



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 888**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01988203 .4**

96 Fecha de presentación : **28.11.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1356046**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2003**

54 Título: **Receptor de citocina zcytor19.**

30 Prioridad: **28.11.2000 US 253561 P**
07.02.2001 US 267211 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.03.2010

73 Titular/es: **ZymoGenetics, L.L.C.**
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102, US
Bristol-Myers Squibb Company

72 Inventor/es: **Presnell, Scott, R.;**
Xu, Wenfeng;
Novak, Julia, E.;
Whitmore, Theodore, E. y
Grant, Francis, J.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Receptor de citocina zcytor19.

5 Referencia a solicitudes relacionadas

Esta solicitud está relacionada con la Solicitud Provisional 60/253.561, presentada el 28 de Noviembre de 2000. Esta solicitud está también relacionada con la Solicitud Provisional US 60/267.211, presentada el 7 de Febrero de 2001. Bajo 35 U.S.C. § 119(e)(1), esta solicitud reivindica el beneficio de dichas Solicitudes Provisionales.

10 Fundamento del invento

Las hormonas y los factores de crecimiento polipeptídicos controlan la proliferación y diferenciación de las células de los organismos multicelulares. Estas moléculas difusivas permiten que las células se comuniquen entre sí y actúen conjuntamente para formar células y órganos y para reparar el tejido dañado. Los ejemplos de hormonas y factores de crecimiento incluyen las hormonas esteroideas (por ejemplo, estrógeno y testosterona), la hormona paratiroidea, la hormona estimulante del folículo, las interleucinas, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; del inglés, platelet derived growth factor), el factor de crecimiento epidérmico (EGF; del inglés, epidermal growth factor), el factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF; del inglés, granulocyte-macrophage colony stimulating factor), la eritropoyetina (EPO) y la calcitonina.

Las hormonas y los factores de crecimiento influyen en el metabolismo celular al unirse a receptores. Los receptores pueden ser proteínas integrales de membrana que están conectadas a rutas de señalización dentro de la célula, tales como los sistemas de segundo mensajero. Otras clases de receptores son moléculas solubles, tales como los factores de transcripción. Son particularmente interesantes los receptores de las citocinas, moléculas que promueven la proliferación y/o diferenciación de células. Los ejemplos de citocinas incluyen la eritropoyetina (EPO), que estimula el desarrollo de los glóbulos rojos, la trombopoyetina (TPO), que estimula el desarrollo de células del linaje megacariocítico, y el factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF; del inglés, granulocyte-colony stimulating factor), que estimula el desarrollo de los neutrófilos. Estas citocinas son útiles para restablecer los niveles normales de células sanguíneas en los pacientes aquejados de anemia, trombocitopenia y neutropenia o que reciben quimioterapia para el cáncer.

Las demostradas actividades *in vivo* de estas citocinas ilustran el enorme potencial clínico y la necesidad de otras citocinas, agonistas citocínicos y antagonistas citocínicos. El presente invento aborda estas necesidades al proporcionar un nuevo receptor de citocinas hematopoyéticas, así como composiciones y métodos relacionados.

El presente invento proporciona dichos polipéptidos para estos y otros usos que deberían resultar evidentes a los expertos en la técnica a partir de las presentes enseñanzas.

En el Documento WO 98/37193 se describen polipéptidos zcytor7 receptores de citocinas, y polinucleótidos, composiciones y métodos relacionados.

En DATABASE EMBL (en línea), 20 de Julio de 2000, Y. Wei *et al.* describen la leucemia linfoblástica aguda infantil de células pre-B TCBAP1D2669, proyecto Baylor_HGSC = TCBA, secuencia de mRNA del clon TCBAP2669 de cDNA de *Homo sapiens*.

En el Documento WO 99/07848 se describe el receptor citocínico de mamífero y polinucleótidos, composiciones y métodos relacionados.

En el Documento WO 02/20569 se describen ácidos nucleicos que codifican genes y proteínas/fragmentos proteínicos purificados de mamífero, y anticuerpos, y composiciones que tienen utilidades diagnósticas y terapéuticas.

Estos y otros aspectos del invento resultarán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada del invento.

En un aspecto, el presente invento proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido, en que dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro); (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn); (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp); (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg); (e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg); (f) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg); (g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg); (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg); e (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg); o en que dicho polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada

del grupo de: (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); y (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser). En una realización, el polinucleótido aislado comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: (a) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 61 al nucleótido 669; (b) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 61 al 678; (c) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 61 al nucleótido 747; (d) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 748 al nucleótido 1473; (e) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 18, del nucleótido 748 al nucleótido 1560; (f) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 61 al nucleótido 1473; (g) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 18, del nucleótido 61 al nucleótido 1560; (h) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 1 al nucleótido 1473; e (i) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 18, del nucleótido 1 al nucleótido 1560; o el polinucleótido consiste en una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo de: (j) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 20, del nucleótido 61 al nucleótido 489; (k) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 20, del nucleótido 61 al nucleótido 633; y (l) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 20, del nucleótido 1 al nucleótido 633.

En otra realización, el polinucleótido aislado es como se describió anteriormente, en que el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende además un dominio transmembranal que consiste en los restos 227 (Trp) a 249 (Trp) de la ID. SEC. nº 2. En otra realización, el polinucleótido aislado es como se describió anteriormente, en que el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende además un dominio intracelular que consiste en los restos 250 (Lys) a 491 (Arg) de la ID. SEC. nº 2, o del 250 (Lys) a 520 (Arg) de la ID. SEC. nº 19. En otra realización, el polinucleótido aislado es como se describió anteriormente, en que el polipéptido codificado por el polinucleótido presenta actividad según se mide por proliferación celular o por activación de la transcripción de un gen informador, o en que el polipéptido codificado por el polinucleótido se une además a un anticuerpo, en que el anticuerpo es generado contra un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro); (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn); (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp); (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg); (e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg); (f) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg); (g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg); (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg); (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg); (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y (l) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 211 (Ser); y en que la unión del anticuerpo con el polipéptido aislado es medida mediante un ensayo biológico o bioquímico que incluye radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, transferencia Western o ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas.

En un segundo aspecto, el presente invento proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente enlazados: un promotor de la transcripción; un segmento de DNA que codifica un polipéptido del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro); (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn); (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp); (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg); (e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg); (f) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg); (g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg); (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg); (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg); (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y (l) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 211 (Ser); y un terminador de la transcripción, en que el promotor está operativamente enlazado con el segmento de DNA, y el segmento de DNA está operativamente enlazado con el terminador de la transcripción. En una realización, el vector de expresión anteriormente descrito comprende además una secuencia señal secretora operativamente enlazada con el segmento de DNA.

En un tercer aspecto, el presente invento proporciona una célula cultivada que comprende un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 7, en que la célula expresa un polipéptido codificado por el segmento de DNA. En otra realización, el vector de expresión es como se describió anteriormente, en que el polipéptido comprende además un dominio transmembranal que consiste en los restos 227 (Trp) a 249 (Trp) de la ID. SEC. nº 2. En otra realización, el vector de expresión es como se describió anteriormente, en que el polipéptido comprende además un dominio intracelular que consiste en los restos 250 (Lys) a 491 (Arg) de la ID. SEC. nº 2, o del 250 (Lys) al 520 (Arg) de la ID. SEC. nº 19. En otra realización, el vector de expresión es como se describió anteriormente, que comprende los siguientes elementos operativamente enlazados: un promotor de la transcripción; un segmento de DNA que codifica un polipéptido del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro); (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn); (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp); y (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y un terminador de la transcripción, en que el promotor está operativamente enlazado con el segmento de DNA, y el segmento de DNA está operativamente enlazado con el terminador de la transcripción.

En otro aspecto, el presente invento proporciona una célula cultivada que comprende un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 7, en que la célula expresa un polipéptido codificado por la célula cultivada con el segmento de DNA en la que se ha introducido un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 11, en que la célula expresa un polipéptido receptor soluble codificado por el segmento de DNA.

En otro aspecto, el presente invento proporciona una construcción de DNA que codifica una proteína de fusión, construcción de DNA que comprende: un primer segmento de DNA que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: (a) la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 20 (Gly); (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro); (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn); (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp); (e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg); (f) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg); (g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 227 (Trp) al número de aminoácido 249 (Trp); (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 227 (Trp) al número de aminoácido 491 (Arg); (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 227 (Trp) al número de aminoácido 520 (Arg); (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg); (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg); (l) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg); (m) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg); (n) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); (o) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y (p) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 211 (Ser); y al menos otro segmento de DNA que codifica un polipéptido adicional, en que el primer segmento de DNA y el otro segmento de DNA están conectados en marco, y en que el primer segmento de DNA y el otro segmento de DNA codifican la proteína de fusión.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente enlazados: un promotor de la transcripción; una construcción de DNA que codifica una proteína de fusión de acuerdo con la Reivindicación 13; y un terminador de la transcripción; en que el promotor está operativamente enlazado con la construcción de DNA, y la construcción de DNA está operativamente enlazada con el terminador de la transcripción.

En otro aspecto, el presente invento proporciona una célula cultivada que comprende un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 14, en que la célula expresa un polipéptido codificado por la construcción de DNA.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un método para producir una proteína de fusión, que comprende: cultivar una célula de acuerdo con la Reivindicación 15 y aislar el polipéptido producido por la célula.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de restos de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro); (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn); (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp); (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg); (e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg); (f) una secuencia de

aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg); (g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg); (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg); (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg); (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y (l) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 211 (Ser). En una realización, el polipéptido aislado es como se describió anteriormente, en que el polipéptido consiste en una secuencia de restos de aminoácido que es seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro); (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn); (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp); (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg); (e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg); (f) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg); (g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg); (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg); (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg); (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y (l) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 211 (Ser). En otra realización, el polipéptido aislado es como se describió anteriormente, en que el polipéptido comprende además un dominio transmembranal que consiste en los restos 227 (Trp) a 249 (Trp) de la ID. SEC. nº 2. En otra realización, el polipéptido aislado es como se describió anteriormente, en que el polipéptido comprende además un dominio intracelular que consiste en los restos 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg) de la ID. SEC. nº 2, o del 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg) de la ID. SEC. nº 19. En otra realización, el polipéptido aislado es como se describió anteriormente, en que el polipéptido presenta actividad según se mide por proliferación celular o por activación de la transcripción de un gen informador, o en que el polipéptido codificado por el polinucleótido se une además a un anticuerpo, en que el anticuerpo es generado contra un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro); (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn); (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp); (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg); (e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg); (f) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg); (g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg); (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg); (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg); (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y (l) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 211 (Ser); y en que la unión del anticuerpo con el polipéptido aislado es medida mediante un ensayo biológico o bioquímico que incluye radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, transferencia Western o ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un método para producir un polipéptido, que comprende: cultivar una célula de acuerdo con la Reivindicación 8 y aislar el polipéptido producido por la célula.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un polipéptido aislado que comprende un segmento de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn); (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 4; (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y (d) secuencias que son al menos 90% idénticas a las de (a), (b) o (c), en que el polipéptido carece sustancialmente de dominios transmembranales e intracelulares ordinariamente asociados con receptores hematopoyéticos.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un método para producir un polipéptido, que comprende: cultivar una célula de acuerdo con la Reivindicación 12 y aislar el polipéptido producido por la célula.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un método para producir un anticuerpo contra un polipéptido, que comprende: inocular a un animal un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polipéptido que consiste en de 50 a 471 aminoácidos, en que el polipéptido comprende una secuencia contigua de aminoácidos de la ID. SEC. n° 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg); (b) un polipéptido que
5 consiste en de 50 a 500 aminoácidos, en que el polipéptido comprende una secuencia contigua de aminoácidos de la ID. SEC. n° 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg); (c) un polipéptido que consiste en de 50 a 191 aminoácidos, en que el polipéptido comprende una secuencia contigua de aminoácidos de la ID. SEC. n° 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); (d) un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 18; (e) un polipéptido que comprende del número de aminoácido 21 (Arg) al 119 (Tyr) de la ID.
10 SEC. n° 2; (f) un polipéptido que comprende del número de aminoácido 125 (Pro) al 223 (Pro) de la ID. SEC. n° 2; (g) un polipéptido que comprende un péptido hidrófilo de la ID. SEC. n° 2, según se pronostica a partir de un gráfico de hidrofobia usando un perfil Hopp/Woods de hidrofilia basado en una ventana deslizante de seis restos, ignorándose los restos G, S y T enterrados y los restos H, Y y W expuestos; y en que el polipéptido provoca una respuesta inmune en el animal para producir el anticuerpo; y aislar el anticuerpo del animal.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un anticuerpo producido mediante el método de la Reivindicación 25, que se une específicamente con un polipéptido de ID. SEC. n° 2, ID. SEC. n° 19 o ID. SEC. n° 21. En una realización, el anticuerpo anteriormente descrito es un anticuerpo monoclonal.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido como el anteriormente descrito.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un método para detectar, en una muestra de ensayo, la presencia de un modulador de la actividad de una proteína receptora de citocinas, que comprende: cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 6, en que la célula expresa la proteína codificada por el segmento de DNA, en presencia y ausencia de una muestra de ensayo; comparar, mediante un ensayo biológico o bioquímico, los niveles de actividad de la proteína en presencia y ausencia de una muestra de ensayo; y determinar, a partir de la comparación, la presencia de un modulador de la actividad de la proteína receptora de citocinas en la muestra de ensayo.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un método para detectar un ligando de receptor citocínico en una muestra de ensayo, que comprende: poner una muestra de ensayo en contacto con un polipéptido receptor de citocinas que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 4; (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn) y (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y detectar la unión del polipéptido receptor de citocinas con un ligando en la muestra. En una realización, el método para detectar un ligando de receptor citocínico es como se describió anteriormente, en que el polipéptido receptor de citocinas está unido a la membrana de una célula cultivada, y la operación de detección comprende medir una respuesta biológica en la célula cultivada. En otra realización, el método para detectar un ligando de receptor citocínico es como se describió anteriormente, en que la respuesta biológica es proliferación celular o activación de la transcripción de un gen informador.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un método para detectar una anomalía genética en un paciente, que comprende: obtener una muestra genética de un paciente; producir un primer producto de reacción al incubar la muestra genética con un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 18 o ID. SEC. n° 20 o del complemento de la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 18 o ID. SEC. n° 20, en unas condiciones bajo las cuales dicho polinucleótido se hibrida con la secuencia polinucleotídica complementaria; visualizar el primer producto de reacción; y comparar dicho primer producto de reacción con un producto de reacción testigo procedente de un paciente de tipo silvestre, en que una diferencia entre dicho primer producto de reacción y dicho producto de reacción testigo es indicativa de una anomalía genética en el paciente.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un método para detectar un cáncer en un paciente, que comprende: obtener una muestra tisular o biológica de un paciente; incubar la muestra tisular o biológica con un anticuerpo de la Reivindicación 29 en unas condiciones bajo las cuales el anticuerpo se une con su polipéptido complementario en la muestra tisular o biológica; visualizar el anticuerpo unido en la muestra tisular o biológica; y comparar los niveles de anticuerpo unido en la muestra tisular o biológica del paciente con los de una muestra tisular o biológica testigo normal, en que un aumento del nivel de anticuerpo unido en la muestra tisular o biológica del paciente con respecto a aquél en la muestra tisular o biológica testigo normal es indicativo de un cáncer en el paciente.

En otro aspecto, el presente invento proporciona un método para detectar un cáncer en un paciente, que comprende:

obtener una muestra tisular o biológica de un paciente;

65 marcar un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 18 o ID. SEC. n° 20 o del complemento de la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 18 o ID. SEC. n° 20;

incubar la muestra tisular o biológica en unas condiciones bajo las cuales el polinucleótido se hibrida con la secuencia polinucleotídica complementaria;

visualizar el polinucleótido marcado en la muestra tisular o biológica; y

comparar el nivel de hibridación del polinucleótido marcado en la muestra tisular o biológica del paciente con el de una muestra tisular o biológica testigo normal,

en que un aumento de la hibridación del polinucleótido marcado en la muestra tisular o biológica del paciente con respecto a aquella en la muestra tisular o biológica testigo normal es indicativo de un cáncer en el paciente.

Antes de exponer el invento con detalle, para su comprensión puede resultar útil definir las expresiones siguientes:

La expresión “etiqueta de afinidad” se usa aquí para significar un segmento polipeptídico que puede ser fijado a un segundo polipéptido para proporcionar la purificación o detección del segundo polipéptido o para proporcionar sitios para la fijación del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, como etiqueta de afinidad se puede usar cualquier péptido o proteína para el que se disponga de un anticuerpo u otro agente ligante específico. Las etiquetas de afinidad incluyen una extensión de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al.*, EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson *et al.*, Methods Enzymol. 198: 3, 1991), glutatión S-transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31, 1988), la etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952-4, 1985), sustancia P, el péptido FlagTM (Hopp *et al.*, Biotechnology 6: 1204-10, 1988), un péptido ligante de estreptavidina, u otro epítipo antigénico o dominio ligante. Véase, en general, Ford *et al.*, Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991. De proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, EE.UU.) se pueden obtener DNAs que codifican etiquetas de afinidad.

La expresión “variante alélica” se usa aquí para significar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación y puede dar lugar a un polimorfismo fenotípico en las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos alteradas. La expresión “variante alélica” se usa también aquí para significar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

Las expresiones “amino-terminal” y “carboxilo-terminal” se utilizan aquí para significar posiciones en polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estas expresiones se usan con referencia a una secuencia o porción particular de un polipéptido para significar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia dispuesta carboxilo-terminalmente con respecto a una secuencia de referencia de un polipéptido está situada cerca del extremo carboxílico de la secuencia de referencia pero no está necesariamente en el extremo carboxílico del polipéptido completo.

La expresión “pareja de complemento/anticomplemento” significa grupos no idénticos que forman, bajo unas condiciones apropiadas, una pareja estable y no covalentemente asociada. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de una pareja de complemento/anticomplemento. Otras parejas de complemento/anticomplemento ejemplares incluyen parejas de receptor/ligando, parejas de anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), parejas de polinucleótidos sentido/antisentido, y similares. Cuando es deseable la subsiguiente disociación de la pareja de complemento/anticomplemento, la pareja de complemento/anticomplemento tiene preferiblemente una afinidad de unión $< 10^9 \text{ M}^{-1}$.

La expresión “complemento de una molécula polinucleotídica” significa una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de bases complementaria y una orientación inversa con respecto a una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria de 5' CCCGTGCAT 3'.

La expresión “secuencia de nucleótidos degenerada” significa una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula polinucleotídica de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos pero codifican el mismo resto de aminoácido (es decir, tanto el triplete GAU como el GAC codifican Asp).

La expresión “vector de expresión” se usa para significar una molécula de DNA, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés, operativamente enlazado con segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Tales segmentos adicionales incluyen secuencias promotoras y terminadoras y pueden incluir también uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, etc. Los vectores de expresión proceden generalmente de DNA plasmídico o vírico, o pueden contener elementos de ambos.

El término “aislado”, cuando se aplica a un polinucleótido, significa que el polinucleótido ha sido extraído de su entorno genético natural y, por ello, carece de otras secuencias de codificación extrañas o indeseadas, y está en una forma adecuada para uso en sistemas para la producción de proteínas por ingeniería genética. Dichas moléculas aisladas son aquellas que son separadas de su ambiente natural e incluyen clones de cDNA y genómicos. Las moléculas de DNA aisladas del presente invento carecen de otros genes con los que están normalmente asociadas, pero pueden

incluir regiones 5' y 3' no traducidas presentes en la naturaleza, tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para quien tiene una experiencia normal en la técnica (véase, por ejemplo, Dynan y Tijan, Nature 316: 774-78, 1985).

5 Un polipéptido o proteína "aislado" es un polipéptido o proteína que se halla en un estado distinto del de su ambiente nativo, tal como separado de sangre y de tejido animal. En una forma preferida, el polipéptido aislado carece sustancialmente de otros polipéptidos, particularmente de otros polipéptidos de origen animal. Se prefiere obtener los polipéptidos en una forma muy purificada, es decir, con una pureza superior a 95%, más preferiblemente una pureza superior a 99%. Cuando se usa en este contexto, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros, multímeros y formas alternativamente glicosiladas o derivatizadas.

La expresión "operativamente enlazado", cuando hace referencia a segmentos de DNA, indica que los segmentos están dispuestos de modo que actúan de acuerdo con sus fines previstos; por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y continúa por todo el segmento de codificación hasta el terminador.

