4.

9. La célula hospedadora de la reivindicación 8 en la cual el DNA está en asociación operativa con una secuencia reguladora que controla la expresión del DNA en la célula hospedadora.

10. Un polipéptido aislado con actividad antagonista de IL-1 Hy2 que comprende:

- (a) la secuencia de la proteína IL-1 Hy2 de SEQ ID NOS: 2 ó 13; o
- (b) un polipéptido codificado por el polinucleótido de la reivindicación 3; o
- (c) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de 90% con la secuencia de (a).

11. Una composición que comprende el polipéptido de la reivindicación 10 y un vehículo.

12. Un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido con actividad de IL-1 Hy2 que está constituido por:

la secuencia de la proteína IL-1 Hy2 de SEQ ID NOS: 2 ó 13.

13. Un método para detectar un polinucleótido de la reivindicación 1 en una muestra, que comprende los pasos de:

- (a) poner en contacto la muestra con un ácido nucleico que se fija a y forma un complejo con el polinucleótido durante un periodo suficiente para formar el complejo; y
- (b) detectar el complejo, de tal manera que si se detecta un complejo, se detecta un polinucleótido de la reivindicación 1.

14. Un método para detectar un polinucleótido de la reivindicación 1 en una muestra, que comprende los pasos de:

- (a) poner en contacto la muestra en las condiciones de hibridación severas de la reivindicación 3 con iniciadores de ácido nucleico que se reasocian a un polinucleótido de la reivindicación 1 en tales condiciones; y

- (b) amplificar los polinucleótidos de la reivindicación 1 de tal manera que si se amplifica un polinucleótido, se detecta un polinucleótido de la reivindicación 1.

5 15. El método de la reivindicación 14, en el cual el polinucleótido es una molécula de RNA que codifica un polipéptido de la reivindicación 10, y el método comprende además transcribir inversamente una molécula de RNA reasociada en un polinucleótido de cDNA.

16. Un método para detectar un polipéptido de la reivindicación 10 en una muestra, que comprende:

- 10 (a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, que se fija a y forma un complejo con el polipéptido durante un periodo suficiente para formar el complejo; y
- (b) detectar el complejo, de tal manera que si se detecta un complejo, se detecta un polipéptido de la reivindicación 10.

15 17. Un método para identificar un compuesto que se fija a un polipéptido de la reivindicación 10, que comprende:

- (a) poner en contacto un compuesto con un polipéptido de la reivindicación 10 durante un tiempo suficiente para formar un complejo polipéptido/compuesto; y
- 20 (b) detectar el complejo, de tal manera que si se detecta un complejo polipéptido/compuesto, se identifica un compuesto que se fija a un polipéptido de la reivindicación 10.

25 18. Un método para identificar un compuesto que se fija a un polipéptido de la reivindicación 10, que comprende:

- (a) poner en contacto un compuesto con un polipéptido de la reivindicación 10, en una célula, durante un tiempo suficiente para formar un complejo polipéptido/compuesto, en el cual el compuesto dirige la expresión de una secuencia de gen informador en la célula; y
- 30 (b) detectar el complejo por detección de la secuencia del gen informador, de tal manera que si se detecta un complejo polipéptido/compuesto, se identifica un compuesto que se fija a un polipéptido de la reivindicación 10.

35 19. Un método de producción del polipéptido de la reivindicación 10, que comprende:

- (a) cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 8 durante un periodo de tiempo suficiente para expresar el polipéptido contenido en dicha célula; y
- 40 (b) aislar el polipéptido de la célula del paso (a).

20. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, capaz de fijarse al receptor de Interleuquina-1.

45 21. Un método de modulación de la actividad biológica de un receptor de Interleuquina-1 que comprende poner en contacto el receptor con el polipéptido de la reivindicación 10, en donde dicho método es un método *in vitro*.

22. El polipéptido de la reivindicación 10 acoplado a un marcador.

50 23. Un método de marcación de un receptor de Interleuquina-1 (IL-1) que comprende poner en contacto dicho receptor de IL-1 con un polipéptido marcado de la reivindicación 22, en donde dicho método es un método *in vitro*.

24. Un kit que comprende el polipéptido de la reivindicación 10.

55 25. Uso del polipéptido de la reivindicación 10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer que implica niveles elevados de IL-1.

60 26. El uso de la reivindicación 25, en el cual el medicamento está destinado al tratamiento del cáncer que se selecciona del grupo constituido por adenocarcinoma de mama, tumores cerebrales, melanoma, mieloma, tumores de células gigantes de los huesos, leucemia mielógena aguda, carcinoma epidermoide oral y carcinoma de células escamosas.

65 27. Uso de un polipéptido IL-1 Hy2 de la reivindicación 10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un estado de enfermedad inflamatoria mediado por IL-18.

	170										180																
	P	V	Q	L	T	K	E	S	E	P	S	A	R	-	-	-	T	K	F	Y	F	E	Q	S	W		
131	P	V	Q	L	T	K	E	S	E	P <td>S</td> <td>A</td> <td>R</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>T</td> <td>K</td> <td>F</td> <td>Y</td> <td>F</td> <td>E</td> <td>Q</td> <td>S</td> <td>W</td> <td>IL-1 Hy2</td>	S	A	R	-	-	-	T	K	F	Y	F	E	Q	S	W	IL-1 Hy2	
130	P	V	R	L	T	Q	L	P	E	N	G	W	N	A	P	I	T	D	F	Y	F	Q	Q	C	D	IL-1 Hy1	
156	P	V	S	L	T	N	T	P	K	E	P	-	-	-	C	T	V	T	K	F	Y	F	Q	E	D	Q	IL-1 Ra de rata
155	P	V	G	L	T	N	T	P	K	A	A	-	-	-	V	K	V	T	K	F	Y	F	Q	D	Q	IL-1 Ra de cerdo	
155	P	V	S	L	T	N	M	P	D	E	G	-	-	-	V	M	V	T	K	F	Y	F	Q	E	E	Hu 8IL-1Ra	
137	P	V	S	L	T	N	M	P	D	E	G	-	-	-	V	M	V	T	K	F	Y	F	Q	E	E	Hu iCIL-1Ra	

Decoración 'id-consenso': Residuos en recuadro que coinciden exactamente con el Consenso

FIG. 1B

FIGURA 2

SEQ ID NO.:12

```

      10      20      30      40      50      60
GGCAGTGGGA CTGGGTTTGA GGTGGGCTTA TCCTCCAAC TTAGGGGAGG CTACAGCACA 60
CTCCACCCCA CTCTCAAGGC TGGGAATTGT TGTGGCTCAG CTAATTGGGG GAATCTCTTT 120
TCCAGTTTCT CAGAACCCAG CCAAGCACAC ACATCCGAGG CTCACACCCC TGGTGGCTGG 180
ACITGCTCCC GGATAGCCCTC AGTCACGGAG AGGCAGAGCT GCGTGGAGCC TGGTCCGCTG 240
GTGGAAGCCT TGGTGCATTC TGGCAGGCCA ATTATAGATG AATCCCTTGG GGAACCCGTC 300

      310      320      330      340      350      360
CAGCCCGTGG CTGAGTGGTT CTAAGCCCCA GCACGTCTGC CTCTCGCTTC ACCCAGCCTC 360
CTTTTCTAAC TGCCCTTCTC TCCCTCCCAT CAGTGAGGAC CAGACACCAE TGATTGCAGG 420
AATGTCTTCC CTCCCATGG CAAGATACTA CATAATTAAA TATGCAGACC AGAAGGCTCT 480
ATACACAAGA GACGCCCAGC TGGTGGTGGG AGATCTCTTT GCAGACAACT GGTGTGCAGA 540
GAAGATCTGC AACTTCTCTA ACAGAGGCTT GGAAGGCACC AAGCTCCCTA TTTTCTGGG 600

      610      620      630      640      650      660
GATCCAGGGA GCGAGCCGCT GCTGSCATG TGTGGACACA GAAGAGGGGC CTTCCTTACA 660
GCTGCAGGAT GTGAACATTG AGGAATGTGA CAAAGGTGGT GAAGAGGCCA CACGCTTCAC 720
CTTCTTCCAG AGCAGCTCAG GCTCCGCTTT CAGGCTTGAG GGTGCTGCTT GGCTTGGCTG 780
GTTCTTGTCT GCGCCGGCAG AGCCCCAGCA GCCAGTACAG CTCACCAAGG AGASTGAGCC 840
CTCAGCCCGT ACCAAGTCTT ACTTTCAACA GAGCTSGTAG GGAGACAGGA AACTGCGTTT 900

      910      920      930      940      950      960
TAGCCTTCTG CCCCCAACC AAGCTCATCC TGGTCAGGGT CTATGGTAGG CAGAATAATG 960
TCCCCGAAAA TATGTCCACA TCTTAATCCC AAGATCTGTG CATATGTTAC CATACATGTC 1020
CAAAAGAGGT TTGCAAAATG GATTATGTTA AGGATCTTCA AATGAGGAGA CAATCCTGGG 1080
TTATCCTTGT GGGCTCAGTT TAATCACAAG AAGCAGGCCAG GAAGGAGAGG TCAGACAGAG 1140
AATGGAACAT ACCATGCTTC TAATTTTGAA GATCGAGTGA GGGGCTTGA GCCAACATAT 1200

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
GCTTGTGTTT TTAGAAGGAG GAAAAGCCAA GGCACGGAT TCTCTCTAT AGTCTCCGA 1260
AGGAACACAG CTCTTGACAC ATGGATTTCA GTCAGTCAC ACCCATTTCA GACTTCTGAC 1320
CTCCACAAC TAAAAATAAT AAATTTGTGT TATTGTAAAC CTCTGG 1366

```

FIGURA 3

SEQ ID NO.: 13

	10	20	30	40	50	
MNGLGNPCSP	WLS35KPD-V	CLWLHPASFS	NCPELLPISE	DOTPLIACMC	50	
SLPHARYYII	KYADOKALY	RDGC.LVSDP	VADNCCAETI	CTLPRGLDR	100	
TKVPIFLGIC	GSSRCLACVE	TEEGPSLOLE	DNVIEELYKG	GEEATRFTHF	150	
CSSSGSAFRL	EAAAWPGWF	CGPAEPDOPV	CLTKESEPSA	RTKPYFECSW	200	