15 El término "ortólogo" significa un polipéptido o proteína obtenido de una especie, que es el equivalente funcional de un polipéptido o proteína de una especie distinta. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la especiación.

20 Los "parálogos" son proteínas distintas, aunque estructuralmente relacionadas, generadas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen por medio de la duplicación génica. Por ejemplo, la α -globina, la β -globina y la mioglobina son parálogos entre sí.

25 Un "polinucleótido" es un polímero, de cadena sencilla o doble, de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen RNA y DNA, y pueden ser aislados de fuentes naturales, sintetizados *in vitro* o preparados a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan en pares de bases (abreviado "bp"; del inglés, base pairs), nucleótidos ("nt") o kilobases ("kb"). Cuando lo permite el contexto, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que sean de cadena sencilla o cadena doble. Cuando el término se aplica a moléculas de cadena doble, se usa para significar la longitud global y se entenderá que es equivalente a la expresión "pares de bases". Los expertos en la técnica reconocerán que las dos cadenas de un polinucleótido de cadena doble pueden diferir ligeramente en cuanto a longitud y que los extremos de las mismas pueden estar escalonados como resultado de una escisión enzimática; por lo tanto, puede que no todos los nucleótidos de una molécula polinucleotídica de cadena doble estén apareados.

35 Un "polipéptido" es un polímero de restos de aminoácido unidos por enlaces peptídicos, producido natural o sintéticamente. A los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácido se hace comúnmente referencia como "péptidos".

40 Las "sondas y/o cebadores", como aquí se usan, pueden ser RNA o DNA. El DNA puede ser cDNA o DNA genómico. Las sondas y cebadores polinucleotídicos son DNA o RNA de cadena sencilla o doble, generalmente oligonucleótidos sintéticos, pero se pueden generar a partir de secuencias de cDNA o genómicas clonadas o de sus complementos. Las sondas analíticas tendrán generalmente una longitud de al menos 20 nucleótidos, aunque se pueden utilizar sondas algo más cortas (14-17 nucleótidos). Los cebadores para PCR tienen una longitud de al menos 5 nucleótidos, preferiblemente de 15 nt o más, más preferiblemente de 20-30 nt. Se pueden utilizar polinucleótidos cortos cuando se dirigen al análisis de una pequeña región del gen. Para el análisis grosero de genes, una sonda polinucleotídica puede comprender un exón entero o más. Las sondas pueden ser marcadas para proporcionar una señal detectable, tal como con una enzima, biotina, un radionucleido, un fluoróforo, un agente quimioluminiscente, una partícula paramagnética y similares, que son comercialmente asequibles de muchas fuentes, tales como Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, EE.UU., y Amersham Corp., Arlington Heights, Illinois, EE.UU., utilizando técnicas que son bien conocidas en este campo técnico.

55 El término "promotor" se usa aquí por su significado, reconocido en la técnica, que indica una porción de un gen que contiene secuencias de DNA que proporcionan la unión de la RNA polimerasa y la iniciación de la transcripción. Las secuencias promotoras se hallan comúnmente, aunque no siempre, en las regiones no codificadoras 5' de los genes.

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

65 El término "receptor" se usa aquí para significar una proteína celularmente asociada, o una subunidad polipeptídica de dicha proteína, que se une a una molécula bioactiva (el "ligando") y media en el efecto del ligando sobre la célula. La unión del ligando al receptor da lugar a un cambio conformacional en el receptor (y, en algunos casos, a la multimerización de receptores, es decir, a la asociación de subunidades de receptor idénticas o diferentes), lo que causa interacciones entre el(los) dominio(s) efector(es) y otra(s) molécula(s) en la célula. A su vez, estas interacciones conducen a alteraciones del metabolismo de la célula. Los procesos metabólicos que están ligados a interacciones

receptor-ligando incluyen la transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, proliferación celular, aumentos de producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. Los receptores citocínicos de la superficie celular se caracterizan por una estructura de múltiples dominios, como se discute más adelante con mayor detalle. Estos receptores están anclados a la membrana celular por un dominio transmembranal caracterizado por una secuencia de restos de aminoácido hidrófobos (típicamente, aproximadamente 21-25 restos), que está comúnmente flanqueada por restos positivamente cargados (Lys o Arg). En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser citosólicos o ser nucleares, y ser monómeros (por ejemplo, el receptor de la hormona estimulante del tiroides y el receptor beta-adrenérgico) o multímeros (por ejemplo, el receptor de PDGF, el receptor de la hormona del crecimiento, el receptor de IL-3, el receptor de GM-CSF, el receptor de G-CSF, el receptor de eritropoyetina y el receptor de IL-6). La expresión “polipéptido receptor” se usa aquí para significar cadenas polipeptídicas receptoras completas y porciones de las mismas, incluyendo dominios funcionales aislados (por ejemplo, dominios de unión a ligandos). Las expresiones “dominio(s) de unión a ligandos” y “dominio(s) de unión a citocinas” se pueden usar indistintamente.

Una “secuencia señal secretora” es una secuencia de DNA que codifica un polipéptido (un “péptido secretor”) que, como componente de un polipéptido más grande, dirige al polipéptido más grande a través de una ruta secretora de una célula en que es sintetizado. El péptido más grande es comúnmente escindido para que se separe el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

Un “receptor soluble” es un polipéptido receptor que no está unido a una membrana celular. Los receptores solubles son muy comúnmente polipéptidos receptores que se unen a ligandos, que carecen de dominios transmembranales y citoplásmicos. Los receptores solubles pueden comprender restos de aminoácido adicionales, tales como etiquetas de afinidad que proporcionan la purificación del polipéptido o proporcionan sitios para la fijación del polipéptido a un sustrato, o secuencias de regiones constantes inmunoglobulínicas. Muchos receptores de la superficie celular tienen equivalentes solubles presentes en la naturaleza que se producen por proteólisis. Se dice que los polipéptidos receptores solubles están sustancialmente exentos de segmentos polipeptídicos transmembranales e intracelulares cuando carecen de suficientes porciones de estos segmentos para proporcionar el anclaje a la membrana o la transducción de señales, respectivamente.

La expresión “variante de corte y empalme” se usa aquí para significar formas alternativas del RNA transcrito a partir de un gen. La variación por corte y empalme surge naturalmente del uso de sitios de corte y empalme alternativos en una molécula de RNA transcrita o, menos comúnmente, entre moléculas de RNA separadamente transcritas, y puede dar lugar a varios mRNAs transcritos a partir del mismo gen. Las variantes de corte y empalme pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos alteradas. La expresión “variante de corte y empalme” se usa también aquí para significar una proteína codificada por una variante de corte y empalme de un mRNA transcrito a partir de un gen.

Se entenderá que los pesos y longitudes moleculares de los polímeros, determinados mediante métodos analíticos inexactos (por ejemplo, electroforesis en gel), son valores aproximados. Cuando tal valor se expresa como “aproximadamente” X, se entenderá que el valor indicado de X es exacto hasta $\pm 10\%$.

Todas las referencias aquí citadas se incorporan por referencia en su totalidad.

Las subunidades de los receptores citocínicos se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio de unión a ligandos y un dominio efector que está típicamente implicado en la transducción de señales. Los receptores citocínicos multímeros incluyen homodímeros [por ejemplo, las isoformas $\alpha\alpha$ y $\beta\beta$ del receptor de PDGF, el receptor de eritropoyetina, MPL (receptor de trombopoyetina), y el receptor de G-CSF], heterodímeros, cada uno de cuyas subunidades posee dominios efectores y de unión a ligandos (por ejemplo, la isoforma $\alpha\beta$ del receptor de PDGF), y multímeros que tienen subunidades componentes con funciones dispares (por ejemplo, los receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 y GM-CSF). Algunas subunidades del receptor son comunes a una pluralidad de receptores. Por ejemplo, la subunidad AIC2B, que no puede unirse al ligando por sí misma pero incluye un dominio intracelular de transducción de señales, es un componente de los receptores de IL-3 y GM-CSF. Muchos receptores citocínicos pueden ser dispuestos en una de cuatro familias relacionadas, basándose en sus estructuras y funciones. Por ejemplo, los receptores hematopoyéticos de clase I se caracterizan por la presencia de un dominio que contiene restos de cisteína conservados y el motivo WSXWS (ID. SEC. n° 5). En ciertos receptores hematopoyéticos están presentes dominios adicionales, incluyendo dominios proteína cinasas, dominios de fibronectina de tipo III, y dominios inmunoglobulínicos que se caracterizan por bucles enlazados por disulfuros. La estructura de los receptores citocínicos ha sido revisada por Urdal, Ann. Reports Med. Chem. 26: 221-228, 1991, y Cosman, Cytokine 5: 95-106, 1993. Se cree generalmente que, bajo una presión selectiva que hace que los organismos adquieran nuevas funciones biológicas, surgen nuevos miembros de la familia de receptores a partir de la duplicación de genes de receptor existentes, lo que conduce a la existencia de familias multigénicas. De este modo, los miembros familiares contienen vestigios del gen ancestral, y estos rasgos característicos pueden ser explotados en el aislamiento y la identificación de miembros familiares adicionales.

Los receptores citocínicos de la superficie celular se caracterizan además por la presencia de dominios adicionales. Estos receptores están anclados a la membrana celular por un dominio transmembranal caracterizado por una secuencia de restos de aminoácido hidrófobos (típicamente, aproximadamente 21-25 restos), que está comúnmente flanqueada por restos positivamente cargados (Lys o Arg). En el extremo opuesto de la proteína a partir del dominio extracelular, y separado de él por el dominio transmembranal, hay un dominio intracelular.

El receptor zcytor19 del presente invento es un receptor citocínico de clase II. Estos receptores se unen normalmente a citocinas con haces de cuatro hélices. La interleucina 10 y los interferones tienen receptores de esta clase (por ejemplo, las cadenas alfa y beta del interferón gamma y las cadenas alfa y beta del receptor del interferón alfa/beta). Los receptores citocínicos de clase II se caracterizan por la presencia de uno o más módulos de receptor citocínico (CRM; del inglés, cytokine receptor modules) en sus dominios extracelulares. Otros receptores citocínicos de clase II incluyen zcytor11 (Patente de EE.UU. n° 5.965.704 comúnmente reconocida), CRF2-4 (número de acceso de Genbank: Z17227), IL-10R (números de acceso de Genbank: U00672 y NM_001558), DIRS1, zcytor7 (Patente de EE.UU. n° 5.945.511 comúnmente reconocida), zcytor16, el factor tisular, y similares. Los CRMs de los receptores citocínicos de clase II son algo distintos de los mejor conocidos CRMs de los receptores citocínicos de clase I. Aunque los CRMs de clase II contienen dos dominios de tipo fibronectina de tipo III, difieren en su organización.

Zcytor19, como todos los receptores de clase II conocidos salvo la cadena alfa del receptor del interferón alfa/beta, sólo tiene un único CRM de clase II en su dominio extracelular. Zcytor19 es un receptor de una citocina helicoidal de la clase del interferón/IL 10. Como se afirmó anteriormente, zcytor19 es similar a otros receptores citocínicos de clase II tales como zcytor11 y zcytor16. El análisis de un clon de cDNA humano que codifica zcytor19 (ID. SEC. n° 1) reveló un marco de lectura abierto que codifica 491 aminoácidos (ID. SEC. n° 2) que comprenden una secuencia señal secretora [restos 1 (Met) a 20 (Gly) de la ID. SEC. n° 2] y un polipéptido receptor citocínico zcytor19 maduro [restos 21 (Arg) a 491 (Arg) de la ID. SEC. n° 2] que comprende un dominio extracelular de unión a ligandos, de aproximadamente 206 restos de aminoácido [restos 21 (Arg) a 226 (Asn) de la ID. SEC. n° 2], un dominio transmembranal de aproximadamente 23 restos de aminoácido [restos 227 (Trp) a 249 (Trp) de la ID. SEC. n° 2] y un dominio intracelular de aproximadamente 242 restos de aminoácido [restos 250 (Lys) a 491 (Arg) de la ID. SEC. n° 2]. Dentro del dominio extracelular de unión a ligandos, hay dos dominios de fibronectina de tipo III y una región conectora. El primer dominio de fibronectina de tipo III comprende los restos 21 (Arg) a 119 (Tyr) de la ID. SEC. n° 2, el conector comprende los restos 120 (Leu) a 124 (Glu) de la ID. SEC. n° 2, y el segundo dominio de fibronectina de tipo III es corto y comprende los restos 125 (Pro) a 223 (Pro) de la ID. SEC. n° 2. De esta manera, un polipéptido que comprenda los aminoácidos 21 (Arg) a 223 (Pro) de la ID. SEC. n° 2 (ID. SEC. n° 4) es considerado un fragmento de unión a ligandos. Además, como se conservan típicamente en los receptores de clase II, hay restos de triptófano conservados que comprenden los restos 43 (Trp) y 68 (Trp), como se muestra en la ID. SEC. n° 2, y restos de cisteína conservados en las posiciones 74, 82, 195 y 217 de la ID. SEC. n° 2.

Además, el presente invento incluye una variante del receptor zcytor19 que incluye una inserción de aproximadamente 30 aminoácidos en el dominio intracelular del polipéptido (en cuanto a la ID. SEC. n° 2). El análisis de un clon de cDNA humano que codifica zcytor19 (ID. SEC. n° 18) reveló un marco de lectura abierto que codifica 520 aminoácidos (ID. SEC. n° 19) que comprenden una secuencia señal secretora [restos 1 (Met) a 20 (Gly) de la ID. SEC. n° 19] y un polipéptido receptor citocínico zcytor19 maduro [restos 21 (Arg) a 520 (Arg) de la ID. SEC. n° 19] que comprende un dominio extracelular de unión a ligandos, de aproximadamente 206 restos de aminoácido [restos 21 (Arg) a 226 (Asn) de la ID. SEC. n° 19], un dominio transmembranal de aproximadamente 23 restos de aminoácido [restos 227 (Trp) a 249 (Trp) de la ID. SEC. n° 19] y un dominio intracelular de aproximadamente 271 restos de aminoácido [restos 250 (Lys) a 520 (Arg) de la ID. SEC. n° 19]. En el dominio extracelular de unión a ligandos, hay dos dominios de fibronectina de tipo III y una región conectora. El primer dominio de fibronectina de tipo III comprende los restos 21 (Arg) a 119 (Tyr) de la ID. SEC. n° 19, el conector comprende los restos 120 (Leu) a 124 (Glu) de la ID. SEC. n° 19, y el segundo dominio de fibronectina de tipo III comprende los restos 125 (Pro) a 223 (Pro) de la ID. SEC. n° 19. De este modo, un polipéptido que comprenda los aminoácidos 21 (Arg) a 223 (Pro) de la ID. SEC. n° 19 (ID. SEC. n° 4) es considerado un fragmento de unión a ligandos. Además, como se conservan típicamente en los receptores de clase II, hay restos de triptófano conservados que comprenden los restos 43 (Trp) y 68 (Trp), como se muestra en la ID. SEC. n° 19, y restos de cisteína conservados en las posiciones 74, 82, 195 y 217 de la ID. SEC. n° 19.

Además, parece que se expresa naturalmente una forma soluble truncada del polipéptido receptor zcytor19. El análisis de un clon de cDNA humano que codifica el zcytor19 soluble truncado (ID. SEC. n° 20) reveló un marco de lectura abierto que codifica 211 aminoácidos (ID. SEC. n° 21) que comprenden una secuencia señal secretora [restos 1 (Met) a 20 (Gly) de la ID. SEC. n° 21] y un polipéptido receptor zcytor19 soluble truncado maduro [restos 21 (Arg) a 211 (Ser) de la ID. SEC. n° 21] que comprende un dominio extracelular truncado de unión a ligandos, de aproximadamente 143 restos de aminoácido [restos 21 (Arg) a 163 (Trp) de la ID. SEC. n° 21], sin dominio transmembranal pero con un dominio adicional de aproximadamente 48 restos de aminoácido [restos 164 (Lys) a 211 (Ser) de la ID. SEC. n° 21]. Dentro del dominio extracelular truncado de unión a ligandos, hay dos dominios de fibronectina de tipo III y una región conectora. El primer dominio de fibronectina de tipo III comprende los restos 21 (Arg) a 119 (Tyr) de la ID. SEC. n° 21, el conector comprende los restos 120 (Leu) a 124 (Glu) de la ID. SEC. n° 21, y el segundo dominio de fibronectina de tipo III comprende los restos 125 (Pro) a 163 (Trp) de la ID. SEC. n° 21. De esta manera, un polipéptido que comprenda los aminoácidos 21 (Arg) a 163 (Trp) de la ID. SEC. n° 21 es considerado un fragmento de unión a ligandos. Además, como se conservan típicamente en los receptores de clase II, hay restos de triptófano conservados que comprenden los restos 43 (Trp) y 68 (Trp), como se muestra en la ID. SEC. n° 21, y hay restos de cisteína conservados en esta forma soluble truncada del receptor zcytor19 en las posiciones 74 y 82 de la ID. SEC. n° 21.

Además, se puede expresar naturalmente un polipéptido zcytor19 del presente invento en que el dominio extracelular de unión a ligandos comprende 5-15 restos de aminoácido adicionales en el extremo N del polipéptido maduro, o el dominio extracelular de unión a citocinas o el fragmento de unión a citocinas, como se describió anteriormente.

Los expertos en la técnica reconocerán que los límites de estos dominios son aproximados y se basan en alineaciones con proteínas conocidas y en predicciones sobre la plegadura proteica. Es posible la supresión de restos de los extremos de los dominios. Además, las regiones, dominios y motivos anteriormente descritos en relación con la ID. SEC. nº 2 son también como se muestran en la ID. SEC. nº 1; los dominios y motivos anteriormente descritos en relación con la ID. SEC. nº 19 son también como se muestran en la ID. SEC. nº 18; y los dominios y motivos anteriormente descritos en relación con la ID. SEC. nº 21 son también como se muestran en la ID. SEC. nº 20.

La presencia de regiones transmembranales y de motivos conservados y de baja variación se correlaciona generalmente con, o define, importantes regiones estructurales en las proteínas. Regiones de baja variación (por ejemplo, agregados hidrófobos) están generalmente presentes en regiones de importancia estructural (P. Sheppard *et al.*, Gene 150: 163-167, 1994). Dichas regiones de baja variación contienen a menudo aminoácidos raros o infrecuentes, tal como el triptófano. Las regiones que flanquean, y están situadas entre, dichos motivos conservados y de baja variación pueden ser más variables, pero a menudo son funcionalmente significativas porque se pueden relacionar con, o definir, estructuras y actividades importantes tales como los dominios ligantes, las actividades biológica y enzimática, la transducción de señales, la interacción célula-célula, los dominios de localización tisular, y similares.

Las regiones de restos de aminoácido conservados de zcytor19 anteriormente descritas pueden ser utilizadas como herramientas para identificar nuevos miembros familiares. Por ejemplo, se puede usar la transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR; del inglés, reverse transcription-polymerase chain reaction) para multiplicar secuencias que codifican las regiones conservadas, a partir de RNA obtenido de una diversidad de fuentes tisulares o líneas celulares. En particular, para este fin, son útiles los cebadores muy degenerados diseñados a partir de las secuencias de zcytor19. Un experto en la técnica puede llevar fácilmente a cabo el diseño y la utilización de dichos cebadores degenerados.

El presente invento proporciona moléculas polinucleotídicas, incluyendo moléculas de DNA y RNA, que codifican los polipéptidos zcytor19 aquí descritos. Los expertos en la técnica reconocerán que, a la vista de la degeneración del código genético, es posible una considerable variación secuencial entre estas moléculas polinucleotídicas. La ID. SEC. nº 3 es una secuencia de DNA degenerada que abarca todos los DNAs que codifican el polipéptido zcytor19 de la ID. SEC. nº 2; la ID. SEC. nº 28 es una secuencia de DNA degenerada que abarca todos los DNAs que codifican el polipéptido zcytor19 de ID. SEC. nº 19; y la ID. SEC. nº 29 es una secuencia de DNA degenerada que abarca todos los DNAs que codifican el polipéptido zcytor19 de la ID. SEC. nº 21. Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias degeneradas de la ID. SEC. nº 3, ID. SEC. nº 28 e ID. SEC. nº 29 también proporcionan todas las secuencias de RNA que codifican la ID. SEC. nº 2, ID. SEC. nº 19 e ID. SEC. nº 21 al sustituir T por U. De esta manera, el presente invento contempla polinucleótidos que codifican polipéptidos zcytor19, que comprenden del nucleótido 1 al nucleótido 1473 de la ID. SEC. nº 3, del nucleótido 1 al nucleótido 1560 de la ID. SEC. nº 28, del nucleótido 1 al nucleótido 633 de la ID. SEC. nº 29, y sus RNAs equivalentes. Además, en el presente invento se incluyen subfragmentos de estas secuencias degeneradas, tales como las formas maduras de los polipéptidos, los dominios extracelulares, los dominios de unión a citocinas, los dominios intracelulares y similares, como aquí se describen. Un experto en la técnica, tras referencia a la ID. SEC. nº 2, la ID. SEC. nº 19 y la ID. SEC. nº 21, y a los subfragmentos de las mismas aquí descritos, podría determinar fácilmente los respectivos nucleótidos de la ID. SEC. nº 3, la ID. SEC. nº 28 o la ID. SEC. nº 29 que codifican esos subfragmentos. En la Tabla 1 se exponen los códigos de una letra usados en la ID. SEC. nº 3 para representar posiciones nucleotídicas degeneradas. "Resoluciones" son los nucleótidos representados por una letra del código. "Complemento" indica el código para el(los) nucleótido(s) complementario(s). Por ejemplo, el código Y representa C o T, y su complemento R representa A o G, siendo A complementario de T y siendo G complementario de C.

TABLA 1

Nucleótido	Resolución	Complemento	Resolución
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A/G	Y	C/T
Y	C/T	R	A/G
M	A/C	K	G/T
K	G/T	M	A/C
S	C/G	S	C/G
W	A/T	W	A/T
H	A/C/T	D	A/G/T

ES 2 334 888 T3

	B	C/G/T	V	A/C/G
5	V	A/C/G	B	C/G/T
	D	A/G/T	H	A/C/T
10	N	A/C/G/T	N	A/C/G/T

En la Tabla 2 se exponen los codones degenerados utilizados en la ID. SEC. nº 3, que abarcan todos los posibles codones para un aminoácido dado.

TABLA 2

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

Asn/Asp	B	RAY
Glu/Gln	Z	SAR
Cualquiera	X	NNN

Quien tiene una experiencia normal en la técnica apreciará que se introduce cierta ambigüedad a la hora de determinar un codón degenerado, representativo de todos los posibles codones que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar arginina (AGR), y el codón degenerado para arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre los codones que codifican fenilalanina y leucina. De este modo, algunos polinucleótidos abarcados por la secuencia degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, aunque quien tiene una experiencia normal en la técnica puede identificar fácilmente dichas secuencias variantes por referencia a la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 2, la ID. SEC. nº 19 y/o la ID. SEC. nº 21. Las secuencias variantes pueden ser fácilmente ensayadas en cuanto a funcionalidad como aquí se describe.

Quien tiene una experiencia normal en la técnica también apreciará que especies diferentes pueden presentar “utilización de codones preferentes”; véanse, en general, Grantham *et al.*, Nuc. Acids Res. 8: 1893-912, 1980; Haas *et al.*, Curr. Biol. 6: 315-24, 1996; Wain-Hobson *et al.*, Gene 13: 355-64, 1981; Grosjean y Fiers, Gene 18: 199-209, 1982; Holm, Nuc. Acids Res. 14: 3075-87, 1986; e Ikemura, J. Mol. Biol. 158: 573-97, 1982. Como se usa aquí, la expresión “utilización de codones preferentes” o “codones preferentes” es una expresión de la técnica que se refiere a los codones de traducción a proteínas que son más frecuentemente usados en las células de cierta especie, favoreciéndose por ello uno o algunos codones representativos de los posibles codones que codifican cada aminoácido (véase la Tabla 2). Por ejemplo, el aminoácido treonina (Thr) puede ser codificado por ACA, ACC, ACG o ACT pero, en células de mamífero, ACC es el codón más comúnmente usado; en otras especies, tales como, por ejemplo, células de insectos, levaduras, virus o bacterias, pueden ser preferentes otros codones para Thr. Los codones preferentes para una especie particular pueden ser introducidos en los polinucleótidos del presente invento mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codones preferentes en DNA recombinante puede, por ejemplo, potenciar la producción de la proteína al hacer que la traducción a proteína sea más eficaz en un tipo celular o una especie particulares. Por lo tanto, la secuencia de codones degenerados descrita en la ID. SEC. nº 3 sirve como un molde para optimizar la expresión de polinucleótidos zcytor19 en diversos tipos celulares y especies comúnmente usados en la técnica y aquí descritos. Las secuencias que contienen codones preferentes pueden ser ensayadas y optimizadas en cuanto a su expresión en diversas especies, y ensayadas en cuanto a su funcionalidad como aquí se describe.

En realizaciones preferidas del invento, los polinucleótidos aislados se hibridarán con regiones de similar tamaño de la ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 18 o ID. SEC. nº 20, o con una secuencia complementaria de la misma, bajo condiciones rigurosas. En general, se seleccionan unas condiciones rigurosas para que la temperatura sea aproximadamente 5°C menor que el punto de fusión térmico (T_m) de la secuencia específica para una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente apareada. En la técnica se conocen numerosas ecuaciones para calcular T_m , que son específicas para DNA, RNA e híbridos de DNA-RNA, y secuencias de sondas polinucleotídicas de longitud variable [véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, segunda edición (Cold Spring Harbor Press, 1989); Ausubel *et al.* (redactores), “Current Protocols in Molecular Biology” (John Wiley and Sons, Inc., 1987); Berger y Kimmel (redactores), “Guide to Molecular Cloning Techniques” (Academic Press, Inc., 1987); y Wetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227 (1990)]. Los softwares para análisis de secuencias, tales como OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, Minnesota, EE.UU.) y Primer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, California, EE.UU.), así como sitios de Internet, son herramientas asequibles para analizar una secuencia dada y calcular la T_m basándose en criterios definidos por el usuario. Dichos programas permiten analizar también una secuencia dada bajo unas condiciones definidas e identificar secuencias de sondas adecuadas. Típicamente, la hibridación de secuencias polinucleotídicas más largas (por ejemplo, de > 50 pares de bases) se lleva a cabo a temperaturas de aproximadamente 20-25°C por debajo de la T_m calculada. Para sondas más pequeñas (por ejemplo, de < 50 pares de bases), la hibridación se lleva típicamente a cabo a la T_m o a 5-10°C por debajo. Esto permite la máxima velocidad de hibridación para híbridos de DNA-DNA y DNA-RNA. Se pueden alcanzar grados mayores de rigor a temperaturas más bajas con la adición de formamida, que reduce la T_m del híbrido aproximadamente 1°C por cada 1% de formamida en la disolución tampón. Las condiciones de hibridación rigurosas adecuadas son equivalentes a una incubación de aproximadamente 5 horas a toda la noche, a aproximadamente 42°C, en una disolución que comprende: aproximadamente 40-50% de formamida, SSC hasta aproximadamente 6X, disolución de Denhardt aproximadamente 5X, sulfato de dextrano en una concentración de cero hasta aproximadamente 10%, y aproximadamente 10-20 µg/ml de DNA portador desnaturalizado, comercialmente asequible. Generalmente, dichas condiciones rigurosas incluyen temperaturas de 20-70°C y un tampón de hibridación que contiene SSC hasta 6X y 0-50% de formamida; la hibridación va luego seguida de filtros de lavado en SSC hasta aproximadamente 2X. Por ejemplo, un rigor de lavado adecuado es equivalente a SSC 0,1X a SSC 2X, y SDS al 0,1%, a una temperatura de 55°C a 65°C. Se pueden utilizar grados diferentes de rigor durante la hibridación y el lavado para alcanzar la máxima unión específica a la secuencia diana. Típicamente, después de la hibridación, los lavados se llevan a cabo en grados crecientes de rigor para separar las sondas polinucleotídicas no hibridadas de los complejos hibridados. Las condiciones de hibridación y lavado rigurosas dependen de la longitud de la sonda, reflejada en la T_m , y de las disoluciones de hibridación y lavado utilizadas, y son rutinariamente determinadas de forma empírica por quien tiene experiencia en la técnica.

Como se indicó previamente, los polinucleótidos aislados del presente invento incluyen DNA y RNA. Los métodos para preparar DNA y RNA son bien conocidos en la técnica. En general, se aísla RNA de un tejido o una célula que produce grandes cantidades de RNA de *zcyc19*. Dichos tejidos y células se identifican por transferencia Northern (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201, 1980) e incluyen PBLs, bazo, timo, médula ósea, tejidos linfáticos, líneas celulares de eritroleucemia humana, líneas celulares de leucemia monocítica aguda, líneas tisulares o celulares de leucemias de células B y células T, otras líneas celulares linfoides y hematopoyéticas, y similares. Se puede preparar RNA total utilizando extracción con isotiocianato de guanidinio, seguida de aislamiento por centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin *et al.*, Biochemistry 18: 52-94, 1979). Se prepara RNA poli(A)⁺ a partir del RNA total utilizando el método de Aviv y Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408-12, 1972). Se prepara DNA complementario (cDNA) a partir del RNA poli(A)⁺ usando métodos conocidos. Alternativamente, se puede aislar DNA genómico. Los polinucleótidos que codifican polipéptidos *zcyc19* son luego identificados y aislados mediante, por ejemplo, hibridación o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis, Patente de EE.UU. n° 4.683.202).

Mediante procedimientos de clonación convencionales se puede obtener un clon de longitud completa que codifica *zcyc19*. Se prefieren clones de DNA complementario (cDNA) aunque, para ciertas aplicaciones (por ejemplo, la expresión en animales transgénicos), puede resultar preferible utilizar un clon genómico o modificar un clon de cDNA para que incluya al menos un intrón genómico. Los métodos para preparar clones de cDNA y genómicos son bien conocidos y están dentro del nivel de experiencia normal en la técnica, e incluyen el uso de la secuencia aquí descrita, o de partes de la misma, para sondear o cebar un banco. Los bancos de expresión pueden ser sondados con anticuerpos contra *zcyc19*, fragmentos de receptor, u otras parejas ligantes específicas.

Los polinucleótidos del presente invento pueden ser también sintetizados utilizando máquinas para síntesis de DNA. Actualmente, el método de elección es el método de la fosforamidita. Si se requiere DNA de doble cadena químicamente sintetizado para una aplicación tal como la síntesis de un gen o un fragmento génico, cada cadena complementaria se prepara entonces separadamente. La producción de polinucleótidos cortos [de 60 a 80 pares de bases (bp; del inglés, *base pairs*)] es técnicamente sencilla y puede ser llevada a cabo sintetizando las cadenas complementarias e hibridándolas luego. Sin embargo, para producir polinucleótidos más largos (de > 300 bp), se emplean normalmente estrategias especiales porque la eficacia de copulación de cada ciclo durante la síntesis química de DNA raramente es 100%. Para solventar este problema, se ensamblan genes sintéticos (de cadena doble) de forma modular a partir de fragmentos de cadena sencilla que tienen una longitud de 20 a 100 nucleótidos.

Un modo alternativo para preparar un gen de longitud completa es sintetizar un conjunto especificado de oligonucleótidos solapantes (de 40 a 100 nucleótidos). Una vez que se han hibridado las cortas regiones complementarias solapantes 3' y 5' (de 6 a 10 nucleótidos), aún quedan grandes huecos, pero las cortas regiones apareadas por bases son suficientemente largas y suficientemente estables para mantener unida la estructura. Se rellenan los huecos y se completa el dúplex de DNA a través de la síntesis enzimática de DNA por DNA polimerasa I de *E. coli*. Una vez que se ha completado la síntesis enzimática, los cortes son sellados con DNA ligasa de T4. Las construcciones de doble cadena son sucesivamente enlazadas entre sí para formar la secuencia génica completa que es verificada mediante un análisis de la secuencia de DNA. Véanse Glick y Pasternak, "Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA" (ASM Press, Washington, D.C., EE.UU., 1994); Itakura *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 53: 323-56, 1984; y Climie *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 633-7, 1990. Además, se añaden generalmente otras secuencias que contienen señales para la iniciación y terminación apropiadas de la transcripción y la traducción.

El presente invento proporciona además polipéptidos y polinucleótidos equivalentes de otras especies (ortólogos). Estas especies incluyen, pero no se limitan a, especies de mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y otros vertebrados e invertebrados. Son particularmente interesantes los polipéptidos *zcyc19* de otras especies de mamífero, incluyendo los polipéptidos murinos, porcinos, ovinos, bovinos, caninos, felinos, equinos y de otros primates. Los ortólogos del *zcyc19* humano pueden ser clonados utilizando la información y las composiciones proporcionadas por el presente invento, en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, se puede clonar un cDNA usando mRNA obtenido de un tipo tisular o celular que expresa *zcyc19* como el aquí descrito. Las fuentes de mRNA adecuadas pueden ser identificadas al sondear transferencias Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias aquí descritas. Luego se prepara un banco a partir del mRNA de una línea tisular o celular positiva. Luego se puede aislar un cDNA que codifica *zcyc19* mediante una diversidad de métodos, tal como sondeando con un cDNA humano completo o parcial o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas basadas en las secuencias descritas. También se puede clonar un cDNA utilizando la PCR (Mullis, *supra*), usando cebadores diseñados a partir de la secuencia representativa de *zcyc19* humano aquí descrita. En un método adicional, se puede utilizar el banco de cDNA para transformar o transfectar células huésped, y se puede detectar la expresión del cDNA de interés con un anticuerpo contra el polipéptido *zcyc19*. También se pueden aplicar técnicas similares al aislamiento de clones genómicos.

Las subunidades de los receptores citocínicos se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio extracelular, un dominio transmembranal que ancla el polipéptido a la membrana celular, y un dominio intracelular. El dominio extracelular es típicamente un dominio de unión a ligandos, y el dominio intracelular es típicamente un dominio efector implicado en la transducción de señales, aunque las funciones de unión a ligandos y efectora pueden radicar en distintas subunidades de un receptor multímero. El propio dominio de unión a ligandos puede ser una estructura de múltiples dominios. Los receptores multímeros incluyen homodímeros (por ejemplo, las isoformas $\alpha\alpha$ y $\beta\beta$ del receptor de PDGF, el receptor de eritropoyetina, MPL, y el receptor de G-CSF), heterodímeros, cada uno de cuyas subunidades posee dominios efectores y de unión a ligandos (por ejemplo, la isoforma $\alpha\beta$ del receptor de PDGF), y multímeros que tienen subunidades componentes con funciones dispares (por ejemplo, los receptores

de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 y GM-CSF). Algunas subunidades del receptor son comunes a una pluralidad de receptores. Por ejemplo, la subunidad AIC2B, que no puede unirse al ligando por sí misma pero incluye un dominio intracelular de transducción de señales, es un componente de los receptores de IL-3 y GM-CSF. Muchos receptores citocínicos pueden ser dispuestos en una de cuatro familias relacionadas, basándose en sus estructuras y funciones.

- 5 Por ejemplo, los receptores hematopoyéticos se caracterizan por la presencia de un dominio que contiene restos de cisteína conservados y el motivo WSXWS (ID. SEC. n° 5). La estructura de los receptores citocínicos ha sido revisada por Urdal, *Ann. Reports Med. Chem.* 26: 221-228, 1991, y Cosman, *Cytokine* 5: 95-106, 1993. Bajo una presión selectiva que hace que los organismos adquieran nuevas funciones biológicas, surgen probablemente nuevos miembros de la familia de receptores a partir de la duplicación de genes de receptor existentes, lo que conduce a la existencia
- 10 de familias multigénicas. De este modo, los miembros familiares contienen vestigios del gen ancestral, y estos rasgos característicos pueden ser explotados en el aislamiento y la identificación de miembros familiares adicionales. De esta manera, la superfamilia de los receptores citocínicos se subdivide en varias familias: por ejemplo, la familia inmunoglobulínica (que incluye los receptores de CSF-1, MGF, IL-1 y PDGF), la familia de la hematopoyetina (que incluye la subunidad β del receptor de IL-2, la subunidad α del receptor de GM-CSF, la subunidad β del receptor de GM-CSF,
- 15 y los receptores de G-CSF, EPO, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 e IL-9), y la familia del receptor de TNF [Incluyendo los receptores de TNF (p80) y TNF (p60), CD27, CD30, CD40, Fas, y el receptor de NGF].

- El análisis de la secuencia de zcytor19 sugiere que es un miembro de la misma subfamilia de receptores que los receptores citocínicos de clase II, tales como, por ejemplo, las cadenas alfa y beta del interferón gamma y las cadenas alfa y beta del receptor del interferón alfa/beta, y los receptores zcytor11 (Patente de EE.UU. n° 5.965.704 comúnmente reconocida), CRF2-4 (número de acceso de Genbank: Z17227), DIRS1 y zcytor7 (Patente de EE.UU. n° 5.945.511 comúnmente reconocida). Los receptores de esta subfamilia se pueden asociar para formar homodímeros que transducen una señal. Varios miembros de la subfamilia (por ejemplo, los receptores que se unen al interferón, IL-10, IL-19 e IL-TIF) se combinan con una segunda subunidad (denominada subunidad β) para unirse al ligando y
- 25 transducir una señal. Las subunidades β específicas se asocian con una pluralidad de subunidades de receptor citocínico específicas. Por ejemplo, con los receptores citocínicos de clase II comúnmente reconocidos zcytor11 (Patente de EE.UU. n° 5.965.704) y CRF2-4, el receptor se heterodimeriza para unirse a la citocina IL-TIF [véanse la publicación WIPO WO 00/24758; Dumoutier *et al.*, *J. Immunol.* 164: 1814-1819, 2000; S. D. Spencer *et al.*, *J. Exp. Med* 187: 571-578, 1998; V. C. Gibbs y Pennica, *Gene* 186: 97-101, 1997 (cDNA de CRF2-4); M. H. Xie *et al.*, *J. Biol. Chem.*
- 30 275: 31.335-31.339, 2000; y S. V. Kotenko *et al.*, *J. Biol. Chem.*, manuscrito M007837200 en prensa]. Además, el receptor de IL-10 β puede estar implicado como un receptor para IL-TIF, y se cree que es sinónimo de CRF2-4 [L. Dumoutier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 10.144-10.149, 2000; Y. Liu *et al.*, *J. Immunol.* 152: 1821-1829, 1994 (cDNA de IL-10R)]. Como tales, los complejos receptores de clase II pueden ser heterodímeros o multímeros. De esta forma, el presente invento abarca receptores monómeros, homodímeros, heterodímeros y multímeros que comprenden
- 35 una subunidad de zcytor19.

- Los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia descrita en la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 18 o ID. SEC. n° 20 representa un alelo de zcytor19 humano y que se espera que se produzcan variación alélica y corte y empalme alternativos. Se pueden clonar variantes alélicas de esta secuencia al sondear bancos de cDNA o genómicos de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos estándares. Las variantes alélicas de la secuencia de DNA mostrada en la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 18 o ID. SEC. n° 20, incluyendo aquellas que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en que las mutaciones dan lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos, están dentro del alcance del presente invento, al igual que las proteínas que son variantes alélicas de la ID. SEC. n° 2, ID. SEC. n° 19 o ID. SEC. n° 21. Los cDNAs generados a partir de mRNAs alternativamente cortados y empalmados, que conservan las propiedades del polipéptido zcytor19,
- 45 están incluidos en el alcance del presente invento, al igual que los polipéptidos codificados por dichos cDNAs y mRNAs. Se pueden clonar variantes alélicas y variantes de corte y empalme de estas secuencias al sondear bancos de cDNA o genómicos de diferentes individuos o tejidos de acuerdo con procedimientos estándares conocidos en la técnica.