FIGURA 4

SEQ ID NO.: 14

10	20	30	40	50	60
GCCAGTGGGA	CTGGGTTTGA	GCTGGGCTTA	TCCTCCAACT	GTGAGGGAGG	CTACAGCACA 60
C1CCACCCCA	CTCTCAGGGC	TGGGAATTGT	TGTGGCTCAG	CTA1TTGGGG	GAATCTCTTT 120
TCCAGTTTCT	CAGAACCAGC	GCAAGCAGAC	ACATCCGAGG	CTCAGACCCC	TGGTGGCTGG 180
ACTTGTCCG	GGATAGGCTC	AGTCAGGAG	AGGCAGAGCT	GCGTGGAGCC	TGCTCCGCTG 240
CTGGAAGCCT	TGGTGGATTC	TGGCAGGCCA	ATTATAGACG	AATCCGCTGG	GGAAACCCGTG 300
310	320	330	340	350	360
CAGCCCGTGG	CTGAGTGGTT	CTAAGCCCCA	GCACGTCTGC	CTCTCGCTTC	ACCCAGCCTC 360
CTTTCTAAC	TGCCCTTCTC	TGCTCCCAT	CAGTGAGGAC	CAGACACCAC	TGATTCGAGG 420
AATGTGTTC	CTCCCATGG	CAAGATACTA	CATAATTAAA	TATGCAGACC	AGAAGGCTCT 480
ATACAGAAGA	GACGGCCAGC	TGCTGGTGGG	AGATCTGT	GCAGACAACT	GCTGTGCAGA 540
GAAGATCTGC	ACACTTCTTA	ACAGAGGCTT	GGACGGCACC	AAGCTCCGCA	TTTCTCTGGG 600
610	620	630	640	650	660
GATCCAGGGA	GCGAGGCGCT	GCCTGGCATG	TGTGGACACA	GAAGAGGGGC	CTTCCCTACA 660
GCTGGAGGAT	GTGAACATTS	AGGAAGTGTA	CAAAGGTGGT	GAAGAGGCCA	CACGCTTCAC 720
CTTCTTCCAG	AGCAGCTCAG	GCTCCGCTT	CAGGCTTGAG	GCTGCTGCTT	GGCCTGGCTG 780
GTTCTGTCT	GGCCCGGCAG	AGCCCCAGCA	GCCAGTACAG	CTCACCAGG	AGAGTGAGCC 840
CTCAGCCCGT	ACCAAGTCTT	ACTTTCAACA	GAGCTGGTAG	GGAGACAGGA	AACCTCGCTT 900
910	920	930	940	950	960
TAGCCTTCTG	CCCCCAACC	AAGCTCATEC	TGCTCAGGCT	CTATGGTAGG	CAGAATAATG 960
TCCCCGAAA	TATGTCCACA	TGCTAATCC	AAGATCTGTG	CATATGTTAC	CATACATGTC 1020
CAAAGAGGTT	TTGCAAAATG	GATTATGTTA	AGGATCTTCA	AATGAGGAGA	CAATCTGGGG 1080
TTATCTTGT	GGGCTCAGTT	TAATCACAAG	AAGCAGGCAG	GAAGGGAGAG	TCAGACAGAG 1140
AATGSAAGAT	ACCATGCTTC	TAATTTGAA	GATGGAGTGA	GGGCTCTTGA	GCCAACATAT 1200
1210	1220	1230	1240	1250	1260
GCTTGTGTTT	TTAGAAGGAG	GAAAAGCCAA	GGCAAGGGAT	TCCTCTCTAT	AGTCTCCGGA 1260
AGGAACACAG	CTCTTGACAC	ATGSATTTCA	GCTCAGTCAC	ACCCATTTCA	GACTTCTGAC 1320
CTCCACAAC	ATAAAATAAT	AACTTGTGT	TATGTAAAC	CTCTGG	1366

ES 2 300 266 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Hyseq, Inc.

5 <120> Interleuquina-1 Hy2, Materiales y Métodos

<130> 28110/36479

10 <140>

<141>

<150> US 09/522, 964

15 <151> 2000-03-01

<150> US 09/316, 086

<151> 1999-03-20

20 <160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.0

25 <210> 1

<211> 998

<212> DNA

30 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

35 <222> (54)..(512)

40

45

50

55

60

65

ES 2 300 266 T3

<400> 1

```

5      ggttccagga actcaggatc tgcagtgagg accagacacc actgattgca gga atg      56
                                           Met
                                           1
10     tgt tcc ctc ccc atg gca aga tac tac ata att aaa tat gca gac cag      104
Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr Ala Asp Gln
           5              10              15
15     aag gct cta tac aca aga gat ggc cag ctg ctg gtg gga gat cct gtt      152
Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly Asp Pro Val
           20              25              30
20     gca gac aac tgc tgt gca gag aag atc tgc aca ctt cct aac aga ggc      200
Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Thr Leu Pro Asn Arg Gly
           35              40              45
30     ttg gac cgc acc aag gtc ccc att ttc ctg ggg atc cag gga ggg agc      248
Leu Asp Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln Gly Gly Ser
           50              55              60              65
35     cgc tgc ctg gca tgt gtg gag aca gaa gag ggg cct tcc cta cag ctg      296
Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser Leu Gln Leu
           70              75              80
40     gag gat gtg aac att gag gaa ctg tac aaa ggt ggt gaa gag gcc aca      344
Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Glu Ala Thr
           85              90              95
50     cgc ttc acc ttc ttc cag agc agc tca ggc tcc gcc ttc agg ctt gag      392
Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala Phe Arg Leu Glu
           100             105             110
55     gct gct gcc tgg cct ggc tgg ttc ctg tgt ggc ccg gca gag ccc cag      440
Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu Pro Gln
           115             120             125
60
65

```

ES 2 300 266 T3

5 cag cca gta cag ctc acc aag gag agt gag ccc tca gcc cgt acc aag 488
 Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala Arg Thr Lys
 130 135 140 145

 10 ttt tac ttt gaa cag agc tgg tag ggagacagga aactgcgttt tagccttgtg 542
 Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
 150

 15 cccccaaacc aagctcatcc tgctcagggt ctatggtagg cagaataatg tccccgaaa 602

 20 tatgtccaca tcctaataccc aagatctgtg catatgttac catacatgtc caaagagggt 662

 ttgcaaatgt gattatgtta aggatcttga aatgaggaga caatcctggg ttatccttgt 722

 25 gggctcagtt taatcacaag aaggaggcag gaaggagag tcagagagag aatggaagat 782

 30 accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggccttga gccaacatat gcagggtgttt 842

 ttagaaggag gaaaagccaa gggaacggat tctcctctat agtctccgga aggaacacag 902

 35 ctcttgacac atggatttca gctcagtgac acccatttca gaattctgac ctccacaact 962

 40 ataaaaataat aaacttgtgt tattgtaaac ctctgg 998

 45 <210> 2
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50

 55

 60

 65

ES 2 300 266 T3

<400> 2

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

<210> 3

ES 2 300 266 T3

<211> 998
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

5
<220>
<221> CDS
<222> (3)..(512)

10
<400> 3

15
gg ttc cag gaa ctc agg atc tgc agt gag gac cag aca cca ctg att 47
Phe Gln Glu Leu Arg Ile Cys Ser Glu Asp Gln Thr Pro Leu Ile

20
1 5 10 15

25
gca gga atg tgt tcc ctc ccc atg gca aga tac tac ata att aaa tat 95
Ala Gly Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr

30
20 25 30

35
gca gac cag aag gct cta tac aca aga gat ggc cag ctg ctg gtg gga 143
Ala Asp Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly

40
35 40 45

45
gat cct gtt gca gac aac tgc tgt gca gag aag atc tgc aca ctt cct 191
Asp Pro Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Thr Leu Pro

50
50 55 60

55

60

65

ES 2 300 266 T3

aac aga ggc ttg gac cgc acc aag gtc ccc att ttc ctg ggg att cag 239
 Asn Arg Gly Leu Asp Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln
 5 65 70 75

gga ggg agc cgc tgc ctg gca tgt gtg gag aca gaa gag ggg cct tcc 287
 Gly Gly Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser
 10 80 85 90 95

cta cag ctg gag gat gtg aac att gag gaa ctg tac aaa ggt ggt gaa 335
 Leu Gln Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu
 15 100 105 110

gag gcc aca cgc ttc acc ttc ttc cag agc agc tca ggc tcc gcc ttc 383
 Glu Ala Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala Phe
 20 115 120 125

agg ctt gag gct gct gcc tgg cct ggc tgg ttc ctg tgt ggc ccg gca 431
 Arg Leu Glu Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala
 25 130 135 140

gag ccc cag cag cca gta cag ctc acc aag gag agt gag ccc tca gcc 479
 Glu Pro Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala
 30 145 150 155

cgt acc aag ttt tac ttt gaa cag agc tgg tag ggagacagga aactgcgttt 532
 Arg Thr Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
 35 160 165 170

tagccttggtg cccccaaacc aagctcatcc tgctcagggc ctatggtagg cagaataatg 592
 40

tccccgaaa tatgtccaca tccaatccc aagatctgtg catatgttac catacatgtc 652
 45 50 55 60 65

ES 2 300 266 T3

caaagagggt ttgcaaatgt gattatgtta aggatcttga aatgaggaga caatcctggg 712
5 ttatccttgt gggctcagtt taatcacaag aaggaggcag gaaggagagag tcagagagag 772
aatggaagat accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggccttga gccaacatat 832
10 gcaggtgttt ttagaaggag gaaaagccaa gggaacggat tctcctctat agtctccgga 892
aggaacacag ctcttgacac atggatttca gctcagtgac acccatttca gacttctgac 952
15 ctccacaact ataaaataat aaacttgtgt tattgtaaac ctctgg 998

20

<210> 4
25 <211> 169
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 4

35 Phe Gln Glu Leu Arg Ile Cys Ser Glu Asp Gln Thr Pro Leu Ile Ala
1 5 10 15
40 Gly Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr Ala
20 25 30
45 Asp Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly Asp
35 40 45
50 Pro Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Thr Leu Pro Asn
50 55 60

55

60

65

ES 2 300 266 T3

Arg Gly Leu Asp Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln Gly
65 70 75 80

Gly Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser Leu
85 90 95

Gln Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Glu
100 105 110

Ala Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala Phe Arg
115 120 125

Leu Glu Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu
130 135 140

Pro Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala Arg
145 150 155 160

Thr Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
165

<210> 5

<211> 155

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 300 266 T3

<400> 5

```

5      Met Val Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu
      1              5              10              15

10     Lys Val Leu Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His
      20              25              30

15     Ala Gly Lys Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg
      35              40              45

20     Trp Leu Asp Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly
      50              55              60

25     Ser Gln Cys Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu
      65              70              75              80

30     Glu Pro Val Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys
      85              90              95

35     Ser Phe Thr Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu
      100             105             110

40     Ser Ala Ala Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp
      115             120             125

45     Gln Pro Val Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala
      130             135             140

50     Pro Ile Thr Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp
      145             150             155

55

```

60 <210> 6
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> *Rattus rattus*
 65

ES 2 300 266 T3

<400> 6

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

<210> 7

<211> 177

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

ES 2 300 266 T3

<400> 7

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

ES 2 300 266 T3

<210> 8

<211> 177

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

```

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

15      Phe Leu Phe His Ser Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser
              20              25              30

20      Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe
              35              40              45

25      Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn
        50              55              60

30      Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala
        65              70              75              80

35      Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys
              85              90              95

40      Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp
              100             105             110

45      Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser
              115             120             125

50      Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp
              130             135             140

55      Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn
        145             150             155             160

60      Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp
              165             170             175

65      Glu

```

ES 2 300 266 T3

<210> 9
 <211> 159
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9
 10
 Met Ala Leu Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 15
 Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu
 20 25 30
 20
 Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn
 25 35 40 45
 25
 Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe
 30 50 55 60
 30
 Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly
 35 65 70 75 80
 35
 Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser
 40 85 90 95
 40
 Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser
 45 100 105 110
 45
 Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu
 50 115 120 125
 50
 Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro
 55 130 135 140
 55
 Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
 60 145 150 155
 60
 65 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA

ES 2 300 266 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador

<400> 10

10 ccgcaccaag gtccccattt tc

22

<210> 11

<211> 22

15 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador

<400> 11

25 gagcccacaa ggataaccga gg

22

<210> 12

<211> 1366

30 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 300 266 T3

<400> 12

```

5      ggcagtgagg ctgggtttga gctgggctta tcctccaact gtgagggagg ctacagcaca 60
      ctccacccca ctctcagggc tgggaattgt tgtggctcag ctatttgggg gaatctgttt 120
      tccagtttct cagaaccagc gcaagcacac acatcccagg ctcacacccc tgggtggctgg 180
10     acttgctccc ggatagcctc agtcagggag aggcagagct gcctggagcc tgctgggctg 240
      gtggaagcct tgggtggattc tggcaggcca attatagatg aatggcctgg ggaacccgtg 300
      cagcccgtgg ctgagtgggt ctaagcccca gcacgtctgc ctctggcttc acccagcctc 360
15     ctttttctaac tgcctttctc tcctcccatc cagtgaggac cagacaccac tgattgcagg 420
      aatgtgttcc ctccccatgg caagatacta cataattaaa tatgcagacc agaaggtctc 480
      atacacaaga gacggccagc tgctgggtggg agatcctgtt gcagacaact gctgtgcaga 540
20     gaagatctgc aacttctcta acagaggctt ggaccgcacc aagggtccca ttttcctggg 600
      gatccagggg gggagccgct gcctggcatg tgtggagaca gaagaggggc cttccctaca 660
      gctggaggat gtgaacattg aggaactgta caaagggtgt gaagaggcca cacgcttcac 720
25     cttcttccag agcagctcag gctccgcctt caggcttgag gctgctgcct ggcttggtg 780
      gttcctgtgt ggcccgccag agccccagca gccagtacag ctcaccaagg agagtgcagc 840
      ctcagcccgt accaagtttt actttgaaca gagctggtag ggagacagga aactgcgttt 900
30     tagccttggt cccccaacc aagctcatcc tgctcagggt ctatggtagg cagaataatg 960
      tccccgaaa tatgtccaca tcctaatccc aagatctgtg catatgttac catacatgtc 1020
35     caaagagggt ttgcaaatgt gattatgtta aggatcttga aatgaggaga caatcctggg 1080
      ttatccttgt gggctcagtt taatcacaag aaggaggcag gaagggagag tcagagagag 1140
      aatggaagat accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggccttga gccaacatat 1200
40     gcttgtgttt ttagaaggag gaaaagcaa gggaacggat tctcctctat agtctccgga 1260
      aggaacacag ctcttgacac atggatttca gtcagtgac acccatttca gacttctgac 1320
      ctccacaact ataaaataat aaacttgtgt tattgtaaac ctctgg 1366
45

```

<210> 13

50 <211> 200

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 300 266 T3

<400> 13

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

ES 2 300 266 T3

<210> 14

<211> 1366

<212> DNA

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

```

10      ggcagtgagg ctgggtttga gctgggctta tcctccaact gtgagggagg ctacagcaca 60
      ctccacccca ctctcagggc tgggaattgt tgtggctcag ctatttgggg gaatctgttt 120
15      tccagtttct cagaaccagc gcaagcacac acatcccagg ctcacacccc tggtaggctgg 180
      acttgcctcc ggatagcctc agtcaggagg aggcagagct gcctggagcc tggtaggctg 240
      gtggaagcct tggtaggattc tggcaggcca attatagacg aatggcctgg ggaacccgtg 300
20      cagcccgctg ctgagtggtt ctaagcccca gcacgtctgc ctctggcttc acccagcctc 360
      cttttctaac tgcccttctc tcctcccat cagtggaggc cagacaccac tgattgcagg 420
      aatgtgttcc ctcccatgg caagatacta cataattaaa tatgcagacc agaaggctct 480
25      atacacaaga gacggccagc tgctgggtgg agatcctgtt gcagacaact gctgtgcaga 540
      gaagatctgc acacttctc acagaggctt ggaccgcacc aagggtccca ttttcctggg 600
      gatccaggga gggagccgct gcctggcatg tgtggagaca gaagaggggc cttccctaca 660
30      gctggaggat gtgaacattg aggaactgta caaagggtgt gaagagggca caccgttcac 720
      cttcttcctc agcagctcag gctccgcctt caggcttgag gctgctgcct ggcctggctg 780
      gttcctgtgt gggccggcag agcccccagc gccagtacag ctcaccaagg agagtgcagg 840
35      ctacgccctg accaagtgtt actttgaaca gagctggtag ggagacagga aactgcgttt 900
      tagccttggt cccccaacc aagctcatcc tgctcagggt ctatggtagg cagaataatg 960
      tccccgaaa tatgtccaca tcctaatacc aagatctgtg catatgttac catacatgtc 1020
40      caaagagggt ttgcaaattg gattatgtta aggatcttga aatgaggaga caatcctggg 1080
      ttatccttgt gggctcagtt taatcacaag aaggaggcag gaaggagag tcagagagag 1140

      aatggaagat accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggccttga gccaacatat 1200
45      gcttgtgttt ttagaaggag gaaaagccaa gggaacggat tctcctctat agtctccgga 1260
      aggaacacag ctcttgacac atggatttca gctcagtgac acccatttca gacttctgac 1320
      ctccacaact ataaaataat aaacttgtgt tattgtaaac ctctgg 1366

```

<210> 15

55 <211> 5445

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 300 266 T3

<400> 15

5 ctggactgga ccagcattga atttcttcca gctctttgag ctgacactga cccagagtgg 60
 gagtcacag cttgctatcc accttcaccc agggccctcc actttgttgc cccacctaga 120
 10 tctgggcaca gctaccacac tgcccactgt cctgctgcta caaccaaaga agccccagtg 180
 gtttggccaa ggggagccca tcatcaagtg ggcttgcatt gaggccatga tgcctgttgag 240
 ttatctgtac tgggggattg tctagtcctt taggactcaa agtgcctggc aggaggaacc 300
 15 agcagcattg acatcacctg gttgcatatt tgaaatgtac agtctcaggc cccaccccag 360
 gcctgaaaaa ccagaatctg ttattttaac aagaactgca ggtggtttat atatttatta 420
 ataagtgtga agaatggaat gaaagtacat cagttcccaa gcagcatggc tgattgctgg 480
 20 aatcactcca agtcctactg aattagaacc ttcggcccag gaaatagtaa ttatacagag 540
 tccccagggt gatgcagatg ggcaggcaca tttaggagcc aatgacttta actgaacact 600
 tcatttaaaa aatgttgaaa cttacttgat actacaaagg aaattcatgt tcattatagg 660
 25 aaaatgttga tatgtttaaa aaattactca taaagccata ggtaagtggg gcaacaacac 720
 gagtaacata tctatgtatg tgtctctatg tgtggattta aatagaatta cagtgtacac 780
 ttgatttata atctgcattt ttcacctaat atattttgaa aatttttatg tcctaaaaa 840
 30 agctccata atatcatctt taacaaacac atacatcctt atttattgaa ttttgctata 900
 atttcttagc caactaccta ttactgaaaa ttcagatttt tttcaacttc ttgctattgt 960
 aaaaaattat gcagtgaaca tttttgtaag taaacatttg ggcaatccgt tatttttcc 1020
 35 aagagtaagg gaaacacatg caatcacaaa gtatacagaa tgctttaaga ctttcattca 1080