- El presente invento también proporciona polipéptidos zcytor19 aislados que son sustancialmente similares a los polipéptidos de ID. SEC. n° 2, ID. SEC. n° 19 o ID. SEC. n° 21 y sus ortólogos. La expresión “sustancialmente similares” se usa aquí para significar polipéptidos que tienen secuencias con una identidad de al menos 70%, más preferiblemente de al menos 80%, con respecto a las secuencias mostradas en la ID. SEC. n° 2, ID. SEC. n° 19 o ID. SEC. n° 21 o sus ortólogos. Dichos polipéptidos serán más preferiblemente al menos 90% idénticos, y muy preferiblemente 95% idénticos o más, con respecto a la ID. SEC. n° 2, ID. SEC. n° 19 o ID. SEC. n° 21 o sus ortólogos.
- 55 El porcentaje de identidad de secuencias se determina por métodos convencionales; véanse, por ejemplo, Altschul *et al.*, *Bull. Math. Bio.* 48: 603-616, 1986, y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10.915-10.919, 1992. En resumen, se alinean dos secuencias de aminoácidos para optimizar las calificaciones de alineación usando una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 1, y la matriz de calificación “blosum 62” de Henikoff y Henikoff (*ibidem*), como se muestra en la Tabla 3 (los aminoácidos son indicados mediante
- 60 los códigos de una letra estándares). Luego se calcula el porcentaje de identidad de la forma siguiente:

Número total de apareamientos idénticos

x 100

(longitud de la secuencia más larga más el número
de huecos introducidos en la secuencia más larga
con objeto de alinear las dos secuencias)

TABLA 3

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
5	4	-1	-2	-2	0	-1	-1	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
10	-1	5	0	-2	-3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	-2	-2	1	6	-3	-3	0	2	-1	-1	-3	-4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
20	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	-1	0	0	2	-4	2	5	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
30	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
35	-2	0	0	1	-3	0	0	-2	8	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
40	-1	-1	-3	-3	-1	-2	-3	-4	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
45	-1	-2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
50	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
55	-1	-3	-2	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	-1	-2	-2	-2	-2	-3	-3	-3	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
65	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

La identidad de secuencias de las moléculas polinucleotídicas se determina mediante métodos similares usando una relación como la anteriormente descrita.

Los expertos en la técnica aprecian que hay muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo "FASTA" para búsqueda de similitudes, de Pearson y Lipman, es un adecuado método de alineación de proteínas para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos aquí descrita y la secuencia de aminoácidos de un supuesto zcytor19 variante. El algoritmo FASTA es descrito por Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), y por Pearson, *Meth. Enzymol.* 183: 63 (1990).

En resumen, FASTA caracteriza en primer lugar la similitud de secuencias al identificar regiones compartidas por la secuencia en duda (por ejemplo, la ID. SEC. n° 2, ID. SEC. n° 19 o ID. SEC. n° 21) y una secuencia de ensayo que tiene la mayor densidad de identidades (si la variable ktup es 1) o parejas de identidades (si ktup = 2), sin considerar inserciones, supresiones ni sustituciones conservativas de aminoácidos. Luego se recalifican las diez regiones con la mayor densidad de identidades al comparar la similitud de todos los aminoácidos apareados usando una matriz de sustitución de aminoácidos, y se "recortan" los extremos de las regiones para incluir sólo aquellos restos que contribuyen a la máxima calificación. Si hay varias regiones con calificaciones mayores que el valor de "corte" (calculado mediante una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor de ktup), se examinan entonces las regiones iniciales recortadas para determinar si se pueden juntar las regiones para formar una alineación aproximada con huecos. Finalmente, se alinean las regiones con máxima calificación de las dos secuencias de aminoácidos utilizando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers [Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787 (1974)], el cual tiene en cuenta inserciones y supresiones de aminoácidos. Los parámetros preferidos para el análisis FASTA son: ktup = 1, penalización por apertura de hueco = 10, penalización por extensión de hueco = 1, y matriz de sustitución = BLOSUM62, con los demás parámetros ajustados a los valores por omisión. Estos parámetros pueden ser introducidos en un programa FASTA modificando el archivo de la matriz de calificación ("SMATRIX"), como se explica en el Apéndice 2 de Pearson, *Meth. Enzymol.* 183: 63 (1990).

También se puede usar FASTA para determinar la identidad de secuencias de moléculas de ácido nucleico usando una relación como la anteriormente descrita. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor de ktup puede variar de uno a seis, y preferiblemente de tres a seis, y es muy preferiblemente tres, con los demás parámetros del programa FASTA ajustados a los valores por omisión.

La tabla BLOSUM62 (Tabla 3) es una matriz de sustitución de aminoácidos derivada de aproximadamente 2.000 alineaciones múltiples locales de segmentos de secuencias proteicas, que representan regiones muy conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas [Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10.915 (1992)]. En consecuencia, las frecuencias de sustitución BLOSUM62 pueden ser usadas para definir sustituciones de aminoácidos conservativas que se pueden introducir en las secuencias de aminoácidos del presente invento. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácidos basadas únicamente en propiedades químicas (como se discute más adelante), la expresión "sustitución de aminoácido conservativa" se refiere preferiblemente a una sustitución representada por un valor BLOSUM62 superior a -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácido es conservativa si la sustitución se caracteriza por un valor BLOSUM62 de 0, 1, 2 ó 3. De acuerdo con este sistema, las sustituciones de aminoácidos conservativas preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 1 (por ejemplo, 1, 2 ó 3), mientras que las sustituciones de aminoácidos conservativas más preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 2 (por ejemplo, 2 ó 3).

Los polipéptidos zcytor19 variantes o los polipéptidos zcytor19 sustancialmente homólogos se caracterizan por tener una o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferiblemente de naturaleza menor; es decir, sustituciones de aminoácidos conservativas (véase la Tabla 4) y otras sustituciones que no afectan significativamente a la plegadura ni la actividad del polipéptido; pequeñas supresiones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas prolongaciones amino- o carboxilo-terminales, tal como un resto de metionina amino-terminal, un pequeño péptido conector de hasta aproximadamente 20-25 restos, o una etiqueta de afinidad. El presente invento incluye así polipéptidos que comprenden una secuencia que tiene una identidad de al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, y más preferiblemente 95% o más, con respecto a la correspondiente región de la ID. SEC. n° 2, ID. SEC. n° 19 o ID. SEC. n° 21, excluyendo las secuencias de etiquetas, extensiones, conectores y demás. Los polipéptidos que comprenden etiquetas de afinidad pueden comprender además un sitio de escisión proteolítica entre el polipéptido zcytor19 y la etiqueta de afinidad. Los sitios adecuados incluyen sitios de escisión por trombina y sitios de escisión por factor Xa.

TABLA 4

Sustituciones conservativas de aminoácidos

5	Básicos:	arginina
		lisina
		histidina
10	Ácidos:	ácido glutámico
		ácido aspártico
15	Polares:	glutamina
		asparagina
	Hidrófobos:	leucina
20		isoleucina
		valina
25	Aromáticos:	fenilalanina
		triptófano
		tirosina
30	Pequeños:	glicocola
		alanina
		serina
35		treonina
		metionina

40 El presente invento proporciona además una diversidad de otras fusiones polipeptídicas y proteínas multímeras relacionadas que comprenden una o más fusiones polipeptídicas. Por ejemplo, se puede preparar un polipéptido zcytor19 como una fusión con una proteína de dimerización, como se describe en las Patentes de EE.UU. números 5.155.027 y 5.567.584. A este respecto, las proteínas de dimerización preferidas incluyen dominios de regiones constantes de inmunoglobulinas. Se puede hacer que células genéticamente construidas expresen fusiones de inmunoglobulina-polipéptido zcytor19, para producir una diversidad de compuestos análogos de zcytor19 multímeros. Se pueden fusionar dominios auxiliares con polipéptidos zcytor19 para dirigirlos a células, tejidos o macromoléculas (por ejemplo, colágeno) específicas. Se puede fusionar un polipéptido zcytor19 con dos o más grupos, tales como una etiqueta de afinidad para purificación y un dominio director. Las fusiones polipeptídicas pueden comprender también uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase Tuan *et al.*, Connective Tissue Research 34: 1-9, 1996.

55 Las proteínas del presente invento pueden comprender también restos de aminoácido no presentes en la naturaleza. Los aminoácidos no presentes en la naturaleza incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, N-metilglicocola, alotreonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido piperídico, ácido tiazolidina-carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, terc-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. En la técnica se conocen diversos métodos para incorporar restos de aminoácido no presentes en la naturaleza a proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema *in vitro* en que se supriman las mutaciones sin sentido usando tRNAs supresores químicamente aminoacilados. En la técnica se conocen métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar tRNA. La transcripción y la traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se llevan a cabo en un sistema exento de células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas y otros reactivos comercialmente asequibles. Las proteínas son purificadas por cromatografía. Véanse, por ejemplo, Robertson *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 113: 2722, 1991; Ellman *et al.*, Methods Enzymol. 202: 301, 1991; Chung *et al.*, Science 259: 806-9, 1993; y Chung *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10.145-9, 1993. Con un segundo método, la traducción se lleva a cabo en ovocitos de *Xenopus* por microinyección de mRNA mutado y tRNAs supresores químicamente aminoacilados (Turcatti *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 19.991-8, 1996). Con un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que va a ser reemplazado (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del (de los) deseado(s) aminoácido(s) no presente(s) en la naturaleza (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o

4-fluorofenilalanina). El aminoácido no presente en la naturaleza se incorpora a la proteína en lugar de su equivalente natural. Véase Koide *et al.*, Biochem. 33: 7470-6, 1994. Los restos de aminoácido presentes en la naturaleza pueden ser convertidos en especies no presentes en la naturaleza mediante una modificación química *in vitro*. La modificación química se puede combinar con una mutagénesis dirigida al sitio, para ampliar más la variedad de sustituciones (Wynn y Richards, Protein Sci. 2: 395-403, 1993).

Los restos de aminoácido de zcytor19 pueden ser sustituidos por un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no son codificados por el código genético, aminoácidos no presentes en la naturaleza, y aminoácidos artificiales.

Los aminoácidos esenciales de los polipéptidos del presente invento se pueden identificar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis con barrido de alaninas (Cunningham y Wells, Science 244: 1081-5, 1989; Bass *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4498-502, 1991). Mediante esta última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada resto de la molécula y se examinan las moléculas mutantes resultantes en cuanto a su actividad biológica (por ejemplo, la unión a ligandos y la transducción de señales) del modo descrito más adelante, para identificar los restos de aminoácido que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también Hilton *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708, 1996. Los sitios de interacción ligando-receptor, interacción proteína-proteína u otra interacción biológica pueden ser también determinados mediante un análisis físico de la estructura, según se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones y marcación de fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos de supuestos sitios de contacto. Véanse, por ejemplo, de Vos *et al.*, Science 255: 306-312, 1992; Smith *et al.*, J. Mol. Biol. 224: 899-904, 1992; y Wlodaver *et al.*, FEBS Lett. 309: 59-64, 1992. Las identidades de los aminoácidos esenciales pueden ser también inferidas del análisis de homologías con receptores relacionados.

Se puede llevar a cabo la determinación de los restos de aminoácido que están en regiones o dominios que son críticos para el mantenimiento de la integridad estructural. En estas regiones, se pueden determinar los restos específicos que serán más o menos tolerantes al cambio y mantendrán la estructura terciaria global de la molécula. Los métodos para analizar la estructura secuencial incluyen, pero no se limitan a, el alineamiento de múltiples secuencias con elevada identidad de aminoácidos o nucleótidos y el análisis informático utilizando software asequible (por ejemplo, el visor y las herramientas para modelado de homologías Insight II®; MSI, San Diego, California, EE.UU.), las tendencias de estructuras secundarias, los patrones binarios, el empaquetamiento complementario y las interacciones polares enterradas (Barton, Current Opin. Struct. Biol. 5: 372-376, 1995, y Cordes *et al.*, Current Opin. Struct. Biol. 6: 3-10, 1996). En general, cuando se diseñan modificaciones para moléculas o se identifican fragmentos específicos, la determinación de la estructura irá acompañada de la evaluación de la actividad de las moléculas modificadas.

Se hacen cambios en las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos zcytor19 con objeto de minimizar la alteración de la estructura de orden superior que es esencial para la actividad biológica. Por ejemplo, cuando el polipéptido zcytor19 comprende uno o más dominios estructurales, tales como dominios de fibronectina de tipo III, se harán cambios en los restos de aminoácido con objeto de no alterar la estructura ni la geometría de los dominios ni otros componentes de la molécula cuando los cambios de conformación suprimen cierta función crítica, tal como, por ejemplo, la unión de la molécula a sus parejas ligantes. Los efectos de los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden ser pronosticados mediante, por ejemplo, un modelado informático, como se describió anteriormente, o determinados mediante un análisis de la estructura cristalina (véase, por ejemplo, Laphorn *et al.*, Nat. Struct. Biol. 2: 266-268, 1995). Mediante otras técnicas que son bien conocidas en este campo, se compara la plegadura de una proteína variante con la de una molécula estándar (por ejemplo, la proteína nativa). Por ejemplo, se puede llevar a cabo la comparación de los patrones de cisteína en las moléculas variante y estándar. La espectrometría de masas y la modificación química utilizando reducción y alquilación proporcionan métodos para determinar los restos de cisteína que están asociados con enlaces disulfuro o carecen de dichas asociaciones (Bean *et al.*, Anal. Biochem. 201: 216-226, 1992; Gray, Protein Sci. 2: 1732-1748, 1993; y Patterson *et al.*, Anal. Chem. 66: 3727-3732, 1994). Se cree generalmente que si una molécula modificada no tiene el mismo patrón de enlaces disulfuro que la molécula estándar, la plegadura resultará afectada. Otro método bien conocido y aceptado para medir la plegadura es el diroísmo circular (DC). La medición y la comparación de los espectros de DC generados por una molécula modificada y la molécula estándar son rutinarias (Johnson, Proteins 7: 205-214, 1990). La cristalografía es otro método bien conocido para analizar la plegadura y la estructura. La resonancia magnética nuclear (RMN), el mapeo digestivo de péptidos y el mapeo de epítopos son también métodos conocidos para analizar las similitudes entre proteínas y polipéptidos en cuanto a plegadura y estructura (Schaanan *et al.*, Science 257: 961-964, 1992).

Se puede generar un perfil Hopp/Woods de hidrofilia de la secuencia de la proteína zcytor19, como se muestra en la ID. SEC. nº 2, ID. SEC. nº 19 o ID. SEC. nº 21 (Hopp *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 3824-3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88: 1-18, 1986; y Triquier *et al.*, Protein Engineering 11: 153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana deslizante de seis restos. Se ignoran los restos G, S y T enterrados y los restos H, Y y W expuestos. Por ejemplo, en zcytor19, las regiones hidrófilas incluyen los restos de aminoácido 295 a 300 de la ID. SEC. nº 2, 451 a 456 de la ID. SEC. nº 2, 301 a 306 de la ID. SEC. nº 2, 244 a 299 de la ID. SEC. nº 2 y 65 a 70 de la ID. SEC. nº 2. Además, un experto en la técnica reconocerá que, mediante un gráfico de Jameson-Wolf utilizando, por ejemplo, el programa Protean de DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, EE.UU.), se pueden pronosticar regiones hidrófilas de zcytor19 que incluyen polipéptidos que llevan epítopos antigénicos.

Los expertos en la técnica reconocerán que se tendrá en cuenta la hidrofilia o hidrofobia cuando se diseñen modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido zcytor19, con objeto de no alterar la estructura global ni el perfil biológico. Los restos hidrófobos seleccionados del grupo que consiste en Val, Leu e Ile o del grupo que consiste en Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp son particularmente interesantes para la sustitución. Por ejemplo, los restos tolerantes con la sustitución podrían incluir restos tales como los mostrados en la ID. SEC. nº 2. Sin embargo, los restos de cisteína de las posiciones 74, 82, 195 y 217 de la ID. SEC. nº 2 o ID. SEC. nº 19, y los correspondientes restos de Cys de la ID. SEC. nº 4, son relativamente intolerantes con la sustitución. Además, los restos de cisteína de las posiciones 74 y 82 de la ID. SEC. nº 21 son relativamente intolerantes con la sustitución.

Las identidades de los aminoácidos esenciales pueden ser también inferidas del análisis de la similitud de secuencias entre zcytor19 y miembros de la familia de los receptores citocínicos de clase II. Utilizando métodos tales como el análisis "FASTA" previamente descrito, se identifican regiones de elevada similitud en una familia de proteínas y se utilizan para analizar las secuencias de aminoácidos de regiones conservadas. Un planteamiento alternativo para identificar un polinucleótido zcytor19 variante basándose en la estructura es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un posible polinucleótido zcytor19 variante se puede hibridar con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 18 o ID. SEC. nº 20, como se discutió anteriormente.

Otros métodos para identificar aminoácidos esenciales en los polipéptidos del presente invento son procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis con barrido de alaninas [Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081 (1989); Bass *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4498 (1991); Coombs y Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering" en "Proteins: Analysis and Design", Angeleti (redactor), páginas 259-311 (Academic Press, Inc., 1998)]. Mediante esta última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada resto de la molécula y se examinan las moléculas mutantes resultantes en cuanto a su actividad biológica del modo descrito más adelante, para identificar los restos de aminoácido que son críticos para la actividad de la molécula. Dichos métodos de mutagénesis y exploración son rutinarios en la técnica. Véase también Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 4699 (1996).

El presente invento también incluye fragmentos funcionales de polipéptidos zcytor19 y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales. Un zcytor19 "funcional" o un fragmento del mismo aquí definido se caracteriza por su actividad proliferativa o de diferenciación, por su capacidad para provocar o inhibir funciones celulares especializadas, o por su capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo anti-zcytor19 o un ligando de zcytor19 (soluble o inmovilizado). Además, los fragmentos funcionales también incluyen el péptido señal, el dominio intracelular de señalización y similares. Como se describió aquí previamente, zcytor19 se caracteriza por una estructura de receptor citocínico de clase II. Por lo tanto, el presente invento proporciona además proteínas de fusión que abarcan: (a) moléculas polipeptídicas que comprenden un dominio extracelular, un dominio ligante de citocinas o un dominio intracelular aquí descrito; y (b) fragmentos funcionales que comprenden uno o más de estos dominios. A la otra porción polipeptídica de la proteína de fusión puede contribuir otro receptor citocínico de clase II, tal como, por ejemplo, las cadenas alfa y beta del interferón gamma y las cadenas alfa y beta del receptor del interferón alfa/beta, zcytor11 (Patente de EE.UU. nº 5.965.704 comúnmente reconocida), CRF2-4, DIRS1, zcytor7 (Patente de EE.UU. nº 5.945.511 comúnmente reconocida) y similares, o un péptido señal secretor no nativo y/o no relacionado que facilite la secreción de la proteína de fusión.

Se pueden llevar a cabo análisis rutinarios de moléculas de ácido nucleico en cuanto a delecciones para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido zcytor19. Como una ilustración, moléculas de DNA que tienen la secuencia de nucleótidos de la ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 18 o ID. SEC. nº 20, o fragmentos de las mismas, pueden ser sometidas a digestión con la nucleasa Bal31 para obtener una serie de delecciones anidadas. Luego se insertan estos fragmentos de DNA en vectores de expresión, en el apropiado marco de lectura, y se aíslan los polipéptidos expresados y se examinan en cuanto a la actividad zcytor19 o en cuanto a la capacidad para unirse a anticuerpos anti-zcytor19 o a un ligando de zcytor19. Una alternativa a la digestión con exonucleasas es utilizar la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos para introducir delecciones o codones de parada, para especificar la producción de un fragmento deseado de zcytor19. Alternativamente, se pueden sintetizar fragmentos concretos de un polinucleótido zcytor19 usando la reacción en cadena de la polimerasa.

Los expertos en la técnica conocen bien métodos estándares para identificar dominios funcionales. Por ejemplo, Horisberger y Di Marco, *Pharmac. Ther.* 66: 507 (1995), han resumido estudios sobre el truncamiento en un extremo o ambos extremos de interferones. Además, por ejemplo, Treuter *et al.*, *Molec. Gen. Genet.* 240: 113 (1993); Content *et al.*, "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon" en *Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems*, Cantell (redactor), páginas 65-72 (Nijhoff, 1987); Herschman, "The EGF Receptor" en *Control of Animal Cell Proliferation 1*, Boynton *et al.* (redactores), páginas 169-199 (Academic Press, 1985); Coumilleau *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 29.270 (1995); Fukunaga *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 25.291 (1995); Yamaguchi *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 50: 1295 (1995); y Meisel *et al.*, *Plant Molec. Biol.* 30: 1 (1996), describen técnicas estándares para el análisis funcional de proteínas.

Se pueden hacer y analizar múltiples sustituciones de aminoácidos utilizando métodos de mutagénesis y exploración conocidos, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241: 53-57, 1988), o Bowie y Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156, 1989). En resumen, estos autores describen métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar el polipéptido funcional y luego secuenciar los polipéptidos mutados para determinar el espectro de sustituciones admisibles en cada posición. Otros métodos que

pueden ser utilizados incluyen la presentación en fagos (por ejemplo, Lowman *et al.*, Biochem. 30: 10.832-10.837, 1991; Ladner *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.223.409; y Huse, Publicación WIPO WO 92/062045) y la mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire *et al.*, Gene 46: 145, 1986; Ner *et al.*, DNA 7: 127, 1988).