40

45

50

55

60

65

ES 2 300 266 T3

cagcaccaac atccccccag aatttgcaact tgttagtccc tattatccct cactctaagt 1140
 ctcaaagtca taccccaagg cctggggaca gaaaatgact tgtccaaagt gacagtgaca 1200
 5 gaccagtagc taaaagccac cttggctaca gccctgtttc tggaaactga gtgctgaggt 1260
 ggttgggaagc cgtatccctc gcacccacct gtcccttctc acctgcctcc ccagggtccc 1320
 tcagcatctc tctattccct cctgagccct attactttct tccacctgcc ttcttccctt 1380
 10 ctcttctctc attttctgct ttcttatatt ttttcttctc tattcccttc ttatttgggtg 1440
 agaatcagat ctactcggta aacctcagcc ctagtcatatc ttgcgttact ttccctgagct 1500
 aatttccaac tcctgattag ctctgggttt atttccatgc taaattcttg actggccttt 1560
 15 ccaatgggtg ttcattttag ggaagagctc taggacagga taacccatcg ggaaggagca 1620
 gagtcatgtg aggctgtgtg gcctggcatt tatacagggc cactatcttc actgtgccat 1680
 ttcccatctg gaacagaatg ggggagtttg gatgggctgt tttcagcagt cttggccaag 1740
 20 cacttctagt cactaggaat gatgttttcc aactctcttg ggagacccca ccagcctcac 1800
 tgctgtgga gaccccttct agttgtgctc tcttcttcca ctctgggctc tagttatcta 1860
 acccttggct agttatgggg gcgggggtgt ggtgccctgt tggccaacag ggcagtggga 1920
 25 ctgggtttga gctgggctta tcctccaact gtgagggagg ctacagcaca ctccacccca 1980
 ctctcagggc tgggaattgt tgtggctcag ctatttgggg gaatctgttt tccagtttct 2040
 cagaaccagc gcaagcacac acatcccagg ctccaccccc tggtggtctg acttgctccc 2100
 30 ggatagcctc agtcagggag aggcagagct gcctggagcc tgctgggctg gtggaagcct 2160
 tgggtgattc tggcaggcca attatagatg aatggccttg ggaaccctg cagccctggtg 2220
 ctgagtgggt ctaagcccca gcacgtctgc ctctggcttc acccagcctc cttttctaac 2280
 35 tgcccttctc tcctcccat cagtgaggac cagacaccac tgattgcagg aatgtgttcc 2340
 ctcccatgg caagatacta catgtaagtt gtccctggcat gtccctgctt tccaagccag 2400
 ggggtcaggg tgggaagagg aaagggaatgc tgagtcagag gatgaggctc cttctcacct 2460
 40 tagaaattgc aagtgcccc aattaagct tcatcatcac cacagtagca acagctcttt 2520
 cctgaacgct tgaagatgc cagccaatct actgcctcat ctctgttcca aaaagtctat 2580
 aagtggagtg ttattaaccc cattttacag atctggaagc tgaggctcaa agagggtaaa 2640
 45 taacttcccc catgtcacac agctaccaa aggcagagcc aggaatcaga cttcatgttc 2700
 tctatgctgc tccatccgcc tctctgaaat gtcagaaagt tttgaatctc aatgacagca 2760
 tcttgatggg ggtccctgtg gcctttactc ccagtgtggg cttctaacac ttacttacat 2820
 50 ttcatctcat ttgagatttg catccttctc tatcttttac tactttgttg tctgtgattt 2880
 tgtcataagc tcctttcagg aaggagggtga ggcataagaa aaatcaaaga ggactctggg 2940
 55 atgcatttcc tctgccccct ccatggaccc tgtaatgtcc agggctgtgt cctggacaag 3000

60

65

ES 2 300 266 T3

gtgggtgggg agcagtcctg gtctcaagga ggtgacagcc tggctgggaa gcaagacaca 3060
 tacataggaa gcacataaat gacaaagcag atgtcagcac ttcaggggcat ctaatctggg 3120
 5 tctctggtctc caaatagaat gctgctggca tgtgagttgt cacatctggg ttgtcaaggt 3180
 ggcaagggga atgccagtcg gcaagcccag gatcttttccg gaagtttatt ttattgtac 3240
 aagtgaacct gctttaaata tgtacagtca ttagctaagg gtattatcgt tagctgttat 3300
 10 tgaggtagaa aaatcccctg gaggtggtgg aatttgtcca gaggttctgc cctaaaaggt 3360
 taatgagagc tctccagccc tgacagcagc tgacaggcat ctttgaaacc aactagggtga 3420
 ctgagctaata accctgcatg actttgaagc ctttaaaata tctgaaaagc aaatcacact 3480
 15 tcagtataca ctcaattaat ctctgtacta aagagaataa acatttataa acaattaggg 3540
 caggcccaaa aaatttaaga taagggtccac tgtatcccaa agtcatctga gcctcactaa 3600
 gaaatttctc aggaagccag gaacatttctc tttacccctc tgtcagaggg cattggctct 3660
 20 ccgttctect ctgaaggcct cccaagcca tgagaaggca ggaagcacag cctctgaaaa 3720
 gcaagaacac aggagacctt ccttgcctta agactggcct ggtctttacc tgcctctggg 3780
 agtgaccatt cccctcttac cacctgtgaa ggagagaaaa tcgcccacaa gctcaagggtg 3840
 25 gtgattcaga gcatggaagt ggaagggcct gggggccagt ggtgcataaa gggaatgggc 3900
 catcagcact gtcatactgt ttcagaatta aatatgcaga ccagaaggct ctatacaca 3960
 gagatggcca gctgctgggt ggagatcctg ttgcagacaa ctgctgtgca ggtgagcttc 4020
 30 tggggcctcc accccatgct ccctctgcca taggcctcc cttctcttct tcccttctcc 4080
 cccagcaga gggtcagcag ctgccccag tgacagttag aaggggcaga gagcagctgt 4140
 ggcctctect agcgagggga catgactcct gcagaagtcc tggctcaccg tccagtctgc 4200
 35 atgcagggcc agggcagggtg tgcccatgtc cagtcccttc ctgcctgagc ctttacctgc 4260
 caagagcctg caacatgggg ttccttctgc ccttgactct tctctctctt cctctctaga 4320
 gaagatctgc acacttctta acagaggcct ggaccgcacc aagggtccca ttttctctgg 4380
 40 gatccaggga gggagccgct gcctggcatg tgtggagaca gaagaggggc cttccctaca 4440
 gctggagggt agaggcctct cccatttcta ggggacactg cagacctggc ctgacctctg 4500
 ggatgctctg gcatctttgt gcctatctgt ggattcccag ccagggtccac atgtcctact 4560
 45 tctcagggt tccaccatct cctctctgcac cttagcaccac gacctctgcc ctctagaatc 4620
 tgcagaaggc agtcccttgg gtaaaaacca gccctgtcag gtcccttttt ggccaagccc 4680
 cagaggcctc cagggttaac acctccatca gcactctcat tctgcagcca tccaccttgc 4740
 50 cccacagga tgtgaacatt gaggaactgt acaaagggtg tgaagaggcc acacgcttca 4800
 ccttcttcca gacagctca ggctccgctc tcaggcttga ggctgctgcc tggcctggct 4860
 55 ggttctctgt tggcccggca gagccccagc agccagtaca gctcaccaag gagagtgagc 4920

60

65

ES 2 300 266 T3

cctcagcccg taccaagttt tactttgaac agagctggta gggagacagg aaactgcgtt 4980
 ttagccttgt gccccaaac caagctcatc ctgctcaggg tctatggtag gcagaataat 5040
 5 gtcgcccgaa atatgtccac atcctaatacc caagatctgt gcatatgtta ccatacatgt 5100
 ccaaagaggt ttgcaaatg tgattatgtt aaggatcttg aaatgaggag acaatcctgg 5160
 gttatccttg tgggctcagt ttaatcaca gaaggaggca ggaagggaga gtcagagaga 5220
 10 gaatggaaga taccatgctt ctaattttga agatggagtg aggggccttg agccaacaaa 5280
 tgcaggtgtt tttagaaggt ggaaaagcca agggaaacgga ttctctctta gagtctccgg 5340
 aaggaacaca gctcttgaca catggatttc agctcagtga caccatttc agacttctga 5400
 15 cctccacaac tataaataa taaacttggt ttattgtaaa cctct 5445

20 <210> 16
 <211> 4388
 <212> DNA
 <213> Ratón
 25 <400> 16

30 ccatatcctt atttcctgga tttatcattc cctttcagcc gactggacat tgacagcatt 60
 tccaactttt caaccttgta aaaataacta attgaactat ttataacta agcatttggg 120
 35 caatcaatta cctctgcctg gaatgggggc aacaacacat gcaatcatgg gaaagccagg 180
 atgctgctgt ctgacccca gccctggcat tcgtgcagaa cctcactctc atctgtgcc 240
 tgatcctt cactctcaag tcttttccca gtgactttta aaggcaacag aatcatatag 300
 40 ccaataatga aagctacttg gtctacagtt gtgtggcggt ttttatagat attttcatca 360
 ttacattta aaatgcata cccaaaagtc ccctataccc tccccaccc tgctccccta 420
 cccactgcac tcccacttct tggccctggc ttccccctt actggggcat ataaagtgtg 480
 45 ctagaccaag gggcctctct tcccaatgat ggccaactag gccattttct gctacatag 540
 cagctagaga caccagttct ggggttactg gttagtcat attgtgttc tacctatggg 600
 gttgcagacc ccttcagctc ttgagtactt tctctagctc ctccattggg agccctgtgt 660
 50 tccatcctat agatgactgt gagcatcccc ttctgtattt gcaggcgtgg catatgaaat 720
 agtatctgca ttgggtggct gattatggga tggaccccc ggtggggcag tctatggatg 780
 gtccatcctt tcatcttagc tccaaaactt gtctctgcaa cttcttccat ggatatttta 840
 55 gtccctaate tagggaggaa tgaagtatcc ccaagtgar cttccttctt gattttctta 900
 tgttttagca gttggatgtt ggatattata ggtttctggg ctaatatcca cttatcagtg 960