5 Se pueden generar variantes de las secuencias descritas del DNA y el polipéptido zcytor19 por medio de barajadura de DNA (“DNA shuffling”), del modo descrito por Stemmer, Nature 370: 389-91, 1994, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10.747-51, 1994, y la Publicación WIPO WO 97/20078. En resumen, se generan DNAs variantes mediante recombinación homóloga *in vitro* por fragmentación aleatoria de un DNA originario, seguida de una reensambladura usando una PCR, lo que da lugar a mutaciones puntuales aleatoriamente introducidas. Esta técnica puede
10 ser modificada al usar una familia de DNAs originarios, tales como variantes alélicas o DNAs de diferentes especies, para introducir una variabilidad adicional en el proceso. Una selección o exploración de la actividad deseada, seguida de iteraciones adicionales de mutagénesis y ensayo, proporciona una rápida “evolución” de secuencias al seleccionarse las mutaciones deseables mientras simultáneamente se rechazan los cambios perjudiciales.

15 Se pueden combinar métodos de mutagénesis como los aquí descritos con métodos de exploración automáticos de alto rendimiento para detectar en células huésped la actividad de polipéptidos receptores zcytor19 mutados y clonados. A este respecto, los ensayos preferidos incluyen ensayos de proliferación celular y ensayos de unión a ligandos basados en biosensores, que se describen más adelante. Las moléculas de DNA mutadas que codifican receptores activos o porciones de los mismos (por ejemplo, fragmentos que se unen al ligando, dominios de señalización, etc.) pueden ser
20 recuperadas de las células huésped y ser rápidamente secuenciadas usando un equipo moderno. Estos métodos permiten la determinación rutinaria y rápida de la importancia de los restos de aminoácido individuales en un polipéptido de interés.

Además, las proteínas del presente invento (o fragmentos polipeptídicos de las mismas) se pueden unir a otras
25 moléculas bioactivas, particularmente receptores citocínicos, para obtener moléculas multifuncionales. Por ejemplo, se pueden unir uno o más dominios del receptor soluble zcytor19 a otros receptores citocínicos solubles para potenciar sus propiedades biológicas o la eficacia de su producción.

De este modo, el presente invento proporciona una serie de nuevas moléculas híbridas en que un segmento que
30 comprende uno o más dominios de zcytor19 está fusionado con otro polipéptido. La fusión se realiza preferiblemente mediante corte y empalme a nivel de DNA para permitir la expresión de moléculas quiméricas en sistemas de producción recombinantes. Las moléculas resultantes son luego examinadas en cuanto a propiedades tales como solubilidad mejorada, estabilidad mejorada, semivida de aclaramiento prolongada, niveles de expresión y secreción mejorados, y farmacodinámica. Dichas moléculas híbridas pueden comprender además restos de aminoácido adicionales (por
35 ejemplo, un conector polipeptídico) entre las proteínas o polipéptidos componentes.

Utilizando los métodos aquí discutidos, quien tiene una experiencia normal en la técnica puede identificar y/o preparar una diversidad de fragmentos o variantes polipeptídicos de la ID. SEC. n° 2 o la ID. SEC. n° 19 que conserven la actividad de transducción de señales o de unión a ligandos. Por ejemplo, se puede crear un “receptor soluble”
40 zcytor19 preparando una diversidad de polipéptidos que sean sustancialmente homólogos al dominio extracelular ligante de citocinas [del resto 21 (Arg) al 226 (Asn) de la ID. SEC. n° 2 o la ID. SEC. n° 19], un fragmento ligante de citocinas [por ejemplo, del resto 21 (Arg) al 223 (Pro) de la ID. SEC. n° 2 o la ID. SEC. n° 19; ID. SEC. n° 4], o variantes alélicas u ortólogos de especie de los mismos, y conserven la actividad de unión a ligandos de la proteína zcytor19 de tipo silvestre. Además, se pueden aislar receptores solubles zcytor19 variantes. Dichos polipéptidos pueden incluir
45 aminoácidos adicionales de, por ejemplo, parte de, o todos, los dominios transmembranales e intracelulares. Dichos polipéptidos pueden incluir también segmentos polipeptídicos adicionales como los aquí descritos de forma general, tales como marcadores, etiquetas de afinidad y similares.

Para cualquier polipéptido zcytor19, incluyendo variantes, receptores solubles y polipéptidos o proteínas de fusión,
50 quien tiene una experiencia normal en la técnica puede generar fácilmente, utilizando la información expuesta en las anteriores Tablas 1 y 2, una secuencia polinucleotídica totalmente degenerada que codifique esa variante.

Los polipéptidos zcytor19 del presente invento, incluyendo polipéptidos de longitud completa, fragmentos biológicamente activos y polipéptidos de fusión, pueden ser producidos en células huésped genéticamente diseñadas, de
55 acuerdo con técnicas convencionales. Son células huésped adecuadas aquellos tipos celulares que pueden ser transformados o transfectados con DNA exógeno y desarrollados en cultivo, e incluyen bacterias, células fúngicas y células eucarióticas superiores cultivadas. Se prefieren células eucarióticas, particularmente células cultivadas de organismos multicelulares. Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU., 1989, y Ausubel *et al.* (redactores), “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Inc., New York, EE.UU., 1987, describen técnicas para manipular moléculas de DNA clonadas e introducir DNA exógeno en una diversidad de células huésped.

En general, una secuencia de DNA que codifica un polipéptido zcytor19 está operativamente enlazada con otros
65 elementos genéticos necesarios para su expresión, incluyendo generalmente un promotor y un terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá comúnmente uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la técnica reconocerán que, en ciertos sistemas, los marcadores seleccionables pueden estar dispuestos en vectores separados, y se puede obtener la replicación del DNA exógeno por integración en el genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores

seleccionables, vectores y otros elementos es una cuestión de diseño rutinario dentro del nivel de experiencia normal en la técnica. Muchos de dichos elementos son descritos en la bibliografía y son asequibles a través de proveedores comerciales.

5 Para dirigir un polipéptido zcytor19 a la ruta secretora de una célula huésped, se proporciona una secuencia señal secretora (también conocida como secuencia líder, preprosecuencia o presecuencia) en el vector de expresión. La secuencia señal secretora puede ser la de zcytor19 o puede proceder de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA) o ser sintetizada *de novo*. La secuencia señal secretora está operativamente enlazada con la secuencia de DNA de zcytor19; es decir, las dos secuencias están unidas en el marco de lectura correcto y situadas para dirigir el polipéptido recién sintetizado a la ruta secretora de la célula huésped. Las secuencias señal secretoras están comúnmente situadas en 5' con respecto a la secuencia de DNA que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal secretoras pueden estar situadas en otra parte de la secuencia de DNA de interés (véanse, por ejemplo, Welch *et al.*, Patente de EE.UU. n.º 5.037.743; y Holland *et al.*, Patente de EE.UU. n.º 5.143.830).

15 Alternativamente, la secuencia señal secretora contenida en los polipéptidos del presente invento se utiliza para dirigir otros polipéptidos a la ruta secretora. El presente invento proporciona dichos polipéptidos de fusión. Utilizando métodos conocidos en la técnica y aquí descritos, se puede preparar un polipéptido señal de fusión en que una secuencia señal secretora derivada del aminoácido 1 (Met) al aminoácido 20 (Gly) de la ID. SEC. n.º 2 o la ID. SEC. n.º 19 esté operativamente enlazada con otro polipéptido. La secuencia señal secretora contenida en los polipéptidos de fusión del presente invento está preferiblemente fusionada amino-terminalmente con un péptido adicional para dirigir el péptido adicional a la ruta secretora. Dichas construcciones tienen numerosas aplicaciones conocidas en la técnica. Por ejemplo, estas nuevas construcciones de fusión de secuencias señal secretoras pueden dirigir la secreción de un fragmento polipeptídico o un componente activo de una proteína normalmente no secretada. Dichas fusiones pueden ser utilizadas *in vivo* o *in vitro* para dirigir péptidos a través de la ruta secretora. Además, dichas construcciones de fusión permiten la expresión, secreción y purificación de fragmentos de polipéptido zcytor19 que pueden ser usados para inocular a un animal y generar anticuerpos, como aquí se describe.

Las células de mamífero cultivadas son huéspedes adecuados en el presente invento. Los métodos para introducir DNA exógeno en células huésped de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato cálcico (Wigler *et al.*, *Cell* 14: 725, 1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7: 603, 1981; Graham y Van der Eb, *Virology* 52: 456, 1973), electroporación (Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1: 841-845, 1982), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel *et al.*, *ibidem*), y transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson *et al.*, *Focus* 15: 73, 1993; Ciccarone *et al.*, *Focus* 15: 80, 1993) y vectores virales (Miller y Rosman, *BioTechniques* 7: 980-90, 1989; Wang y Finer, *Nature Med.* 2: 714-716, 1996). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas es descrita, por ejemplo, por Levinson *et al.*, Patente de EE.UU. n.º 4.713.339; Hagen *et al.*, Patente de EE.UU. n.º 4.784.950; Palmiter *et al.*, Patente de EE.UU. n.º 4.579.821; y Ringold, Patente de EE.UU. n.º 4.656.134. Las células de mamífero cultivadas adecuadas incluyen las líneas celulares COS-1 (ATCC n.º CRL 1650), COS-7 (ATCC n.º CRL 1651), BHK (ATCC n.º CRL 1632), BHK 570 (ATCC n.º CRL 10314), 293 (ATCC n.º CRL 1573; Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36: 59-72, 1977) y ovárica de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1, ATCC n.º CCL 61). Líneas celulares adecuadas adicionales son conocidas en la técnica y son asequibles de depositarias públicas tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; del inglés, American Type Culture Collection), Rockville, Maryland, EE.UU. En general, se prefieren promotores de transcripción potentes, tales como promotores del virus 40 de simios (SV-40; del inglés, simian virus 40) o de citomegalovirus. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los de genes de la metalotioneína (Patentes de EE.UU. números 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor tardío principal de adenovirus.

Se usa generalmente la selección por fármacos para seleccionar las células de mamífero cultivadas a las que se ha insertado DNA extraño. A dichas células se hace comúnmente referencia como "transfectantes". A las células que han sido cultivadas en presencia del agente selectivo y son capaces de pasar el gen de interés a su progenie se hace referencia como "transfectantes estables". Un marcador seleccionable preferido es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección se lleva a cabo en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similar. También se pueden usar sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un proceso al que se hace referencia como "amplificación". La amplificación es llevada a cabo cultivando transfectantes en presencia de un bajo nivel del agente selectivo y aumentando luego la cantidad de agente selectivo para seleccionar las células que producen niveles elevados de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable y amplificable preferido es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato. También se pueden usar otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a higromicina, resistencia a múltiples fármacos, y puromicina acetiltransferasa). Se pueden utilizar marcadores alternativos que introducen un fenotipo alterado, tal como la proteína fluorescente verde, o proteínas de la superficie celular tales como CD4, CD8, proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de Clase I y fosfatasa alcalina placentaria, para separar las células transfectadas de las no transfectadas por medios tales como la separación por FACS o la tecnología de separación por glóbulos magnéticos.

También se pueden usar otras células eucarióticas superiores como huéspedes, incluyendo células vegetales, células de insecto y células aviares. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como un vector para expresar genes en células vegetales ha sido revisado por Sinkar *et al.*, *J. Biosci.* (Bangalore) 11: 47-58, 1987. La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos extraños en ellas son descritas por Guarino *et al.*, Patente de EE.UU. n.º 5.162.222, y la publicación WIPO WO 94/06463. Las células de insecto pueden ser infectadas con un baculovirus recombinante, comúnmente procedente del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV; del

inglés, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus); véanse L. A. King y R. D. Possee, "The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide", Londres, Chapman & Hall; D. R. O'Reilly *et al.*, "Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual", New York, Oxford University Press, 1994; y C. D. Richardson (redactor), "Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology", Totowa, New Jersey, EE.UU., Humana Press, 1995. En un segundo método para preparar un baculovirus con zcytor19 recombinante, se usa un sistema basado en transposones descrito por Luckow (V. A. Luckow *et al.*, J. Virol. 67: 4566-79, 1993). Este sistema, en el que se utilizan vectores de transferencia, es vendido en el kit Bac-to-BacTM (Life Technologies, Rockville, Maryland, EE.UU.). En este sistema se utiliza un vector de transferencia, pFastBac1TM (Life Technologies), que contiene un transposón Tn7, para introducir el DNA que codifica el polipéptido zcytor19 en un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande llamado "bácmido". Véanse, M. S. Hill-Perkins y R. D. Possee, J. Gen. Virol. 71: 971-6, 1990; B. C. Bonning *et al.*, J. Gen. Virol. 75: 1551-6, 1994; y G. D. Chazenbalk y B. Rapoport, J. Biol. Chem. 270: 1543-9, 1995. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en marco con un DNA que codifica una etiqueta epitópica en el extremo C o N del polipéptido zcytor19 expresado, tal como, por ejemplo, una etiqueta epitópica Glu-Glu (T. Grussenmeyer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952-4, 1985). Usando una técnica conocida en este campo técnico, se transforma *E. coli* con un vector de transferencia que contiene zcytor19 y se explora el vector en cuanto a bácmidos que contengan un gen LacZ interrumpido, indicativo de un baculovirus recombinante. El DNA bacmídico que contiene el genoma de baculovirus recombinante es aislado usando técnicas habituales y es usado para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, por ejemplo, células Sf9. Posteriormente se produce el virus recombinante que expresa zcytor19. Se preparan reservas víricas recombinantes mediante métodos comúnmente usados en la técnica.

El virus recombinante se usa para infectar células huésped, típicamente una línea celular procedente del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*. Véase, en general, Glick y Pasternak, "Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA", ASM Press, Washington, D.C., EE.UU., 1994. Otra línea celular adecuada es la línea celular High FiveOTM (Invitrogen) procedente de *Trichoplusia ni* (Patente de EE.UU. n° 5.300.435). Se usan medios exentos de suero comercialmente asequibles para desarrollar y mantener las células. Son medios adecuados: Sf900 IITM (Life Technologies) y ESF 921TM (Expression Systems) para las células Sf9, y Ex-cello405TM (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas, EE.UU.) y Express FiveOTM (Life Technologies) para las células de *T. ni*. Los procedimientos usados son generalmente descritos en manuales de laboratorio asequibles (L. A. King y R. D. Possee, *ibidem*; D. R. O'Reilly *et al.*, *ibidem*; C. D. Richardson, *ibidem*). La subsiguiente purificación del polipéptido zcytor19 a partir del sobrenadante puede realizarse usando métodos aquí descritos.

También se pueden usar células fúngicas, incluyendo células de levadura, en el presente invento. Las especies de levadura de particular interés a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Por ejemplo, Kawasaki, Patente de EE.UU. n° 4.599.311; Kawasaki *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.931.373; Brake, Patente de EE.UU. n° 4.870.008; Welch *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.037.743; y Murray *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.845.075, describen métodos para transformar células de *S. cerevisiae* con DNA exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de las mismas. Las células transformadas son seleccionadas mediante el fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente la resistencia a fármacos o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente concreto (por ejemplo, leucina). Un sistema vector preferido para uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema vector *POT1* descrito por Kawasaki *et al.* (Patente de EE.UU. n° 4.931.373), que permite que las células transformadas sean seleccionadas mediante crecimiento en medios que contienen glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para utilización en levaduras incluyen los de genes de enzimas glicolíticas (véanse, por ejemplo, Kawasaki, Patente de EE.UU. n° 4.599.311; Kingsman *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.615.974; y Bitter, Patente de EE.UU. n° 4.977.092) y genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse también las Patentes de EE.UU. números 4.990.446, 5.063.154, 5.139.936 y 4.661.454. En la técnica se conocen sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*. Véanse, por ejemplo, Gleeson *et al.*, J. Gen. Microbiol. 132: 3459-3465, 1986, y Cregg, Patente de EE.UU. n° 4.882.279. Se pueden utilizar células de *Aspergillus* de acuerdo con los métodos de McKnight *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.935.349. Sumino *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.162.228, describen métodos para transformar *Acremonium chrysogenum*. Lambowitz, Patente de EE.UU. n° 4.486.533, describe métodos para transformar *Neurospora*.

El uso de *Pichia methanolica* como huésped para la producción de proteínas recombinantes se describe en las Publicaciones WIPO WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 y WO 98/02565. Las moléculas de DNA para uso en la transformación de *P. methanolica* serán comúnmente preparadas como plásmidos circulares de doble cadena, que son preferiblemente linealizados antes de la transformación. Para la producción de polipéptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y el terminador del plásmido sean los de un gen de *P. methanolica*, tal como un gen de utilización de alcohol de *P. methanolica* (*AUG1* o *AUG2*). Otros promotores útiles incluyen los de los genes de dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD) y catalasa (CAT). Para facilitar la integración del DNA en el cromosoma del huésped, se prefiere tener el segmento de expresión completo del plásmido flanqueado por secuencias de DNA del huésped en ambos extremos. Un marcador seleccionable preferido para uso en *Pichia methanolica* es un gen *ADE2* de *P. methanolica*, que codifica fosforribosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), que permite que células huésped *ade2* se desarrollen en ausencia de adenina. Para procesos industriales a gran escala en que es deseable minimizar el uso de metanol, se prefiere usar células huésped en que estén suprimidos ambos genes de utilización de metanol (*AUG1* y *AUG2*). Para la producción de proteínas secretadas, se prefieren células huésped deficientes en cuanto a genes de proteasas vacuolares (*PEP4* y *PRB1*). Se usa la electroporación para facilitar la introducción, en células de *P. methanolica*, de un plásmido que contiene DNA que codifica un polipéptido de interés. Se prefiere transformar las células de *P. methanolica* por electroporación usando un campo eléctrico pulsado

que decae exponencialmente, que tiene una intensidad de campo de 2,5 a 4,5 kV/cm, preferiblemente de aproximadamente 3,75 kV/cm, y una constante de tiempo (t) de 1 a 40 milisegundos, muy preferiblemente de aproximadamente 20 milisegundos.

5 Las células huésped procarióticas, incluyendo cepas de las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus* y otros géneros, son también células huésped útiles en el presente invento. Las técnicas para transformar estos huéspedes y hacer que se expresen secuencias de DNA extrañas en ellos clonadas son bien conocidas en este campo técnico (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *ibídem*). Cuando se expresa un polipéptido zcytor19 en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede quedar retenido en el citoplasma, típicamente en forma de gránulos insolubles, o puede ser
10 dirigido al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células son lisadas y los gránulos son recuperados y son desnaturalizados usando, por ejemplo, urea o isotiocianato de guanidina. El polipéptido desnaturalizado puede luego volverse a plegar y dimerizarse al diluir el agente desnaturalizante, tal como mediante diálisis frente a una disolución de urea y una combinación de glutationes reducido y oxidado, seguida de diálisis frente a una disolución salina tamponada. En el segundo caso, el polipéptido puede ser recuperado del espacio
15 periplásmico en una forma soluble y funcional al romper las células (mediante, por ejemplo, sonicación o choque osmótico) para que liberen el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviándose por ello la necesidad de desnaturalización y plegadura.

Las células huésped transformadas o transfectadas son cultivadas de acuerdo con procedimientos convencionales
20 en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes necesarios para el desarrollo de las células huéspedes escogidas. En la técnica se conoce una diversidad de medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos, medios que incluyen generalmente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios pueden también contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, según se requieran. El medio de crecimiento seleccionará generalmente las células que contengan el DNA exógenamente añadido, mediante, por ejemplo, selección por fármacos o deficiencia de un nutriente esencial que es
25 complementado por el marcador seleccionable llevado por el vector de expresión o introducido en la célula huésped por cotransfección. Las células de *P. methanolicus* son cultivadas en un medio que comprende fuentes adecuadas de carbono, nitrógeno y oligonutrientes a una temperatura de aproximadamente 25°C a 35°C. A los cultivos líquidos se proporciona una aireación suficiente por un medio convencional, tal como el sacudimiento de pequeños matraces o el burbujeo en fermentadores. Un medio de cultivo preferido para *P. methanolicus* es YEPD [D-glucosa al 2%, peptona Bacto™ (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.) al 2%, extracto de levadura Bacto™ (Difco Laboratories) al
30 1%, adenina al 0,004% y L-leucina al 0,006%].

En un aspecto del presente invento, una célula cultivada produce un receptor citocínico zcytor19 (incluyendo
35 dominios transmembranales e intracelulares) y se usa la célula para explorar ligandos del receptor, incluyendo el ligando natural así como agonistas y antagonistas del ligando natural. Para resumir este planteamiento, se combina un cDNA o gen que codifica el receptor con otros elementos genéticos necesarios para su expresión (por ejemplo, un promotor de la transcripción) y se inserta el vector de expresión resultante en una célula huésped. Las células que expresan el DNA y producen un receptor funcional son seleccionadas y son usadas en una diversidad de sistemas de exploración.
40

Las células de mamífero adecuadas para uso en la expresión de los nuevos receptores del presente invento y la transducción de una señal mediada por los receptores incluyen células que expresan una subunidad β , tal como una subunidad de receptor citocínico de clase II tal como, por ejemplo, las cadenas alfa y beta del interferón gamma y las
45 cadenas alfa y beta del receptor del interferón alfa/beta, y los receptores zcytor11 (Patente de EE.UU. n° 5.965.704 comúnmente reconocida), CRF2-4, DIRS1 y zcytor7 (Patente de EE.UU. n° 5.945.511 comúnmente reconocida). Dichas subunidades pueden ser naturalmente expresadas por las células o ser usadas para cotransfectar con el receptor zcytor19. Un sistema celular ejemplar para los receptores citocínicos de clase I es usar células que expresan gp130, y células que coexpresan gp130 y el receptor de LIF (Gearing *et al.*, *EMBO J.* 10: 2839-2848, 1991; Gearing *et al.*,
50 Patente de EE.UU. n° 5.284.755). A este respecto, se prefiere generalmente emplear una célula que sea sensible a otras citocinas que se unen a receptores de la misma subfamilia, tales como IL-6 y LIF, porque dichas células contendrán la(s) ruta(s) necesaria(s) para la transducción de señales. Las células preferidas de este tipo incluyen células BaF3 (Palacios y Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 6: 4133-4135, 1986), la línea celular TF-1 humana (ATCC n° CRL-2003) y la línea celular DA-1 (Branch *et al.*, *Blood* 69: 1782, 1987; Broudy *et al.*, *Blood* 75: 1622-1626, 1990). Alternativamente, se pueden construir células huésped adecuadas para que produzcan una subunidad β u otro componente celular necesario para la respuesta celular deseada. Por ejemplo, se puede transfectar la línea celular murina BaF3 (Palacios y Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 6: 4133-4135, 1986), una línea celular de riñón de cría de hámster (BHK; del inglés, baby hamster kidney), o la línea celular CTLL-2 (ATCC TIB-214) para que expresen subunidades de clase II individuales, tales como las
60 cadenas alfa y beta del interferón gamma y las cadenas alfa y beta del receptor del interferón alfa/beta, y los receptores zcytor11 (Patente de EE.UU. n° 5.965.704 comúnmente reconocida), CRF2-4, DIRS1 y zcytor7 (Patente de EE.UU. n° 5.945.511 comúnmente reconocida), además de zcytor19. Se prefiere generalmente usar una célula huésped y un(os) receptor(es) de la misma especie; sin embargo, este planteamiento permite que se construyan líneas celulares para que expresen múltiples subunidades de receptor de cualquier especie, superándose de este modo las posibles limitaciones
65 que surgen de la especificidad de especie. Alternativamente, homólogos de especie del cDNA de receptor humano pueden ser clonados y usados en líneas celulares de la misma especie, tal como un cDNA de ratón en la línea celular BaF3. De esta manera, se pueden construir líneas celulares que dependan de un factor de crecimiento hematopoyético, tal como IL-3, para que se vuelvan dependientes de un ligando de zcytor19 o un anticuerpo anti-zcytor19.

Se usan células que expresan zcytor19 funcional en ensayos de exploración. En la técnica se conocen diversos ensayos adecuados. Estos ensayos se basan en la detección de una respuesta biológica en la célula diana. Uno de tales ensayos es un ensayo de proliferación celular. Se cultivan células en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo y se detecta la proliferación celular, por ejemplo, midiendo la incorporación de timidina tritiada o mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción o descomposición metabólica de Alamar Blue™ (AccuMed, Chicago, Illinois, EE.UU.) o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Mosman, *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63, 1983). En una forma de ensayo alternativa se utilizan células que están adicionalmente construidas para que expresen un gen informador. El gen informador está enlazado con un elemento promotor que es sensible a la ruta ligada al receptor, por ejemplo, la ruta JAK/STAT, y, mediante el ensayo, se detecta la activación de la transcripción del gen informador. A este respecto, un elemento promotor preferido es un elemento de respuesta a suero (SRE; del inglés, serum response element) (véase, por ejemplo, Shaw *et al.*, *Cell* 56: 563-572, 1989). Un gen preferido de dichos genes informadores es un gen de luciferasa (de Wet *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 7: 725, 1987). La expresión del gen de luciferasa es detectada por luminiscencia usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Baumgartner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 29.094-29.101, 1994; Schenborn y Goiffin, *Promega Notes* 41: 11, 1993). Los kits de ensayo para luciferasa pueden obtenerse comercialmente de, por ejemplo, Promega Corp., Madison, Wisconsin, EE.UU. Se pueden usar líneas celulares diana de este tipo para explorar bancos de productos químicos, medios de cultivo celularmente acondicionados, caldos fúngicos, muestras de suelo, muestras de agua, y similares. Por ejemplo, un banco de muestras de medios celular o tisularmente acondicionados puede ser ensayado sobre una célula diana para identificar las células que producen ligando. Las células positivas son luego usadas para producir un banco de cDNA en un vector de expresión celular de mamífero, el cual es dividido en colecciones, introducido en células huésped por transfección, y dejado expresar. Luego se examinan las muestras de medios procedentes de las células transfectadas, con la subsiguiente división de colecciones, retransfección, subcultivo y nuevo examen de células positivas, para aislar una línea celular clonal que expresa el ligando. Alternativamente, se pueden examinar muestras de medios procedentes de las células transfectadas, con la subsiguiente división de colecciones, retransfección y nuevo examen, para aislar un clon bacteriano que exprese el cDNA del ligando. Las muestras de medios acondicionados por el riñón, el hígado, el bazo, el timo, otros tejidos linfoides, células B, células T o líneas celulares de leucemia son fuentes de ligando preferidas para uso en los procedimientos de exploración.

También se puede identificar un ligando natural de zcytor19 al someter a mutagénesis una línea celular dependiente de citocinas que expresa zcytor19 y cultivarla bajo unas condiciones que permitan seleccionar en cuanto a crecimiento autocrino. Véase la publicación WIPO WO 95/21930. En un procedimiento típico, las células que expresan zcytor19 son sometidas a mutagénesis, tal como con metanosulfonato de etilo (EMS). Se deja después que las células se recuperen en presencia de la citocina requerida y luego se transfieren a un medio de cultivo que carece de la citocina. Las células supervivientes son exploradas en cuanto a la producción de un ligando de zcytor19, tal como añadiendo polipéptido receptor soluble que comprende el dominio extracelular ligante de citocinas de zcytor19, o un fragmento ligante de citocinas aquí descrito, al medio de cultivo para que compita con el ligando, o ensayando medios acondicionados sobre células de tipo silvestre y sobre células transfectadas que expresan el receptor zcytor19 y comparando. Las líneas celulares preferidas para uso en este método incluyen células que son transfectadas para que expresen gp130 o gp130 en combinación con el receptor de LIF. Entre dichas líneas celulares huésped, las preferidas incluyen células CTLL-2 transfectadas (Gillis y Smith, *Nature* 268: 154-156, 1977) y células BaF3 transfectadas.

Además, se puede usar un método de trampa de secreción en que se emplea un polipéptido receptor soluble zcytor19, para aislar un ligando de zcytor19 (Aldrich *et al.*, *Cell* 87: 1161-1169, 1996). Se transfectan células COS-7 con un banco de expresión de cDNA preparado a partir de una conocida o supuesta fuente de ligandos. El vector del banco de cDNA tiene generalmente un origen de SV40 para la multiplicación en células COS-7, y un promotor de CMV para una elevada expresión. Las células COS-7 transfectadas son cultivadas en una monocapa y son luego fijadas y permeabilizadas. Luego se pone el receptor soluble zcytor19 marcado con biotina o etiquetado, aquí descrito, en contacto con la capa de células y se deja que se una a las células de la monocapa que expresan una molécula anticomplementaria, es decir, un ligando de zcytor19. De esta manera, una célula que exprese un ligando resultará unida con moléculas receptoras. Se utiliza un anticuerpo anti-etiqueta (anti-Ig para fusiones de Ig, M2 o anti-FLAG para fusiones etiquetadas con FLAG, estreptavidina, anti-etiqueta Glu-Glu, y similares), que está conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP; del inglés, horseradish peroxidase), para visualizar esas células a las que se ha unido el receptor soluble zcytor19 marcado con biotina o etiquetado. La HRP cataliza el depósito de un reactivo de tiramida, tal como, por ejemplo, tiramida-FITC. Para esta detección, se puede utilizar un kit comercialmente asequible (por ejemplo, el kit Renaissance TSA-Direct™; NEN Life Science Products, Boston, Massachusetts, EE.UU.). Las células que expresan el ligando del receptor zcytor19 serán identificadas como células verdes bajo el microscopio de fluorescencia y serán recogidas para la subsiguiente clonación del ligando utilizando procedimientos para rescate plasmídico como los esbozados por Aldrich *et al.*, *supra*, seguidos de subsiguientes ciclos del ensayo de trampa de secreción, o una exploración convencional de colecciones de bancos de cDNA, hasta que se identifiquen clones individuales.

La actividad del polipéptido zcytor19 como receptor puede ser medida mediante un microfisiómetro biosensor basado en silicio que mide la velocidad de acidificación extracelular o la excreción de protones asociadas con la unión del receptor y las subsiguientes respuestas celulares fisiológicas. Un dispositivo ejemplar es el microfisiómetro Cytosensor™ fabricado por Molecular Devices, Sunnyvale, California, EE.UU. Mediante este método se puede medir una diversidad de respuestas celulares, tales como proliferación celular, transporte iónico, producción de energía, respuesta inflamatoria, activación reguladora y de receptores, y similares. Véanse, por ejemplo, H. M. McConnell *et al.*, *Science* 257: 1906-1912, 1992; S. Pitchford *et al.*, *Meth. Enzymol.* 228: 84-108, 1997; S. Arimilli *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 212: 49-59, 1998; e I. Van Liedfe *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 346: 87-95, 1998. El microfisiómetro se puede utilizar

para examinar células eucarióticas y procarióticas, adherentes y no adherentes. Al medir cambios en la acidificación extracelular en los medios celulares a lo largo del tiempo, el microfisiómetro mide directamente respuestas celulares a diversos estímulos, incluyendo agonistas, ligandos y antagonistas del polipéptido zcytor19. Preferiblemente, el microfisiómetro se utiliza para medir las respuestas de una célula eucariótica que expresa zcytor19 en comparación con las de una célula eucariótica testigo que no expresa el polipéptido zcytor19. Las células eucarióticas que expresan zcytor19 comprenden células que han sido transfectadas o infectadas con zcytor19 por medio de un vector adenovírico, etcétera, como aquí se describe, creándose una célula que es sensible a estímulos moduladores de zcytor19, o son células que expresan naturalmente zcytor19, tales como células que expresan zcytor19 procedentes de tejido linfóide, esplénico o tímico o PBLs. Las diferencias, medidas como un aumento o una disminución de la acidificación extracelular, en la respuesta de las células que expresan zcytor19 con respecto a la de un testigo son una medición directa de la respuesta celular modulada por zcytor19. Además, dichas respuestas moduladas por zcytor19 pueden ser examinadas bajo una diversidad de estímulos. También se proporciona un método para identificar, utilizando el microfisiómetro, agonistas y antagonistas del polipéptido zcytor19, que comprende proporcionar células que expresan un polipéptido zcytor19, cultivar una primera porción de las células en ausencia de un compuesto de ensayo, cultivar una segunda porción de las células en presencia de un compuesto de ensayo, y detectar un aumento o una disminución de una respuesta celular de la segunda porción de las células en comparación con la de la primera porción de las células. Utilizando este método, se pueden identificar rápidamente antagonistas y agonistas, incluyendo el ligando natural del polipéptido zcytor19.

Los ensayos adicionales proporcionados por el presente invento incluyen el uso de polipéptidos receptores híbridos. Estos polipéptidos híbridos se dividen en dos clases generales. En la primera clase, el dominio intracelular de zcytor19, que comprende aproximadamente los restos 250 (Lys) a 491 (Arg) de la ID. SEC. n° 2 o los restos 250 (Lys) a 520 (Arg) de la ID. SEC. n° 19, está unido al dominio de unión a ligandos de un segundo receptor. Se prefiere que el segundo receptor sea un receptor de citocinas hematopoyéticas, tal como el receptor mpl [Souyri *et al.*, Cell 63: 1137-1147, 1990]. El receptor híbrido comprenderá además un dominio transmembranal, que puede proceder de cualquier receptor. Luego se inserta en una célula huésped una construcción de DNA que codifica el receptor híbrido. Las células que expresan el receptor híbrido son cultivadas en presencia de un ligando del dominio de unión y son examinadas en cuanto a una respuesta. Este sistema proporciona un medio para analizar la transducción de señales mediada por zcytor19 mientras se usan ligandos fácilmente asequibles. Este sistema puede ser también usado para determinar si líneas celulares particulares son capaces de responder a señales transducidas por zcytor19. Una segunda clase de polipéptidos receptores híbridos comprende el dominio extracelular ligante de citocinas (de unión a ligandos) [restos 21 (Arg) a 226 (Asn) de la ID. SEC. n° 2 o ID. SEC. n° 19], o un fragmento ligante de citocinas [por ejemplo, los restos 21 (Arg) a 223 (Pro) de la ID. SEC. n° 2 o ID. SEC. n° 19; ID. SEC. n° 4], con un dominio citoplásmico de un segundo receptor, preferiblemente un receptor citocínico, y un dominio transmembranal. El dominio transmembranal puede proceder de cualquier receptor. Los receptores híbridos de esta segunda clase se expresan en células de las que se sabe que son capaces de responder a señales transducidas por el segundo receptor. Juntas, estas dos clases de receptores híbridos permiten el uso de un amplio espectro de tipos celulares en sistemas de ensayo basados en receptores.

Las células en que se ha hallado la expresión de un ligando de zcytor19 son luego usadas para preparar un banco de cDNA a partir del cual se puede aislar del modo anteriormente descrito el cDNA que codifica el ligando. De este modo, el presente invento proporciona, además de nuevos polipéptidos receptores, métodos para clonar ligandos polipeptídicos de los receptores.

La estructura y la expresión tisular de zcytor19 sugieren un papel en el desarrollo hematopoyético o timocítico precoz y en la regulación de la respuesta inmune. Estos procesos implican la estimulación de la proliferación y la diferenciación celulares en respuesta a la unión de una o más citocinas a sus receptores afines. A la vista de la distribución tisular observada para este receptor, los agonistas (incluyendo el ligando natural) y antagonistas tienen un enorme potencial en aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Los compuestos identificados como agonistas de receptor son útiles para estimular la proliferación y el desarrollo de células diana *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los compuestos agonistas o los anticuerpos anti-zcytor19 son útiles como componentes de medios de cultivo celular definidos y pueden ser usados solos o en combinación con otras citocinas y hormonas para reemplazar el suero que se usa comúnmente en el cultivo celular. Por lo tanto, los agonistas son útiles para promover específicamente el crecimiento y/o el desarrollo de células T, células B y otras células de los linajes linfóide y mieloide, y de células hematopoyéticas en cultivo.

Los ligandos agonistas de zcytor19 o los anticuerpos anti-zcytor19 pueden ser útiles para estimular la inmunidad mediada por células y para estimular la proliferación de linfocitos, tal como en el tratamiento de infecciones que conllevan inmunosupresión, incluyendo ciertas infecciones virales. Los usos adicionales incluyen la supresión tumoral cuando la transformación maligna da lugar a células tumorales que son antigénicas. Se podrían usar ligandos agonistas o anticuerpos anti-zcytor19 para provocar citotoxicidad, que puede ser mediada a través de la activación de células efectoras tales como células T, células asesinas naturales (NK; del inglés, natural killer), o células asesinas activadas por linfocinas (LAK; del inglés, lymphokine activated killer), o directamente provocada a través de rutas apoptóticas. Por ejemplo, se podrían utilizar anticuerpos anti-zcytor19 para estimular la citotoxicidad o la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; del inglés, antibody-dependent cellular cytotoxicity) sobre células cancerosas que portan zcytor19. Los ligandos agonistas pueden ser también útiles en el tratamiento de leucopenias al aumentar los niveles del tipo celular afectado, y para potenciar la regeneración del repertorio de células T después de un trasplante de médula ósea.

Los ligandos antagonistas, compuestos, receptores zcytor19 solubles o anticuerpos anti-zcytor19 pueden resultar útiles en la supresión del sistema inmune, tal como en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, incluyendo artritis.

tis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, etc. También se puede usar la supresión inmune para reducir el rechazo de trasplantes e injertos de tejidos u órganos y para tratar leucemias o linfomas específicos de células T al inhibir la proliferación del tipo celular afectado.

El presente invento contempla el uso de anticuerpos anti-zcytor19 desnudos (o fragmentos de los mismos), así como el uso de productos de inmunoconjugación, para llevar a cabo el tratamiento de diversos trastornos, incluyendo malignidades de células B y otros cánceres aquí descritos en que se expresa zcytor19. Dichos productos de inmunoconjugación, así como los anticuerpos anti-zcytor19, pueden ser usados para estimular la citotoxicidad o la ADCC sobre células cancerosas que portan zcytor19. Los productos de inmunoconjugación se pueden preparar usando técnicas estándares. Por ejemplo, se pueden preparar productos de inmunoconjugación al conjugar indirectamente un agente terapéutico con un componente de anticuerpo [véanse, por ejemplo, Shih *et al.*, Int. J. Cancer 41: 832-839 (1988); Shih *et al.*, Int. J. Cancer 46: 1101-1106 (1990); y Shih *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.057.313]. En resumen, un planteamiento estándar implica hacer reaccionar un componente de anticuerpo que tiene una porción de hidrato de carbono oxidada, con un polímero portador que tiene al menos una función amina libre y que está cargado con una pluralidad de fármaco, toxina, agente quelante, productos de adición de boro, u otro agente terapéutico. Esta reacción da lugar a un enlace inicial de base de Schiff (imina), que puede ser estabilizado por reducción hasta una amina secundaria para formar el producto de conjugación final.

El polímero portador puede ser un aminodextrano o un polipéptido de al menos 50 restos de aminoácido, aunque también se pueden utilizar otros portadores polímeros sustancialmente equivalentes. Preferiblemente, el producto de inmunoconjugación final es soluble en una disolución acuosa, tal como suero de mamífero, lo que facilita la administración y la dirección eficaz para uso en una terapia. De esta manera, las funciones solubilizantes del polímero portador potenciarán la solubilidad del producto de inmunoconjugación final en suero.

En un planteamiento alternativo para preparar productos de inmunoconjugación que comprendan un agente terapéutico polipeptídico, el agente terapéutico es copulado con aminodextrano por condensación con glutaraldehído o por reacción de grupos carboxilo activados del polipéptido con aminas del aminodextrano. Se pueden fijar agentes quelantes a un componente de anticuerpo para preparar productos de inmunoconjugación que comprendan radiometales o agentes potenciadores de la resonancia magnética. Los agentes quelantes ilustrativos incluyen derivados del ácido etilendiaminatetraacético y del ácido dietilentriaminapentaacético. Se pueden fijar productos de adición de boro, tales como carboranos, a componentes de anticuerpos mediante métodos convencionales.

También se pueden preparar productos de inmunoconjugación al conjugar directamente un componente de anticuerpo con un agente terapéutico. El procedimiento general es análogo al método indirecto de conjugación salvo por que se fija directamente un agente terapéutico a un componente oxidado de anticuerpo.

Como una ilustración más, se puede fijar un agente terapéutico a la región bisagra de un componente reducido de anticuerpo por medio de la formación de un enlace disulfuro. Por ejemplo, se pueden construir los péptidos del toxoide tetánico con un solo resto de cisteína que se utiliza para fijar el péptido a un componente de anticuerpo. Como una alternativa, se pueden fijar dichos péptidos al componente de anticuerpo usando un agente entrecruzante heterobifuncional, tal como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo [Yu *et al.*, Int. J. Cancer 56: 244 (1994)]. Las técnicas generales para dicha conjugación son bien conocidas en este campo técnico. Véanse, por ejemplo, Wong, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking" (CRC Press, 1991); Upeslakis *et al.*, "Modification of Antibodies by Chemical Methods" en "Monoclonal Antibodies: Principles and Applications", Birch *et al.* (redactores), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc., 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies" en "Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application", Ritter *et al.* (redactores), páginas 60-84 (Cambridge University Press, 1995).