60

65

ES 2 300 266 T3

agtacatatac aagtgaattc ttttgtgatt aggttacctc actcaagatg atattctcca 1020
 ctatgttcaa aacagcccta tttatagtag ccagaagact ggaaagaacc cagtccctca 1080
 5 acagaggaat ggatacagaa aatgggcaca tttatgcaat ggagcccact cagatattaa 1140
 aaacaacgaa tttatgaaat tctcgggcaa aaccctatct aaagccagga ataaggaaaa 1200
 gatggactgc ctgcctgcag ctgggagagc tggggagacc tttgtggatt ctgtaatact 1260
 10 taggggtacg gaacagcttg tggctggata attctgagct ccagcatgtc tgccccccaa 1320
 aaaacattct gtttttctga aagccttttt cttctttgcc tcagtgaaga ccagacactc 1380
 ccaactgcag gaatgtgctc ctttcccatg gcaagatact acatgtaagt aatcttaacg 1440
 15 atcgctcaat caaggggctt ggagatcaca tgagaaggga aaaggctgag tcaaagggac 1500
 aaagctccct ctagccacag aaatctcaaa cactgaataa ttgatcttca tctttgtcaa 1560
 tcacaacagc cctctttcct ggtgacagaa tggacaact gtaagagtgg tattgcttag 1620
 20 tccattttac agaccggaa actcaacctc cagagggtta tacaattttc ctcatgtcat 1680
 gcaattaccc aaaagcagag agtgggactg gactctctgt tctctaaact gatgtagcta 1740
 gttcttagaa agctcaaaaa atcttgagtc ccaaggacag cacctttatg gtcacctgga 1800
 25 ttgataccta tatcaaaaa aaaaaagggt ctactagat agccctggct accctgaaac 1860
 tctcactgtg tacatttagg tgaccacgaa ctacagaga tctgccttcc aagtgcctgg 1920
 attaaagtat gtaccaccac acctgcatct ttgacaataa ctgagtggta tctaaattct 1980
 30 tccagtggct aaacagttaa gtcccagttc ccaaagtctg acaaaaatgc caggtggctg 2040
 aaatctgtac agacctttgt tcttaatgta caagtgagcc tgcttttaaa acaatacgca 2100
 agctgttttt gctattgcta agtggtgcag agacagaaaa ggctcccaga agtggttaact 2160
 35 ttgggtccaga gggtctgttc tcaaaactcat tgtgagctct gaaagcaact gatgggcagc 2220
 tctgaaatca gctgggcaat taggctaata acaggcataa ttttaatggt tcacacgcat 2280
 gacagttcct cccagctgc cctagtacat acttaccctc ctaggcacgt cattagaccc 2340
 40 atagggtataa ccagtgacta atcaggccct ggtctaattc taagttggcc tcttatataa 2400
 gtgccactca gagtgtacct catcatggct gtagtgggcc cagagtctag ggacatagac 2460
 ttttctattg tccaatttct gatttgtgaa ttttctacaa aaagaatttt ttttaatttt 2520
 45 acaaatcaaa tcacagttac tacatcttca gttccttcat taattagtgt tactatttaa 2580
 aaaaataaaa taaatcaagc tcagaaacat catggatagg gttcattgta tctccagggt 2640
 acctgagctt caaagcaact cctcagacag ccatgaaaac atcctcaatt acctcatgag 2700
 50 aagacactat tgtcatttct ggagcctctg ataactctga gcctaggcag ctttgggatg 2760
 aaacaatttc tacccttatt ggaacagtgt cctctcctg tctggaaaca attcaccaaa 2820
 ggctccatgt ggttgtccag taagggtgga tggggacaga aatggacaat gatccctgag 2880

55

60

65

ES 2 300 266 T3

5 ggcagtgatc cattaacctt gccctoctat ttcagaatca aggatgcaca tcaaaaggct 2940
 ttgtacacac ggaatggcca gctcctgctg ggagaccctg attcagacaa ttatagtcca 3000
 ggtgatcttc cgggtggtggg ggtgggggag tggaggggag ggtgtggggg gggctctctt 3060
 ccagaagttag cttagtgtcc atctgccaca aggccttgat tctttccttc aattgtgtct 3120
 ctagagacat gagaatattg tcacagtgat aaggagaaga ggtaggggca gtttcttctt 3180
 10 gtaaaaaatg aattccattt accctgcagt ctccatacag aaacaggcca gaggggggca 3240
 gaccagtaa cttctagctg agccctacct tgcttaaaac ctgccatctg tggteccctc 3300
 actgtctgaa ttgcattctg tcttacctcc cagagaaggt ctgtatcctt cctaaccgag 3360
 15 gcctagaccg ctccaaggtc cccatcttcc tggggatgca gggaggaagt tgctgcctgg 3420
 cgtgtgtaaa gacaagagag ggacctctcc tgcagctgga ggtgagacac ccctcctcat 3480
 tgcagtcagt actgccactg gaacatagtg acatctttga acccacatgt cccctctctt 3540
 20 gtttcccatc tatctctctt tgcctccagc tgagggactc tagccttttg ggatgtacag 3600
 aaagaacatg gcttcggaaa actcttccct attgagtcct tctttggcca agcctctgag 3660
 gcactaaggg ctgacgtccc aaccaaacac tcatttcac tcacagctgt ctccctttcc 3720
 25 ccacaggatg tgaacatcga ggacctatac aaggggaggtg aacaaaccac ccgtttcacc 3780
 tttttccaga gaagcttggg atctgccttc aggcttgagg ctgctgcctg ccctggctgg 3840
 tttctctgtg gcccagctga gcccagcag ccagtgcagc tcaccaaaga gagtgaaccc 3900
 30 tccacccata ctgaattcta ctttgagatg agtcggtaaa gagacataag gctggggcct 3960
 cgtctagtgc cccagtcctg agatcttctt gctcagcatc tctggaaaagc agaataagga 4020
 agataccaaa gatgtttggg tcttaatccc cagaatctgt gaccgtgtta cattaaatgg 4080
 35 caaagggatt ttttttttcc ttcattggtcc atttgggcc attggaatca tctgaggcct 4140
 catgaggaga aggaagaggt catgagggag actggcgcaa acttttgttac taaaagtaac 4200
 aatggagaca gggaccataa gctgatgggt aacagtgggt tctagaaacc ggaaatgatg 4260
 40 agagctctcc tgacacaggt gtctggattt ttctggactg aagaatggcg aaataatata 4320
 gctccattat ttaagccac tgagtttgag atcattcaat gaagctgtca taataaaacc 4380
 45 tgtgcttc 4388

50 <210> 17
 <211> 459
 <212> DNA
 <213> Ratón

55

60

65

ES 2 300 266 T3

<400> 17

```

5      atgtgctccc ttcccatggc aagatactac ataatcaagg atgcacatca aaaggctttg 60
      tacacacgga atggccagct cctgctggga gaccctgatt cagacaatta tagtccagag 120
10     aaggctctgta tccttcctaa ccgaggccta gaccgctcca aggtcccat cttcctgggg 180
      atgcagggag gaagttgctg cctggcgtgt gtaaagacaa gagagggacc tctcctgcag 240
      ctggaggatg tgaacatcga ggacctatac aaggagggtg aacaaaccac ccgtttcacc 300
15     tttttccaga gaagcttggg atctgccttc aggcttgagg ctgctgcctg ccctggctgg 360
      tttctctgtg gccagctga gcccagcag ccagtgcagc tcaccaaaga gagtgaaccc 420
      tccaccata ctgaattcta ctttgagatg agtcggtaa 459
20

```

<210> 18

25 <211> 152

<212> PRT

<213> Ratón

30 <400> 18

```

35     Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Asp Ala His
      1             5             10             15

40     Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asn Gly Gln Leu Leu Leu Gly Asp Pro
      20             25             30

45     Asp Ser Asp Asn Tyr Ser Pro Glu Lys Val Cys Ile Leu Pro Asn Arg
      35             40             45

50     Gly Leu Asp Arg Ser Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Met Gln Gly Gly
      50             55             60

55     Ser Cys Cys Leu Ala Cys Val Lys Thr Arg Glu Gly Pro Leu Leu Gln
      65             70             75             80

60     Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Asp Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Gln Thr
65

```

ES 2 300 266 T3

85

90

95

5

Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Arg Ser Leu Gly Ser Ala Phe Arg Leu

100

105

110

10

Glu Ala Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu Pro

115

120

125

15

Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Thr His Thr

130

135

140

20

Glu Phe Tyr Phe Glu Met Ser Arg

145

150

25

30 <210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador

40

<400> 19

atgtgttccc tcccatggc aag

23

45 <210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador

55

<400> 20

gctaccagct ctgttcaaag taaaac

26

60

LISTADO DE SECUENCIAS

65 <110> Hyseq, Inc.

<120> Interleukina-1 Hy2 Materiales y Métodos

ES 2 300 266 T3

<130> 28110/36479

<140> PCT/USOO/14144

5 <141> 2000-05-22

<150> US 09/522, 964

<151> 2000-03-10

10

<150> US 09/316, 086

<151> 1999-03-20

15

<160> 20

<170> PatenIn Ver. 2.0

20

<210> 1

<211> 998

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<221> CDS

<222> (54)..(512)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 300 266 T3

<400> 1

```

5      gggtccagga actcaggatc tgcagtgagg accagacacc actgattgca gga atg      56
                                           Met
                                           1
10
      tgt tcc ctc ccc atg gca aga tac tac ata att aaa tat gca gac cag      104
      Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr Ala Asp Gln
15
           5              10              15

      aag gct cta tac aca aga gat ggc cag ctg ctg gtg gga gat cct gtt      152
      Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly Asp Pro Val
           20              25              30

25
      gca gac aac tgc tgt gca gag aag atc tgc aca ctt cct aac aga ggc      200
      Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Thr Leu Pro Asn Arg Gly
           35              40              45

30
      ttg gac cgc acc aag gtc ccc att ttc ctg ggg atc cag gga ggg agc      248
      Leu Asp Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln Gly Gly Ser
35
           50              55              60              65

      cgc tgc ctg gca tgt gtg gag aca gaa gag ggg cct tcc cta cag ctg      296
      Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser Leu Gln Leu
           70              75              80

45
      gag gat gtg aac att gag gaa ctg tac aaa ggt ggt gaa gag gcc aca      344
      Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Glu Ala Thr
           85              90              95

50
      cgc ttc acc ttc ttc cag agc agc tca ggc tcc gcc ttc agg ctt gag      392
      Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala Phe Arg Leu Glu
55
           100             105             110

      gct gct gcc tgg cct ggc tgg ttc ctg tgt ggc ccg gca gag ccc cag      440
      Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu Pro Gln
           115             120             125

```

ES 2 300 266 T3

5 cag cca gta cag ctc acc aag gag agt gag ccc tca gcc cgt acc aag 488
 Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala Arg Thr Lys
 130 135 140 145

 10 ttt tac ttt gaa cag agc tgg tag ggagacagga aactgcgttt tagccttggtg 542
 Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
 150

 15 cccccaaacc aagctcatcc tgctcagggt ctatggtagg cagaataatg tccccgaaa 602

 20 tatgtccaca tccaatccc aagatctgtg catatgttac catacatgtc caaagaggtt 662

 ttgcaaagt gattatgta aggatcttga aatgaggaga caatcctggg ttatccttgt 722

 25 gggctcagtt taatcacaag aaggaggcag gaagggagag tcagagagag aatggaagat 782

 accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggccttga gccaacatat gcagggtgttt 842
 30
 ttagaaggag gaaaagccaa gggaacggat tctcctctat agtctccgga aggaacacag 902

 35 ctcttgacac atggatttca gctcagtgac acccatttca gacttctgac ctccacaact 962

 ataaaataat aaacttgtgt tattgtaaac ctctgg 998
 40

 45 <210> 2
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50

 55

 60

 65

ES 2 300 266 T3

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 998

ES 2 300 266 T3

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

5 <220>

<221> CDS

<222> (3)..(512)

10 <400> 3

```

15      gg ttc cag gaa ctc agg atc tgc agt gag gac cag aca cca ctg att      47
        Phe Gln Glu Leu Arg Ile Cys Ser Glu Asp Gln Thr Pro Leu Ile
           1             5             10             15

20

        gca gga atg tgt tcc ctc ccc atg gca aga tac tac ata att aaa tat      95
        Ala Gly Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr
           20             25             30

30      gca gac cag aag gct cta tac aca aga gat ggc cag ctg ctg gtg gga      143
        Ala Asp Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly
           35             40             45

35

        gat cct gtt gca gac aac tgc tgt gca gag aag atc tgc aca ctt cct      191
        Asp Pro Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Thr Leu Pro
           50             55             60

45

50

55

60

65

```

ES 2 300 266 T3

aac aga ggc ttg gac cgc acc aag gtc ccc att ttc ctg ggg atc cag 239
 Asn Arg Gly Leu Asp Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln
 5 65 70 75

 gga ggg agc cgc tgc ctg gca tgt gtg gag aca gaa gag ggg cct tcc 287
 10 Gly Gly Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser
 80 85 90 95

 cta cag ctg gag gat gtg aac att gag gaa ctg tac aaa ggt ggt gaa 335
 15 Leu Gln Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu
 100 105 110
 20

 gag gcc aca cgc ttc acc ttc ttc cag agc agc tca ggc tcc gcc ttc 383
 25 Glu Ala Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala Phe
 115 120 125

 agg ctt gag gct gct gcc tgg cct ggc tgg ttc ctg tgt ggc ccg gca 431
 30 Arg Leu Glu Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala
 130 135 140
 35

 gag ccc cag cag cca gta cag ctc acc aag gag agt gag ccc tca gcc 479
 40 Glu Pro Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala
 145 150 155

 cgt acc aag ttt tac ttt gaa cag agc tgg tag ggagacagga aactgcgttt 532
 45 Arg Thr Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
 160 165 170
 50

 tagccttggtg cccccaaacc aagctcatcc tgetcagggg ctatggtagg cagaataatg 592
 55

 tcccccgaaa tatgtccaca tccctaattccc aagatctgtg catatgttac catacatgtc 652
 60

 65

ES 2 300 266 T3

```

caaagaggtt ttgcaaatgt gattatgtta aggatccttga aatgaggaga caatcctggg 712

5      ttatccttgt gggctcagtt taatcacaag aaggaggcag gaaggagagag tcagagagag 772

      aatggaagat accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggccttga gccaacatat 832

10     gcaggtgttt ttagaaggag gaaaagccaa gggaacggat tctcctctat agtctccgga 892

      aggaacacag ctcttgacac atggatttca gctcagtgac acccatttca gacttctgac 952

15     ctccacaact ataaaataat aaacttgtgt tattgtaaac ctctgg                      998

```

<210> 4

<211> 169

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

Phe Gln Glu Leu Arg Ile Cys Ser Glu Asp Gln Thr Pro Leu Ile Ala
35      1              5              10              15

Gly Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr Ala
40              20              25              30

Asp Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly Asp
45              35              40              45

Pro Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Thr Leu Pro Asn
50      50              55              60

```

ES 2 300 266 T3

Arg Gly Leu Asp Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln Gly
65 70 75 80

Gly Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser Leu
85 90 95

Gln Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Glu
100 105 110

Ala Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala Phe Arg
115 120 125

Leu Glu Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu
130 135 140

Pro Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala Arg
145 150 155 160

Thr Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
165

<210> 5

<211> 155

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 300 266 T3

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 178

<212> PRT

<213> *Rattus rattus*

65

ES 2 300 266 T3

<400> 6

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

<210> 7

<211> 177

65 <212> PRT

<213> *Sus scrofa*

ES 2 300 266 T3

<400> 7

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

<210> 8

<211> 177

<212> PRT

ES 2 300 266 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

```

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

10     Phe Leu Phe His Ser Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser
      20              25              30

15     Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe
      35              40              45

20     Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn
      50              55              60

25     Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala
      65              70              75              80

30     Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys
      85              90              95

35     Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp
      100             105             110

40     Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser
      115             120             125

45     Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp
      130             135             140

50     Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn
      145             150             155             160

55     Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp
      165             170             175

60     Glu

```

<210> 9

65 <211> 159

<212> PRT

ES 2 300 266 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

5

Met Ala Leu Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys

1 5 10 15

10

Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu

20 25 30

15

Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn

35 40 45

20

Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe

50 55 60

25

Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly

65 70 75 80

30

Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser

85 90 95

35

Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser

100 105 110

40

Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu

115 120 125

45

Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro

130 135 140

50

Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu

145 150 155

55

60 <210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

65

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador

ES 2 300 266 T3

<400> 10		22
5	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
15	<400> 11	
		22
20	<210> 12	
	<211> 1366	
	<212> DNA	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 12	
30	ggcagtgagg ctgggtttga gctgggctta tcctccaact gtgagggagg ctacagcaca 60	
	ctccacccca ctctcagggc tgggaattgt tgtggctcag ctatttgggg gaatctgttt 120	
	tccagtttct cagaaccagc gcaagcacac acatcccagg ctcacacccc tgggtggctgg 180	
35	acttgcctcc ggatagcctc agtcagggag aggcagagct gcctggagcc tgctgggctg 240	
	gtggaagcct tgggtgattc tggcaggcca attatagatg aatggcctgg ggaacccgtg 300	
	cagcccgtgg ctgagtgtt ctaagcccca gcacgtctgc ctctggcttc acccagcctc 360	
40	cttttctaac tgccttctc tcctcccat cagtgaggac cagacaccac tgattgcagg 420	
	aatgtgttcc ctcccatgg caagatacta cataattaaa tatgcagacc agaaggctct 480	
	atacacaaga gacggccagc tgctggggg agatcctgtt gcagacaact gctgtgcaga 540	
45	gaagatctgc acacttcta acagaggctt ggaccgcacc aaggtcccca ttttctctgg 600	
	gatccaggga gggagccgct gcctggcatg tgtggagaca gaagaggggc ctccctaca 660	
	gctggaggat gtgaacattg aggaactgta caaagggtgt gaagaggcca cacgcttcac 720	
50	cttcttccag agcagctcag gctccgcctt caggcttgag gctgctgect ggctggctg 780	
	gttctgtgtt ggcccgagc agcccagca gccagtacag ctcaccaagg agagtgcagc 840	
	ctcagcccgt accaagtctt actttgaaca gagctggtag ggagacagga aactgcgttt 900	
55	tagccttctg cccccaacc aagctcatcc tgctcagggc ctatggtagg cagaataatg 960	
	tccccgaaa tatgtccaca tcctaataccc aagatctgtg catatgttac catacatgtc 1020	
	caaagagggt ttgcaaagt gattatgtta aggatcttga aatgaggaga caatcctggg 1080	
60	ttatccttgt gggctcagtt taatcacaag aaggaggcag gaaggagag tcagagagag 1140	
	aatggaagat accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggccttga gccaacatat 1200	
	gcttgtgttt ttagaaggag gaaaagccaa gggaacggat tctcctctat agtctccgga 1260	
65	aggaacacag ctcttgacac atggatttca gtcagtgac accatttca gacttctgac 1320	
	ctccacaact ataaaataat aaacttgtgt tattgtaaac ctctgg 1366	

ES 2 300 266 T3

<210> 13

<211> 200

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

10

Met Asn Gly Leu Gly Asn Pro Cys Ser Pro Trp Leu Ser Gly Ser Lys
1 5 10 15

15

Pro Gln His Val Cys Leu Trp Leu His Pro Ala Ser Phe Ser Asn Cys
20 25 30

20

Pro Ser Leu Leu Pro Ile Ser Glu Asp Gln Thr Pro Leu Ile Ala Gly
35 40 45

25

Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr Ala Asp
50 55 60

30

Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly Asp Pro
65 70 75 80

35

Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Thr Leu Pro Asn Arg
85 90 95

40

Gly Leu Asp Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln Gly Gly
100 105 110

45

Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser Leu Gln
115 120 125

50

Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Glu Ala
130 135 140

55

Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala Phe Arg Leu
145 150 155 160

60

Glu Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu Pro
165 170 175

65

ES 2 300 266 T3

Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala Arg Thr
180 185 190

Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
195 200

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

<210> 14

<211> 1366

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

```

ggcagtggga ctgggtttga gctgggctta tcctccaact gtgagggagg ctacagcaca 60
ctccacccca ctctcagggc tgggaattgt tgtggctcag ctatttgggg gaatctgttt 120
tccagtttct cagaaccagc gcaagcacac acatcccagg ctcacacccc tgggtggctgg 180
acttgctccc ggatagcctc agtcaggag aggcagagct gcctggagcc tgctgggctg 240
gtggaagcct tggtggattc tggcaggcca attatagacg aatggcctgg ggaacccctg 300
cagcccgtgg ctgagtgggt ctaagcccca gcacgtctgc ctctggcttc acccagcctc 360
cttttctaac tgcccttctc tcctcccat cagtgaggac cagacaccac tgattgcagg 420
aatgtgttcc ctccccatgg caagatacta cataattaaa tatgcagacc agaaggtctt 480
atacacaaga gacggccagc tgctgggtgg agatcctgtt gcagacaact gctgtgcaga 540
gaagatctgc acacttccta acagaggett ggaccgcacc aaggtcccca ttttcctggg 600
gatccaggga gggagccgct gcctggcatg tgtggagaca gaagaggggc cttccctaca 660
gctggaggat gtgaacattg aggaactgta caaagggtgt gaagaggcca cacgcttcac 720
cttcttcag agcagctcag gctccgcctt caggcttgag gctgctgcct ggctggctg 780
gttctctgtg gggccggcag agcccagca gccagtacag ctcaccaagg agagttagcc 840
ctcagcccgat accaagtgtt actttgaaca gagctggtag ggagacagga aactgcgttt 900
tagccttggtg cccccaaacc aagctcatcc tgetcagggt ctatggtagg cagaataatg 960
tccccgaaa tatgtccaca tcctaatacc aagatctgtg catatgttac catatgttc 1020
caaagagggt ttgcaaagt gattatgtta aggatcttga aatgaggaga caatcctggg 1080
ttatccttgt gggtcagtt taatcacaag aaggaggcag gaagggagag tcagagagag 1140