Como se describió anteriormente, los restos de hidrato de carbono de la región Fc de un anticuerpo pueden ser utilizados para conjugar un agente terapéutico. Sin embargo, la región Fc está ausente si se utiliza un fragmento de anticuerpo como componente de anticuerpo del producto de inmunoconjugación. No obstante, es posible introducir un resto de hidrato de carbono en la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Véanse, por ejemplo, Leung *et al.*, J. Immunol. 154: 5919 (1995); y Hansen *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.443.953 (1995). Luego se utiliza el resto de hidrato de carbono construido para fijar un agente terapéutico.

Además, los expertos en la técnica reconocerán numerosas variaciones posibles de los métodos de conjugación. Por ejemplo, se puede utilizar el resto de hidrato de carbono para fijar polietilenglicol con objeto de prolongar la semivida de un anticuerpo intacto, o de un fragmento ligante de antígenos del mismo, en la sangre, la linfa u otros fluidos extracelulares. Además, es posible construir un producto de inmunoconjugación divalente al fijar agentes terapéuticos a un resto de hidrato de carbono y a un grupo sulfhidrilo libre. Dicho grupo sulfhidrilo libre puede estar situado en la región bisagra del componente de anticuerpo.

Un tipo de producto de inmunoconjugación comprende un componente de anticuerpo y una citotoxina polipeptídica. Un ejemplo de una citotoxina polipeptídica adecuada es una proteína inactivadora de ribosomas. Las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo I son proteínas de cadena única, mientras que las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo II consisten en dos subunidades no idénticas (cadenas A y B) unidas por un enlace disulfuro [para una revisión, véase Soria *et al.*, Targeted Diagn. Ther. 7: 193 (1992)]. Las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo I útiles incluyen polipéptidos de *Saponaria officinalis* (por ejemplo, saporina 1, saporina 2, saporina 3 y saporina 6),

Momordica charantia (por ejemplo, momordina), *Bryonia dioica* (por ejemplo, briodina y briodina 2), *Trichosanthes kirilowii* (por ejemplo, tricosantina y tricoquirina), *Gelonium multiflorum* (por ejemplo, gelonina), *Phytolacca americana* (por ejemplo, proteína antiviral de hierba carmín, proteína antiviral II de hierba carmín y proteína antiviral S de hierba carmín), *Phytolacca dodecandra* (por ejemplo, dodecandrina y proteína antiviral de *Mirabilis*), y similares. Por ejemplo, Walsh *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.635.384, describen proteínas inactivadoras de ribosomas.

Las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo II adecuadas incluyen polipéptidos de *Ricinus communis* (por ejemplo, ricina), *Abrus precatorius* (por ejemplo, abrina), *Adenia digitata* (por ejemplo, modicina), y similares. Puesto que las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo II incluyen una cadena B que se une a galactósidos y una cadena A tóxica que despurina la adenosina, los productos de conjugación de proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo II deberían incluir la cadena A. Las proteínas inactivadoras de ribosomas útiles adicionales incluyen buganina, clavina, proteínas inactivadoras de ribosomas de maíz, proteínas inactivadoras de ribosomas de *Vaccaria pyramidata*, nigrina b, nigrina básica 1, ebulina, racemosina b, lufina a, lufina b, lufina S y otras proteínas inactivadoras de ribosomas conocidas por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Bolognesi y Stirpe, Publicación Internacional n° WO 98/55623; Colnaghi *et al.*, Publicación Internacional n° WO 97/49726; Hey *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.635.384; Bolognesi y Stirpe, Publicación Internacional n° WO 95/07297; Arias *et al.*, Publicación Internacional n° WO 94/20540; Watanabe *et al.*, J. Biochem. 106: 6977 (1989); Islam *et al.*, Agric. Biol. Chem. 55: 229 (1991); y Gao *et al.*, FEBS Lett. 347: 257 (1994).

Los compuestos análogos y las variantes de las proteínas inactivadoras de ribosomas presentes en la naturaleza son también adecuados para las composiciones específicas aquí descritas, y dichas proteínas son conocidas por quienes tienen experiencia en la técnica. Utilizando secuencias de aminoácidos y nucleótidos públicamente disponibles, se pueden producir proteínas inactivadoras de ribosomas. Como una ilustración, Lorenzetti *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.529.932, describen una secuencia de nucleótidos que codifica saporina 6, mientras que Walsh *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.635.384, describen secuencias de nucleótidos y aminoácidos de proteínas inactivadoras de ribosomas del maíz y la cebada. Además, también se dispone comercialmente de proteínas inactivadoras de ribosomas.

Las citotoxinas polipeptídicas adicionales incluyen ribonucleasa, DNasa I, enterotoxina estafilocócica A, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*. Véanse, por ejemplo, Pastan *et al.*, Cell 47: 641 (1986), y Goldenberg, CA-A Cancer Journal for Clinicians 44: 43 (1994).

Otro tipo general de citotoxina útil es un inhibidor de tirosina cinasas. Puesto que se ha sugerido que la activación de la proliferación por tirosina cinasas desempeña un papel en el desarrollo y el progreso de los tumores, esta activación puede ser inhibida por componentes de un anticuerpo anti-zcyc19 que suministren inhibidores de tirosina cinasas. Los inhibidores de tirosina cinasas adecuados incluyen isoflavonas, tales como genisteína (5,7,4'-trihidroxiisoflavona), daidzeína (7,4'-dihidroxiisoflavona) y biochanina A (4-metoxigenisteína), y similares. Los métodos para conjugar inhibidores de tirosina con un factor de crecimiento son descritos, por ejemplo, por Uckun, Patente de EE.UU. n° 5.911.995.

Otro grupo de citotoxinas polipeptídicas útiles incluye inmunomoduladores. Como aquí se utiliza, el término "inmunomodulador" incluye citocinas, factores de crecimiento de células madre, linfotoxinas, moléculas coestimulantes, factores hematopoyéticos, y similares, así como compuestos análogos sintéticos de estas moléculas. Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen el factor de necrosis tumoral, interleucinas [por ejemplo, interleucina 1 (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, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19 e IL-20], factores estimulantes de colonias (por ejemplo, el factor estimulante de colonias de granulocitos y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), interferones (por ejemplo, los interferones α , β , γ , ω , ϵ , τ), el factor de crecimiento de células madre denominado "factor S1", eritropoyetina y trombopoyetina. Los grupos inmunomoduladores ilustrativos incluyen IL-2, IL-6, IL-10, interferón γ , TNF- α y similares.

Los productos de inmuoconjugación que incluyen un inmunomodulador proporcionan un medio para suministrar un inmunomodulador a una célula diana, y son particularmente útiles contra células tumorales. Los efectos citotóxicos de los inmunomoduladores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Klegerman *et al.*, "Lymphokines and Monokines" en "Biotechnology and Pharmacy", Pessuto *et al.* (redactores), páginas 53-70 (Chapman & Hall, 1993). Como una ilustración, los interferones pueden inhibir la proliferación celular al provocar una expresión aumentada de antígenos de histocompatibilidad de clase I en la superficie de diversas células y, de este modo, aumentar la velocidad de destrucción de células por linfocitos T citotóxicos. Además, se cree que los factores de necrosis tumoral, tal como el factor α de necrosis tumoral, producen efectos citotóxicos al provocar fragmentación de DNA.

El presente invento también incluye productos de inmuoconjugación que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica una citotoxina. Como un ejemplo de este planteamiento, Hoganson *et al.*, Human Gene Ther. 9: 2565 (1998), describen el suministro, mediado por FGF-2, de un gen de saporina al producir un producto de conjugación de FGF-2-polilisina que estaba condensado con un vector de expresión que comprendía un gen de saporina.

Otras toxinas adecuadas son conocidas por quienes tienen experiencia en la técnica.

Se pueden preparar productos de conjugación de polipéptidos citotóxicos y componentes de anticuerpo usando técnicas estándares para conjugar polipéptidos. Por ejemplo, Lam y Kelleher, Patente de EE.UU. n° 5.055.291, des-

criben la producción de anticuerpos conjugados con el fragmento A de la toxina diftérica o con la toxina ricina. El planteamiento general es también ilustrado mediante métodos para conjugar el factor de crecimiento de fibroblastos con saporina, como describen Lappi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 917 (1989); Soria *et al.*, *Targeted Diagn. Ther.* 7: 193 (1992); Buechler *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 234: 706 (1995); Behar-Cohen *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36: 2434 (1995); Lappi y Baird, Patente de EE.UU. n° 5.191.067; Calabresi *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.478.804; y Lappi y Baird, Patente de EE.UU. n° 5.576.288. Véanse también, Ghetie y Vitteta, "Chemical Construction of Immunotoxins" en "Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications", Francis y Delgado (redactores), páginas 1-26 (Humana Press, Inc., 2000); Hall (redactor), "Immunotoxin Methods and Protocols (Humana Press, Inc., 2000); y Newton y Rybak, "Construction of Ribonuclease-Antibody Conjugates for Selective Cytotoxicity" en "Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications, Francis y Delgado (redactores), páginas 27-35 (Humana Press, Inc., 2000).

Alternativamente, usando métodos estándares se pueden producir proteínas de fusión que comprendan un componente de anticuerpo y un polipéptido citotóxico. Los métodos para preparar proteínas de fusión que comprendan un grupo polipeptídico citotóxico son bien conocidos en la técnica de producción de proteínas de fusión de anticuerpo-toxina. Por ejemplo, Boleti *et al.*, *Ann. Oncol.* 6: 945 (1995); Nicolet *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 2: 161 (1995); Becker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7826 (1996); Hank *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2: 1951 (1996); y Hu *et al.*, *Cancer Res.* 56: 4998 (1996), describen proteínas de fusión de anticuerpo que comprenden un grupo interleucina 2. Además, Yang *et al.*, *Hum. Antibodies Hybridomas* 6: 129 (1995), describen una proteína de fusión que incluye un fragmento F(ab')₂ y un grupo factor alfa de necrosis tumoral. Chaudhary *et al.*, *Nature* 339: 394 (1989); Brinkmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8616 (1991); Batra *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5867 (1992); Friedman *et al.*, *J. Immunol.* 150: 3054 (1993); Wels *et al.*, *Int. J. Can.* 60: 137 (1995); Fominaya *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 10.560 (1996); Kuan *et al.*, *Biochemistry* 35: 2872 (1996); y Schmidt *et al.*, *Int. J. Can.* 65: 538 (1996), han descrito proteínas de fusión de anticuerpo-exotoxina A de *Pseudomonas*. Kreitman *et al.*, *Leukemia* 7: 553 (1993); Nicholls *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 5302 (1993); Thompson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 28.037 (1995); y Valleria *et al.*, *Blood* 88: 2342 (1996), han descrito proteínas de fusión de anticuerpo-toxina que contienen un grupo toxina diftérica. Deonarain *et al.*, *Tumor Targeting* 1: 177 (1995), han descrito una proteína de fusión de anticuerpo-toxina que tiene un grupo RNasa, mientras que Linardou *et al.*, *Cell Biophys.* 24-25: 243 (1994), produjeron una proteína de fusión de anticuerpo-toxina que comprendía un componente de DNasa I. Se usó gelonina como grupo toxínico en la proteína de fusión de anticuerpo-toxina de Better *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 14.951 (1995). Como un ejemplo más, Dohlsten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8945 (1994), informaron sobre una proteína de fusión de anticuerpo-toxina que comprendía enterotoxina estafilocócica A. Véase también Newton y Rybak, "Preparation of Recombinant RNase Single-Chain Antibody Fusion Proteins," in "Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications", Francis y Delgado (redactores), páginas 77-95 (Humana Press, Inc., 2000).

Como una alternativa a una citotoxina polipeptídica, los productos de inmuconjugación pueden comprender un radioisótopo como grupo citotóxico. Por ejemplo, un producto de inmuconjugación puede comprender un componente de anticuerpo anti-zcytor19 y un radioisótopo emisor de radiación α , un radioisótopo emisor de radiación β , un radioisótopo emisor de radiación γ , un emisor de electrones Auger, un agente captador de neutrones que emite partículas α , o un radioisótopo que se desintegra por captura electrónica. Los radioisótopos adecuados incluyen ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ³²P, ³³P, ¹²I, ¹³¹I, ¹²³I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁶⁷Cu, ²¹¹At, ⁴⁷Sc, ¹⁰³Pb, ¹⁰⁹Pd, ²¹²Pb, ⁷¹Ge, ⁷⁷As, ¹⁰⁵Rh, ¹¹³Ag, ¹¹⁹Sb, ¹²¹Sn, ¹³¹Cs, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁹¹Os, ^{193m}Pt, ¹⁹⁷Hg y similares.

Se puede fijar directa o indirectamente un radioisótopo a un componente de anticuerpo por medio de un agente quelante. Por ejemplo, se puede conjugar ⁶⁷Cu, que proporciona partículas β y rayos γ , con un componente de anticuerpo utilizando el ácido p-bromoacetamido-bencil-tetraetilaminatetraacético, un agente quelante [Chase y Shapiro, "Medical Applications of Radioisotopes" en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Gennaro (redactor), 19ª edición, páginas 843-865 (Mack Publishing Company, 1995)]. Como una alternativa, se puede copular ⁹⁰Y, que emite una partícula β energética, con un componente de anticuerpo usando el ácido dietilentriaminapentaacético. Además, Stein *et al.*, *Antibody Immunoconj. Radiopharm.* 4: 703 (1991), describen un método ejemplar adecuado para la radiomarcación directa de un componente de anticuerpo con ¹³¹I. Alternativamente, se pueden fijar productos de adición de boro, tales como carboranos, a componentes de anticuerpo usando técnicas estándares.

Otro tipo de citotoxina adecuada para la preparación de productos de inmuconjugación es un fármaco quimioterapéutico. Los fármacos quimioterapéuticos ilustrativos incluyen mostazas de nitrógeno, alquilsulfonatos, nitrosoureas, triazenos, compuestos análogos de ácido fólico, compuestos análogos de pirimidina, compuestos análogos de purina, antibióticos, epipodofilotoxinas, complejos de coordinación de platino, y similares. Los ejemplos específicos de fármacos quimioterapéuticos incluyen metotrexato, doxorubicina, daunorubicina, citosinarabinósido, cisplatino, vindesina, mitomicina, bleomicina, melfalán, clorambucilo, maitansinoides, caliqueamicina, taxol y similares. En "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 19ª edición (Mack Publishing Co., 1995), y en "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics", 9ª edición (MacMillan Publishing Co., 1995), se describen agentes quimioterapéuticos adecuados. Los expertos en la técnica conocen otros agentes quimioterapéuticos adecuados.

En otro planteamiento, se preparan productos de inmuconjugación al conjugar agentes o colorantes fotoactivos con un componente de anticuerpo. Se han usado agentes fluorescentes y otros agentes cromógenos, o colorantes, tales como porfirinas sensibles a la luz visible, para detectar y tratar lesiones al dirigir la luz adecuada a la lesión. Este tipo de "fotorradiación", "fototerapia" o terapia "fotodinámica" es descrito, por ejemplo, por Mew *et al.*, *J. Immunol.*

130: 1473 (1983); Jori *et al.* (redactores), "Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases" (Libreria Progetto, 1985); Oseroff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8744 (1986); van den Bergh, Chem. Britain 22: 430 (1986); Hasan *et al.*, Prog. Clin. Biol. Res. 288: 471 (1989); Tatsuta *et al.*, Lasers Surg. Med 9: 422 (1989); y Pelegrin *et al.*, Cancer 67: 2529 (1991).

5

Los planteamientos anteriormente descritos pueden ser también utilizados para preparar composiciones de anticuerpos multiespecíficos que comprendan un producto de inmunconjugación.

10 Se pueden utilizar anticuerpos anti-zcytor19 y composiciones de anticuerpos multiespecíficos para modular el sistema inmune evitando la unión de ligandos de zcytor19 con receptores zcytor19 endógenos. Dichos anticuerpos pueden ser administrados a cualquier sujeto que necesite tratamiento, y el presente invento contempla tanto el uso terapéutico veterinario como el humano. Los sujetos ilustrativos incluyen sujetos mamíferos, tales como animales de granja, animales domésticos y pacientes humanos.

15 Se pueden utilizar composiciones de anticuerpos multiespecíficos y anticuerpos reactivos dobles que se unen a zcytor19 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, cánceres de células B, inmunomodulación, y otras patologías (por ejemplo, ITC, enfermedades mediadas por células T, enfermedad del ganadero, enfermedad autoinmune, síndrome mielodisplásico, y similares), enfermedades renales, rechazo de injertos, y enfermedad del injerto contra huésped. Los anticuerpos del presente invento pueden ser dirigidos para regular específicamente las respuestas de células B durante la respuesta inmune. Además, los anticuerpos del presente invento pueden ser utilizados para modular el desarrollo de células B, la presentación antigénica por células B, la producción de anticuerpos y la producción de citocinas.

25 Los anticuerpos anti-zcytor19 antagonistas pueden ser útiles para neutralizar los efectos de ligandos de zcytor19 para tratar linfomas y leucemias de células B, leucemia linfocítica crónica o aguda, mielomas tales como el mieloma múltiple, citomas plasmáticos, y linfomas tales como el linfoma no hodgkiniano, procesos asociados con un aumento de polipéptidos ligandos de zcytor19 o en los que el ligando de zcytor19 es un factor de supervivencia o un factor de crecimiento. Los anticuerpos anti-zcytor19 pueden ser también utilizados para tratar los linfomas asociados con el virus de Epstein-Barr que aparecen en pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo, con sida o sometidos a un trasplante de órgano).

30 Los anticuerpos anti-zcytor19 que inducen una señal al unirse con zcytor19 pueden inhibir directamente el crecimiento de células del linfoma y leucemia a través de la inducción de señales que conducen a una inhibición del crecimiento, detención del ciclo celular, apoptosis o muerte de células tumorales. Los anticuerpos anti-zcytor19 que inician una señal son anticuerpos preferidos para inhibir o matar directamente células cancerosas. Además, los anticuerpos monoclonales anti-zcytor19 agonistas pueden activar las células B normales y provocar una respuesta inmune anticancerosa. Los anticuerpos anti-zcytor19 pueden inhibir directamente el crecimiento de leucemias, linfomas y mielomas múltiples, y los anticuerpos pueden afectar a funciones efectoras inmunes. Los anticuerpos monoclonales anti-zcytor19 pueden permitir una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, una citotoxicidad dependiente del complemento, y fagocitosis.

45 El ligando de zcytor19 se puede expresar en neutrófilos, monocitos, células dendríticas y monocitos activados. En ciertos trastornos autoinmunes (por ejemplo, miastenia gravis y artritis reumatoide), las células B podrían exacerbar la autoinmunidad después de una activación por el ligando de zcytor19. Las proteínas inmunosupresoras que bloquearan selectivamente la acción de los linfocitos B serían útiles para tratar la enfermedad. La producción de autoanticuerpos es una característica común a diversas enfermedades autoinmunes y contribuye a la destrucción tisular y la exacerbación de la enfermedad. Los autoanticuerpos también pueden conducir a la aparición de complicaciones por depósito de complejos inmunes y conducir a muchos síntomas del lupus eritematoso sistémico, incluyendo la insuficiencia renal, síntomas neurálgicos y la muerte. En muchos estados morbosos, también sería beneficioso modular la producción de anticuerpos independientemente de la respuesta celular. Se ha mostrado también que las células B desempeñan un papel en la secreción de inmunoglobulinas artritogénicas en la artritis reumatoide. En sí, la inhibición de la producción de anticuerpos contra el ligando de zcytor19 sería beneficiosa en el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la miastenia gravis y la artritis reumatoide. Para tales fines, serían útiles los agentes terapéuticos inmunosupresores, tales como anticuerpos anti-zcytor19, que bloquearan o neutralizaran selectivamente la acción de los linfocitos B.