aatggaagat accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggccttga gccaacatat 1200
gcttgtgttt ttagaaggag gaaaagccaa gggaacggat tctcctctat agtctccgga 1260
aggaacacag ctcttgacac atggatttca gctcagtgac acccatttca gacttctgac 1320
ctccacaact ataaaataat aaacttgtgt tattgtaaac ctctgg 1366

```

<210> 15

<211> 5445

<212> DNA

ES 2 300 266 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

ctggactgga ccagcattga atttcttcca gctctttgag ctgacactga cccagagtgg 60
gagtcatcag cttgctatcc accttcaccc agggccctcc actttgttgc cccacctaga 120
tctgggcaca gctaccacac tgcccactgt cctgctgcta caaccaaaga agccccagtg 180
gtttggccaa ggggagccca tcatcaagtg ggcttgcatg gaggccatga tgctgttgag 240
ttatctgtac tgggggattg tctagtcctt taggactcaa agtgctggcc aggaggaacc 300
agcagcattg acatcacctg gttgcatatt tgaaatgtac agtctcaggc cccaccccag 360
gcctgaaaaa ccagaatctg ttattttaac aagaactgca ggtggtttat atatttatta 420
ataagtgtga agaatggaat gaaagtacat cagttcccaa gcagcatggc tgattgctgg 480
aatcactcca agtcctactg aattagaacc ttcggcccag gaaatagtaa ttatacagag 540
tccccaggt gatgcagatg ggcaggcaca ttagggagcc aatgacttta actgaacact 600
tcatttaaaa aatgttgaaa cttacttgat actacaaagg aaattcatgt tcattatagg 660
aaaatgttga tatgtttaa aaattactca taaagccata ggtaagtggg gcaacaacac 720
gagtaacata tctatgtatg tgtctctatg tgtggattta aatagaatta cagtgtacac 780
ttgatttata atctgcattt ttcaccta atattttgaa aatttttatg tcctaaaaca 840
agcttctata atatcatctt taacaaacac atacatcctt atttattgaa ttttgctata 900
atttcttagc caattaccta ttactgaaaa ttcagatttt tttcaacttc ttgctattgt 960
aaaaaattat gcagtgaaca tttttgtaag taaacatttg ggcaatccgt tatttttcct 1020
aagagtaagg gaaacacatg caatcacaaa gtatacagaa tgctttaaga ctttcattca 1080

```

ES 2 300 266 T3

cagcaccaac atccccccag aatttgcact tgttagtccc tattatcctt cactctaagt 1140
 ctcaaagtca taccccaagg cctggggaca gaaaatgact tgtccaaagt gacagtgaca 1200
 5 gaccagtagc taaaagccac cttgggtaca gccctgtttc tggaaactga gtgctgaggt 1260
 ggttgggaagc cgtatcctca gacccacct gttccttctc acctgcctcc ccagggtccc 1320
 tcagcatctc tctattcctc cctgagccct attactttct tccacctgcc ttcttccctt 1380
 10 ctcttctctc attttctgct ttcttatatt ttttcttctc tattcccttc ttatttgggtg 1440
 agaatcagat ctactcggta aacctcagcc ctagtcatatc ttgcgttact ttcttgagct 1500
 aatttccaac tcttgattag ctctgggttt atttccatgc taaattcttg actggccttt 1560
 15 ccaatgggtg ttcatltag ggaagagctc taggacagga taaccatcg ggaaggagca 1620
 gagtcatgtg aggtctgtgtg gctggcatt tatacagggc cactatcttc actgtgccat 1680
 tttccatctg gaacagaatg ggggagtttg gatgggctgt ttccagcagt cttggccaag 1740
 20 cacttctagt cactaggaat gatgttttcc aactctctgg ggagacccca ccagcctcac 1800
 tgtgctgga gaccccttct agttgtgctc tcttcttcca ctctgggctc tagttatcta 1860
 acccttggtc agttatgggg gcgggggtgt ggtgccctgt tggccaacag ggcagtggga 1920
 25 ctgggtttga gctgggctta tcctccaact gtgagggagg ctacagcaca ctccacccca 1980
 ctctcagggc tgggaattgt tgtggctcag ctatttgggg gaatctgttt tccagtttct 2040
 cagaaccagc gcaagcacac acatcccagg ctcacacccc tgggtggctgg acttgcctcc 2100
 30 ggatagcctc agtcagggag aggcagagct gcctggagcc tgcctgggctg gtggaagcct 2160
 tgggtgattc tggcaggcca attatagatg aatggcctgg ggaaccctgt cagcccggtg 2220
 ctgagtgggt ctaagcccca gcacgtctgc ctctggcttc acccagcctc cttttctaac 2280
 35 tgccttctc tcctccccat cagtggaggc cagacaccac tgattgcagg aatgtgttcc 2340
 ctccccatgg caagatacta catgtaagtt gtcctggcat gtccctgctt tccaagccag 2400
 ggggtcaggg tgggaagagg aaaggaatgc tgagtcagag gatgaggtc cttctcacct 2460
 40 tagaaattgc aagtgcccc taattaagct tcatcatcac cacagtagca acagctcttt 2520
 cctgaacgtc tgcaagatgc cagccaatct actgcctcat ctctgttcca aaaagtctat 2580
 aagtggagtg ttatttaacc cattttacag atctggaagc tgagggtcaa agagggtaaa 2640
 45 taacttcccc catgtcacac agctaaccaaa aggcagagcc aggaatcaga cttcatgtcc 2700
 tctatgtctc tccatccgcc tctctgaaat gtcagaaagt tttgaatctc aatgacagca 2760
 50 tcttgatggg ggtccctgtg gcccttactc ccagtgtggg cttctaacac ttacttacat 2820
 ttcatctcat ttgagatttg catccttctc tatcttttac tactttgttg tctgtgattt 2880
 tgtcataagc tcctttcagg aaggagggtga ggcataagaa aaatcaaaga ggactctggg 2940
 55 atgcatttcc tctgccccct ccattggacc tgtaatgtcc agggctgtgt cctggacaag 3000

60

65

ES 2 300 266 T3

gtgggtgggg agcagtcctg gtctcaagga ggtgacagcc tggctgggaa gcaagacaca 3060
 tacataggaa gcacataaat gacaaagcag atgtcagcac ttcagggcat ctaatctggg 3120
 5 tctctggtctc caaatagaat gctgctggca tgtgagttgt cacatctggg ttgtcaaggt 3180
 ggcaagggga atgccagtca gcaagcccag gatctttccg gaagtttatt tttattgtac 3240
 aagtgaacct gctttaaata tgtacagtca ttagctaagg gtattatcgt tagctgttat 3300
 10 tgaggtagaa aaatccccctg gaggtgggtg aatttgtcca gaggttctgc cctaaaagg 3360
 taatgagagc tctccagccc tgacagcagc tgacaggcat ctttgaaacc aactaggtga 3420
 ctgagctaat accctgcatg actttgaagc ctttaaaata tctgaaaagc aaatcacact 3480
 15 tcagtataca ctcaattaat ctctgtacta aagagaataa acatttataa acaattaggg 3540
 caggcccaaa aaatttaaga taaggtccac tgtatcccaa agtcatctga gcctcactaa 3600
 gaaatttctc aggaagccag gaacatttctc tttaccctc tgtcagaggg cattggctct 3660
 20 ccgttctect ctgaaggcct ccccaagcca tgagaaggca ggaagcacag cctctgaaaa 3720
 gcaagaacac aggagacctt ccttgcctta agactggcct ggtctttacc tgcctctggg 3780
 agtgaccatt cccctcttac cacctgtgaa ggagagaaaa tcgccccaat gctcaagggtg 3840
 25 gtgattcaga gcatggaagt ggaagggtt gggggccagt ggtgcataaa ggggaatggg 3900
 catcagcact gtcatactgt ttcagaatta aatatgcaga ccagaaggct ctatacacia 3960
 gagatggcca gctgctgggtg ggagatcctg ttgcagacaa ctgctgtgca ggtgagcttc 4020
 30 tggggcctcc accccatgct ccacttgcca taggcctcc cttctcttct tcccttctct 4080
 cccagcaga gggtcagcag ctgccccag tgacagttag aagggccaga gagcagctgt 4140
 ggcctctect agcgagggga catgactect gcagaagtcc tggctcaccg tccagtctgc 4200
 35 atgcagggcc aggccagggtg tgcccatgtc cagttccttc ctgctgagc ctttacctgc 4260
 caagagcctg caacatgggg ttcccttgtc ccttgactct tctctctctt cctctctaga 4320
 gaagatctgc acacttctta acagaggtt ggaccgcacc aaggccccca ttttctctgg 4380
 40 gatccaggga gggagccgct gcctggcatg tgtggagaca gaagaggggc cttccctaca 4440
 gctggaggtg agaggcctct ccccatctta ggggacactg cagacctggc ctgacctctg 4500
 ggatgctctg gcatctttgt gcctatctgt ggattcccag ccagggtccac atgtcctact 4560
 45 tccctcaggtt tccaccatct cctctgcac ctacaccaa gaccttgcc ctctagaatc 4620
 tgcagaaggc agtcccttgg gtaaaaacca gccctgtcag gtcctttttt ggccaagccc 4680
 cagaggcctc cagggttaac acctccatca gcactctcat tctgcagcca tccaccttgc 4740
 50 cccacagga tgtgaacatt gaggaactgt acaaagggtg tgaagaggcc acacgcttca 4800
 ccttcttcca gagcagctca ggctccgct tcaggcttga ggctgctgcc tggcctggct 4860
 55 ggttctctgt tggcccgga gagccccagc agccagtaca gctcaccaag gagagtgagc 4920

ES 2 300 266 T3

5 cctcagcccg taccaagttt tactttgaac agagctggta gggagacagg aaactgcgtt 4980
 ttagccttgt gccccaaaac caagctcatc ctgctcaggg tctatggtag gcagaataat 5040
 gtcccccgaa atatgtccac atcctaatacc caagatctgt gcatatgtta ccatacatgt 5100
 ccaaagaggt ttgcaaatg tgattatgtt aaggatcttg aaatgaggag acaatcctgg 5160
 gttatccttg tgggctcagt ttaatcacia gaaggaggca ggaagggaga gtcagagaga 5220
 10 gaatggaaga taccatgctt ctaattttga agatggagtg aggggccttg agccaacaaa 5280
 tgcagggtgt tttagaaggt ggaaaagcca agggaacgga ttctcctcta gagtctccgg 5340
 aaggaacaca gctcttgaca catggatttc agctcagtga caccatttc agacttctga 5400
 15 cctccacaac tataaaataa taaacttgtg ttattgtaaa cctct 5445

20 <210> 16
 <211> 4388
 <212> DNA
 <213> *Mus musculus*
 25
 <400> 16

30 ccatatcctt atttcctgga tttatcatc cctttcagcc gactggacat tgacagcatt 60
 tccaactttt caaccttgta aaaataacta attgaactat tttataacta agcatttggg 120
 35 caatcaatta cctctgcttg gaatgggggc aacaacacat gcaatcatgg gaaagccagg 180
 atgtctgtgt ctgatcccta gccctggcat tegtgcagaa cctcactctc atctgtgccc 240
 tgatctcctt cactctcaag tcttttccca gtgactttta aaggcaacag aatcatatag 300
 40 ccaataatga aagctacttg gtctacagtt gtgtggcggt tttatagat attttcatca 360
 ttacatttta aaatgcatat cccaaaagtc cctataacc tccccaccc tgctcccta 420
 cccactgcac tcccacttct tggccctggc ttccccctt actggggcat ataaagtgtg 480
 ctagaccaag gggcctctct tcccaatgat ggccaactag gccattttct gctacatatg 540
 45 cagctagaga caccagtctt ggggttactg gttagtcat attgttgrtc tacctatggg 600
 gttgcagacc ccttcagctc ttgagtactt tctctagctc ctccattggg agccctgtgt 660
 50 tccatcctat agatgactgt gagcatcccc ttctgtattt gcaggcggtg catatgaaat 720
 agtatctgca tttggtggct gattatggga tggacccccg ggtggggcag tctatggatg 780
 gtccatcctt tcactctagc tccaaacttt gtctctgcaa cttcttccat ggatatttta 840
 55 gtccetaatc tagggaggaa tgaagtatcc ccaagttgat cttccttctt gatatttcta 900
 tgttttagca gttggatgtt ggatattata ggtttctggg ctaatatcca cttatcagrg 960

60

65

ES 2 300 266 T3

5 agtacatattc aagtgaattc ttttgtgatt aggttacctc actcaagatg atattctcca 1020
 ctatgttcaa aacagcccta tttatagtag ccagaagact ggaaagaacc cagtcctcca 1080
 acagaggaat ggatacagaa aatgggcaca tttatgcaat ggagcccact cagatattaa 1140
 aaacaacgaa tttatgaaat tctcgggcaa aaccctatct aaagccagga ataaggaaaa 1200
 gatggactgc ctgcctgcag ctgggagagc tggggagacc tttgtggatt ctgtaatact 1260
 10 taggggtacg gaacagcttg tggctggata attctgagct ccagcatgct tgcccccaa 1320
 aaaacattct gtttttctga aagccttttt cttctttgcc tcagtgaaga ccagacactc 1380
 ccaactgcag gaatgtgctc ccttcccatg gcaagatact acatgtaagt aatcttaacg 1440
 15 atcgtcctaat caaggggcct ggagatcaca tgagaaggga aaaggctgag tcaaagggac 1500
 aaagctccct ctagccacag aaatctcaaa cactgaataa ttgatcttca tctttgtcaa 1560
 tcacaacagc cctctttcct ggtgacagaa tgggaacaact gtaagagtgg tattgcttag 1620
 20 tccattttac agaccggga actcaacctc cagcagggtta tacaattttc ctcatgtcat 1680
 gcaattaccc aaaagcagag agtgggatcg gactctctgt tctctaaact gatgtagcta 1740
 gttcttagaa agctcaaaaca atcttgagtc ccaaggacag cacctttatg gtcacctgga 1800
 25 ttgataccta tatcaaaaaa aaaaaaaggc ctcactagat agccctggct accctgaaac 1860
 tctcactgtg tacatttagg tgaccacgaa ctcacagaga tctgccttcc aagtgtctgg 1920
 attaaagtat gtaccaccac acctgcatct ttgacaataa ctgagtggta tctaaattct 1980
 30 tccagtggct aaacagttta gtcccagttc ccaaagtctg acaaaaatgc caggtggctg 2040
 aaatctgtac agaccttctg tcttaatgta caagttagcc tgctttaaaa acaatacgca 2100
 agctgttttt gctattgcta agtgttgag agacagaaaa ggctcccaga agtggtaact 2160
 35 ttggtccaga ggttctgttc tcaaaactcat tgtgagctct gaaagcaact gatgggcagc 2220
 tctgaaatca gctgggcaat taggctaata acaggcataa ttttaatgtt tcacacgcat 2280
 gacagtctct ccccagctgc cctagtacat acttaccctc ctaggcacgt cattagacct 2340
 40 ataggataaa ccagtgacta atcaggccct ggtctaattc taagttggcc tctatataa 2400
 gtgccactca gagtgtacct catcatggct gtagtgggac cagagtctag ggacatagac 2460
 ttttctattg tccaatttct gatttgtgaa ttttctacaa aaagaatttt ttttaatttt 2520
 45 acaaatcaaa tcacagttac tacatcttca gttccttcat taattagtgt tactatttaa 2580
 aaaaataaaa taaatcaagc tcagaacat catggatagg gtccattgta tctccagggt 2640
 acctgagctt caaagcaact cctcagacag ccatgaaaac atcttcaatt acctcatgag 2700
 50 aagacactat tgtcatttct ggagcctctg ataatcctga gcctaggcag ctttgggatg 2760
 aaacaatttc tacccttatt ggaacagtgt cctctcctg tctggaaaca attcaccaaa 2820
 ggctccatgt ggttgcctag taagggtgta tggggacaga aatggacaat gatccctgag 2880

55

60

65

ES 2 300 266 T3

5 ggcagtgatc cattaacctt gccctcctat ttcagaatca aggatgcaca tcaaaaggct 2940
 ttgtacacac ggaatggcca gctcctgctg ggagaccctg attcagacaa ttatagtcca 3000
 ggtgatcttc cgggtggtggg ggtggggggag tggagggggag ggtgtggggg gggctctctt 3060
 ccagaagtgt cttagtgtcc atctgccaca aggccttgat tctttccttc aattgctgtc 3120
 ctagagacat gagaatattg tcacagtgat aaggagaaga ggtaggggca gtttcttctt 3180
 10 gtaaaaaatg aattccattt accctgcagt ctccatacag aaacaggcca gaggggggca 3240
 gaccagtaa cttctagctg agccctacct tgcttaaaac ctgccatctg tggccccctc 3300
 actgtctgaa ttgcattctg tcttacctcc cagagaaggt ctgtatcctt cctaaccgag 3360
 15 gcctagaccg ctccaaggtc cccatcttcc tggggatgca gggaggaagt tgctgcctgg 3420
 cgtgtgtaaa gacaagagag ggacctctcc tgcagctgga ggtgagacac cctcctcat 3480
 tgcagtcagt actgccactg gaacatagtg acatctttga acccacatgt cccctctctt 3540
 20 gtttcccatc tatctctctt tgcctccage tgagggactc tagcctttgg ggatgtacag 3600
 aaagaacatg gcttcggaaa actcttcctt attgagtcct tctttggcca agcctctgag 3660
 gcactaaggg ctgacgtccc aaccaaacac tcatttcac tcacagctgt ctccttttcc 3720
 25 ccacaggatg tgaacatcga ggacctatac aaggggagggt aacaaaccac ccgtttcacc 3780
 tttttccaga gaagcttggg atctgccttc aggcttgagg ctgctgcctg ccctggctgg 3840
 tttctctgtg gcccagctga gcccagcag ccagtgcagc tcaccaaaga gagtgaacct 3900
 30 tccacccata ctgaattcta ctttgagatg agtcggtaaa gagacataag gctggggcct 3960
 cgtctagtgc cccagctctg agatcttctt gctcagcatc tctggaaagc agaataagga 4020
 agataccaaa gatgtttggg tcttaatccc cagaatctgt gaccgtgtta cattaaatgg 4080
 35 caaagggatt ttttttttcc ttcattggtcc atttgggccc attggaatca tctgaggcct 4140
 catgaggaga aggaagaggt catgaggag actggcgcaa actttggtac taaaagtaac 4200
 aatggagaca gggaccataa gctgatgggt aacagtgggt tctagaaacc ggaaatgatg 4260
 40 agagctctcc tgacacaggt gtctggattt ttctggactg aagaatggcg aaataatata 4320
 gctccattat ttaagccac tgagtttgag atcattcaat gaagctgtca taataaaacc 4380
 45 tgtgcttc 4388

50 <210> 17
 <211> 459
 <212> DNA
 <213> *Mus musculus*

55

60

65

ES 2 300 266 T3

<400> 17

```

5      atgtgctccc ttcccatggc aagatactac ataatcaagg atgcacatca aaaggctttg 60
      tacacacgga atggccagct cctgctggga gaccttgatt cagacaatta tagtccagag 120
10     aaggctctgta tccttcctaa ccgaggccta gaccgtcca aggtcccat cttcctgggg 180
      atgcagggag gaagttgctg cctggcgtgt gtaaagacaa gagagggacc tctcctgcag 240
      ctggaggatg tgaacatcga ggacctatac aaggagggtg aacaaaccac ccgtttcacc 300
15     tttttccaga gaagcttggg atctgccttc aggcttgagg ctgctgcctg ccctggctgg 360
      tttctctgtg gcccagctga gcccagcag ccagtgcagc tcaccaaaga gagtgaaccc 420
      tccacccata ctgaattcta ctttgagatg agtcggtaa                      459
20

```

<210> 18

25 <211> 152

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30 <400> 18

```

35     Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Asp Ala His
      1              5              10              15

40     Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asn Gly Gln Leu Leu Leu Gly Asp Pro
      20              25              30

45     Asp Ser Asp Asn Tyr Ser Pro Glu Lys Val Cys Ile Leu Pro Asn Arg
      35              40              45

50     Gly Leu Asp Arg Ser Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Met Gln Gly Gly
      50              55              60

55     Ser Cys Cys Leu Ala Cys Val Lys Thr Arg Glu Gly Pro Leu Leu Gln
      65              70              75              80

60     Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Asp Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Gln Thr
65

```

ES 2 300 266 T3

85

90

95

5

Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Arg Ser Leu Gly Ser Ala Phe Arg Leu

100

105

110

10

Glu Ala Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu Pro

115

120

125

15

Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Thr His Thr

130

135

140

20

Glu Phe Tyr Phe Glu Met Ser Arg

145

150

25

<210> 19

30

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador

40

<400> 19

atgtgtccc tcccatggc aag

23

45

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador

55

<400> 20

gctaccagct ctgtcaaag taaaac

26

60

65