55

El invento proporciona métodos en que se emplean anticuerpos anti-zcytor19, o composiciones de anticuerpos multiespecíficos, para bloquear o neutralizar selectivamente las acciones de las células B en asociación con enfermedades renales de fase terminal, las cuales pueden estar asociadas o no con enfermedades autoinmunes. Dichos métodos también serían útiles para tratar enfermedades renales inmunológicas. Dichos métodos serían útiles para tratar la glomerulonefritis asociada con enfermedades tales como nefropatía membranosa, nefropatía por IgA o enfermedad de Berger, nefropatía por IgM, enfermedad de Goodpasture, glomerulonefritis posinfecciosa, enfermedad mesangioproliferativa, leucemia linfocítica crónica y síndrome nefrótico por cambios mínimos. Dichos métodos también servirían como aplicaciones terapéuticas para tratar la vasculitis o glomerulonefritis secundaria asociada con enfermedades tales como lupus, poliarteritis, púrpura de Henoch-Schonlein, esclerodermia, enfermedades relacionadas con el VIH, amiloidosis y síndrome urémico hemolítico. Los métodos del presente invento también serían útiles como parte de una aplicación terapéutica para tratar la nefritis intersticial o la pielonefritis asociadas con pielonefritis crónica, abuso de analgésicos, nefrocalcinosis, nefropatía causada por otros agentes, nefrolitiasis o nefritis intersticial crónica o aguda.

65

El presente invento también proporciona métodos para el tratamiento de neoplasias renales u urológicas, mielomas múltiples, linfomas, leucemias, neuropatía por cadenas ligeras, o amiloidosis.

El invento también proporciona métodos para bloquear o inhibir células B activadas, usando anticuerpos anti-zcytor19 o composiciones de anticuerpos multiespecíficos, para el tratamiento del asma y otras enfermedades crónicas de las vías aéreas, tales como la bronquitis y el enfisema.

También se proporcionan métodos para inhibir o neutralizar una respuesta de células T usando anticuerpos anti-zcytor19 o composiciones de anticuerpos multiespecíficos para inmunosupresión, en particular para un uso terapéutico tal como la enfermedad de injerto contra el huésped o el rechazo de injertos. Además, los anticuerpos anti-zcytor19 o las composiciones de anticuerpos multiespecíficos serían útiles en protocolos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM; del inglés, insulin dependent diabetes mellitus), la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD; del inglés, inflammatory bowel disease) y la enfermedad de Crohn. Los métodos del presente invento tendrían un valor terapéutico adicional para tratar enfermedades inflamatorias crónicas, en particular para reducir el dolor articular, la hinchazón, la anemia y otros síntomas asociados, así como para tratar el shock séptico.

Las respuestas de las células B son importantes en la lucha contra las enfermedades infecciosas, incluyendo las infecciones por bacterias, virus, protozoos y parásitos. Los anticuerpos contra microorganismos infecciosos pueden inmovilizar el patógeno por unión con el antígeno, seguida de lisis mediada por complemento o ataque mediado por células. Los anticuerpos anti-zcytor19 agonistas, o de señalización, pueden servir para potenciar la respuesta humoral y serían una herramienta terapéutica útil para los individuos que presentan riesgo de una enfermedad infecciosa o como un complemento de una vacunación.

Se dispone de modelos animales bien establecidos para probar la eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-zcytor19 o las composiciones de anticuerpos multiespecíficos del presente invento en ciertos estados morbosos. Como una ilustración, los anticuerpos anti-zcytor19 pueden ser probados *in vivo* en diversos modelos animales de enfermedad autoinmune, tales como las razas de ratón congénicas MRL-*lpr/lpr* o NZBxNZW F1, que sirven como un modelo del lupus eritematoso sistémico. Dichos modelos animales son conocidos en la técnica.

La progenie de un cruce entre ratones negros de Nueva Zelanda (NZB; del inglés, New Zealand Black) y ratones blancos de Nueva Zelanda (NZW; del inglés, New Zealand White) desarrolla una forma espontánea del lupus eritematoso sistémico que se parece mucho al lupus eritematoso sistémico de los seres humanos. La progenie de los ratones, conocida como NZBW, comienza a desarrollar autoanticuerpos IgM contra células T al mes de edad y, a los 5-7 meses de edad, los autoanticuerpos Ig anti-DNA son la inmunoglobulina dominante. Una hiperactividad policlonal de células B conduce a una sobreproducción de autoanticuerpos. El depósito de estos autoanticuerpos, particularmente de aquellos dirigidos contra DNA de cadena sencilla, se asocia con el desarrollo de glomerulonefritis, que se manifiesta clínicamente como proteinuria, azotemia, y muerte por insuficiencia renal. La insuficiencia renal es la causa principal de muerte en los ratones afectados con lupus eritematoso sistémico espontáneo y, en la raza NZBW, este proceso es crónico y obliterador. La enfermedad es más rápida y grave en las hembras que en los machos, con una supervivencia media de sólo 245 días para las hembras y de 406 días para los machos. Aunque muchas de las hembras de ratón serán sintomáticas (proteinuria) a los 7-9 meses de edad, algunas pueden ser mucho más jóvenes o más viejas cuando desarrollan los síntomas. La nefritis inmune fatal vista en los ratones NZBW es muy similar a la glomerulonefritis vista en el lupus eritematoso sistémico humano, lo que hace que este modelo murino espontáneo sea útil para el ensayo de posibles agentes terapéuticos para el lupus eritematoso sistémico.

Se han utilizado modelos murinos de encefalomiелitis alérgica experimental como herramientas para investigar tanto los mecanismos de la enfermedad inmunemente mediada como los métodos para una posible intervención terapéutica. El modelo se parece a la esclerosis múltiple humana y produce desmielinización como resultado de la activación de células T hacia proteínas neurales tales como la proteína básica de la mielina y la proteína proteolipídica. La inoculación del antígeno conduce a una inducción de células T CD4+ restringidas por el MHC de clase II. Ciertos cambios en el protocolo para la encefalomiелitis alérgica experimental pueden producir variantes agudas, de recidivas crónicas o de transferencia pasiva del modelo.

En el modelo de artritis provocada con colágeno, los ratones desarrollan una artritis inflamatoria crónica que se parece mucho a la artritis reumatoide humana. La artritis provocada con colágeno, puesto que comparte unos rasgos inmunológicos y patológicos similares con la artritis reumatoide, es un modelo ideal para explorar posibles compuestos antiinflamatorios para seres humanos. Otra ventaja de usar el modelo de artritis provocada con colágeno es que se conocen los mecanismos de la patogénesis. Se han identificado los epítopos de células T y B en el colágeno de tipo II y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (hipersensibilidad de tipo retardado y anticuerpo anti-colágeno) e inflamatorios (citocinas, quimiocinas y enzimas degradantes de la matriz) relativos a la artritis inmunemente mediada que pueden ser usados para evaluar la eficacia de los compuestos de ensayo en los modelos.

La miastenia gravis es otra enfermedad autoinmune para la cual se dispone de modelos murinos. La miastenia gravis es un trastorno de la transmisión neuromuscular que implica la producción de autoanticuerpos dirigidos contra el receptor nicotínico de la acetilcolina. La miastenia gravis es adquirida o heredada con unas características clínicas que incluyen una debilidad y una fatiga tras esfuerzo anormales. Sea establecido un modelo de miastenia gravis en ratón. La miastenia gravis autoinmune experimental es una enfermedad mediada por anticuerpos, caracterizada por la

presencia de anticuerpos contra el receptor de la acetilcolina. Estos anticuerpos destruyen el receptor, lo que conduce a impulsos eléctricos neuromusculares defectuosos que dan lugar a una debilidad muscular. En el modelo de miastenia gravis autoinmune experimental, los ratones son inmunizados con el receptor nicotínico de la acetilcolina. Los signos clínicos de la miastenia gravis resultan evidentes semanas después de la segunda inmunización. La miastenia gravis autoinmune experimental es evaluada mediante diversos métodos que incluyen medir los niveles séricos de anticuerpos contra el receptor de acetilcolina mediante un radioinmunoensayo, medir el receptor muscular de la acetilcolina, y electromiografía.

Generalmente, la dosificación de los anticuerpos anti-zcytor19 administrados, o de las composiciones de anticuerpos multiespecíficos, variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la estatura, el sexo, el estado médico general y la historia médica previa del sujeto. Como una ilustración, se pueden administrar anticuerpos anti-zcytor19, o composiciones de anticuerpos multiespecíficos, en dosis con bajo nivel de proteína, tales como de 20 a 100 miligramos de proteína por dosis, administrados una vez o repetidamente. Alternativamente, se pueden administrar anticuerpos anti-zcytor19, o composiciones de anticuerpos multiespecíficos, en dosis de 30 a 90 miligramos de proteína por dosis, o de 40 a 80 miligramos de proteína por dosis, o de 50 a 70 miligramos de proteína por dosis, aunque, según dicten las circunstancias, también se pueden administrar dosis menores o mayores.

La administración de componentes de anticuerpo a un sujeto puede ser intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, por perfusión a través de un catéter regional o por inyección intralésional directa. Cuando se administran proteínas terapéuticas por inyección, la administración puede ser por infusión continua o mediante un único bolo o múltiples bolos. Las vías adicionales de administración incluyen las vías oral, mucosa-membranal, pulmonar y transcutánea.

Se puede formular una composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo anti-zcytor19, o componentes de anticuerpo biespecíficos, de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante los cuales se combinan las proteínas terapéuticas en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por el paciente receptor. Una disolución salina tamponada con fosfato y estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gennaro (redactor), "Remington's Pharmaceutical Sciences", 19ª edición (Mack Publishing Company, 1995).

Con fines de terapia, se administran anticuerpos anti-zcytor19, o componentes de anticuerpo biespecíficos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una combinación de anticuerpos anti-zcytor19, o de componentes de anticuerpo biespecíficos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da lugar a un cambio detectable en la fisiología del paciente receptor. Por ejemplo, un agente utilizado para tratar la inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia la respuesta inflamatoria. Como otro ejemplo, un agente utilizado para inhibir el crecimiento de células tumorales es fisiológicamente significativo si la administración del agente da lugar a una disminución en el número de células tumorales, una metástasis disminuida, una disminución en el tamaño de un tumor sólido, o una necrosis aumentada de un tumor.

La composición farmacéutica que comprende anticuerpos anti-zcytor19, o componentes de anticuerpo biespecíficos, puede ser administrada en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas son ilustradas mediante disoluciones inyectables y suspensiones orales. Las formas sólidas ejemplares incluyen cápsulas, tabletas y formas de liberación controlada. La última forma es ilustrada mediante bombas miniosmóticas e implantes [Bremer *et al.*, Pharm. Biotechnol. 10: 239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery" en "Drug Delivery Systems", Ranade y Hollinger (redactores), páginas 95-123 (CRC Press, 1995); Bremer *et al.*, "Protein Delivery with Infusion Pumps" en "Protein Delivery: Physical Systems", Sanders y Hendren (redactores), páginas 239-254 (Plenum Press, 1997); Yewey *et al.*, "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant" en "Protein Delivery: Physical Systems", Sanders y Hendren (redactores), páginas 93-117 (Plenum Press, 1997)].

Los expertos en la técnica pueden crear diversas composiciones farmacéuticas utilizando técnicas estándares. Véanse, por ejemplo, Lieberman *et al.* (redactores), "Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets", volumen 1, 2ª edición (Marcel Dekker, Inc., 1989); Lieberman *et al.* (redactores), "Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets", volumen 2, 2ª edición (Marcel Dekker, Inc., 1990); Lieberman *et al.* (redactores), "Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets", volumen 3, 2ª edición (Marcel Dekker, Inc., 1990); Lieberman *et al.* (redactores), "Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems", volumen 1, 2ª edición (Marcel Dekker, Inc., 1996); Lieberman *et al.* (redactores), "Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems", volumen 2, 2ª edición (Marcel Dekker, Inc., 1996); Lieberman *et al.* (redactores), "Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems", volumen 3, 2ª edición (Marcel Dekker, Inc., 1998); Avis *et al.* (redactores), "Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications", volumen 1, 2ª edición (Marcel Dekker, Inc., 1991); Lieberman *et al.* (redactores), "Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications", volumen 2, 2ª edición (Marcel Dekker, Inc., 1992); y Avis *et al.* (redactores), "Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications", volumen 3, 2ª edición (Marcel Dekker, Inc., 1993).

Como otro ejemplo, los liposomas proporcionan un medio para distribuir intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular o subcutáneamente, o mediante administración oral, inhalación o administración intranasal, anticuerpos

anti-zcytor19, o componentes de anticuerpo biespecíficos, a un sujeto. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos [véanse, en general, Bakker-Woudenberg *et al.*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Supl. 1): S61 (1993); Kim, Drugs 46: 618 (1993); y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers" en "Drug Delivery Systems", Ranade y Hollinger (redactores), páginas 3-24 (CRC Press, 1995). Los liposomas tienen una composición similar a la de las membranas celulares y, como resultado, pueden administrarse de forma segura y son biodegradables. Dependiendo del método de preparación, los liposomas pueden ser unilaminares o multilaminares y su tamaño puede variar, con diámetros que van de 0,02 μm hasta más de 10 μm . Se pueden encapsular diversos agentes en los liposomas: reparto de agentes hidrófobos en las bicapas y reparto de agentes hidrófilos en el(los) espacio(s) acuoso(s) interno(s) [véanse, por ejemplo, Machy *et al.*, "Liposomes in Cell Biology and Pharmacology" (John Libbey, 1987); y Ostro *et al.*, American J. Hosp. Pharm. 46: 1576 (1989)]. Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño del liposoma, el número de bicapas, la composición lipídica, así como la carga y las características superficiales de los liposomas.

Los liposomas pueden ser adsorbidos por casi cualquier tipo de célula y liberar luego lentamente el agente encapsulado. Alternativamente, un liposoma absorbido puede ser endocitado por células que son fagocíticas. La endocitosis va seguida de degradación intralisosomal de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados [Scherphof *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 446: 368 (1985)]. Después de una administración intravenosa, los liposomas pequeños (de 0,1 a 1,0 μm) son típicamente incorporados por células del sistema reticuloendotelial, situadas principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas mayores de 3,0 μm se depositan en el pulmón. Esta incorporación preferente de los liposomas más pequeños por las células del sistema reticuloendotelial ha sido utilizada para suministrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos y a tumores del hígado.

El sistema reticuloendotelial puede ser evitado mediante diversos métodos que incluyen la saturación con grandes dosis de partículas liposomales y la inactivación selectiva de macrófagos por medios farmacológicos [Claassen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 802: 428 (1984)]. Además, se ha mostrado que la incorporación de fosfolípidos derivatizados con glicolípidos o polietilenglicol a las membranas de los liposomas da lugar a una absorción significativamente reducida por el sistema reticuloendotelial [Allen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1068: 133 (1991); Allen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993)].

Como una alternativa a la administración de liposomas que comprenden un componente de anticuerpo anti-zcytor19, las células diana pueden ser previamente marcadas con anticuerpos anti-zcytor19 biotinilados. Después de la eliminación plasmática del anticuerpo libre, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. Este planteamiento general es descrito, por ejemplo, por Harasym *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 32: 99 (1998). Dicho planteamiento puede ser también usado para preparar composiciones de anticuerpos multiespecíficos.

Los polipéptidos que comprenden un componente de anticuerpo anti-zcytor19, o componentes de anticuerpo biespecíficos, pueden ser encapsulados en liposomas o ser fijados al exterior de los liposomas utilizando técnicas estándares [véanse, por ejemplo, Anderson *et al.*, Infect. Immun. 31: 1099 (1981); Wassef *et al.*, Meth. Enzymol. 149: 124 (1987); Anderson *et al.*, Cancer Res. 50: 1853 (1990); Cohen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1063: 95 (1991); Alving *et al.*, "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies" en "Liposome Technology", 2ª edición, Vol. III, Gregoriadis (redactor), página 317 (CRC Press, 1993); y Ansell *et al.*, "Antibody Conjugation Methods for Active Targeting of Liposomes" en "Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications", Francis y Delgado (redactores), páginas 51-68 (Humana Press, Inc., 2000)]. Como se indicó anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener una diversidad de componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de polietilenglicol [Allen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993)].

Se han diseñado microesferas de polímeros degradables para mantener elevados niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables tales como poli(lactida-co-glicolida) (PLG), polianhídridos, poli(orto-ésteres) y polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en que quedan atrapadas las proteínas [Gombotz y Pettit, Bioconjugate Chem. 6: 332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery" en "Drug Delivery Systems", Ranade y Hollinger (redactores), páginas 51-93 (CRC Press, 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery" en "Protein Delivery: Physical Systems", Sanders y Hendren (redactores), páginas 45-92 (Plenum Press, 1997); Bartus *et al.*, Science 281: 1161 (1998); Putney y Burke, Nature Biotechnology 16: 153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 548 (1998)]. Las nanoesferas revestidas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para la administración intravenosa de proteínas terapéuticas [véanse, por ejemplo, Gref *et al.*, Pharm. Biotechnol. 10: 167 (1997)].

El presente invento también contempla componentes de anticuerpo químicamente modificados en que un componente de anticuerpo está enlazado con un polímero. Típicamente, el polímero es soluble en agua para que el componente de anticuerpo no precipite en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es uno que ha sido modificado para que tenga un único grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación o un aldehído para alquilación. De esta manera, se puede controlar el grado de polimerización. Un ejemplo de un aldehído reactivo es el polietilenglicol-propionaldehído, o derivados monoalcoxilados (C_1 - C_{10}) o ariloxilados del mismo (véase, por ejemplo, Harris *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.252.714). El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Además, se puede utilizar una mezcla de polímeros para preparar productos de conjugación con componentes de anticuerpo.

Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG, monoalcoxi (C₁-C₁₀)-PEG, ariloxi-PEG, poli(N-vinilpirrolidona)PEG, tresil-monometoxi-PEG, PEG-propionaldehído, carbonato de bis-succinimidilo-PEG, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxitilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico), dextrano, celulosa y otros polímeros basados en hidratos de carbono. El PEG adecuado puede tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, incluyendo, por ejemplo, 5000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un producto de conjugación puede comprender también una mezcla de polímeros solubles en agua.

Como una ilustración, se puede fijar un grupo poli(óxido de alquilo) al extremo N de un componente de anticuerpo. El PEG es un poli(óxido de alquilo) adecuado. Como una ilustración, se puede modificar un componente de anticuerpo con PEG, un procedimiento conocido como "PEGilación". La PEGilación de un componente de anticuerpo puede ser llevada a cabo mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica [véanse, por ejemplo, el Documento EP 0154316; Delgado *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249 (1992); Duncan y Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* 27: 290 (1994); y Francis *et al.*, *Int. J. Hematol.* 68:1 (1998)]. Por ejemplo, la PEGilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva. En un planteamiento alternativo, se forman productos de conjugación de componentes de anticuerpo por condensación de un PEG activado en que se ha sustituido un grupo hidroxilo o amino terminal por un conector activado (véase, por ejemplo, Karasiewicz *et al.*, Patente de EE.UU. nº 5.382.657).

La PEGilación por acilación requiere típicamente hacer reaccionar un derivado éster activo de PEG con un componente de anticuerpo. Un ejemplo de un éster de PEG activado es PEG esterificado con N-hidroxisuccinimida. Como aquí se usa, el término "acilación" incluye los siguientes tipos de enlace entre un componente de anticuerpo y un polímero soluble en agua: amida, carbamato, uretano y similares. Los métodos para preparar componentes de anticuerpo anti-zcytor19 PEGilados por acilación comprenderán típicamente las operaciones de (a) hacer reaccionar un componente de anticuerpo con PEG (tal como un éster reactivo de un derivado aldehídico de PEG) en unas condiciones bajo las cuales se fijan uno o más grupos PEG al componente de anticuerpo, y (b) obtener el(los) producto(s) de reacción. Generalmente, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán basándose en parámetros conocidos y los resultados deseados. Por ejemplo, cuanto mayor sea la relación de PEG:componente de anticuerpo, mayor será el porcentaje de producto de componente de anticuerpo poliPEGilado.

El producto de la PEGilación por acilación es típicamente un producto de componente de anticuerpo poliPEGilado en que los grupos ϵ -amino de la lisina están PEGilados por medio de un grupo acilo enlazante. Un ejemplo de un enlace conector es una amida. Típicamente, el componente de anticuerpo resultante estará al menos mono-, di- o tri-PEGilado al 95%, aunque se pueden formar algunas especies con grados mayores de PEGilación dependiendo de las condiciones de reacción. Las especies PEGiladas pueden ser separadas del componente de anticuerpo no conjugado usando métodos de purificación estándares, tales como diálisis, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares.

La PEGilación por alquilación implica generalmente hacer reaccionar un derivado aldehídico terminal de PEG con el componente de anticuerpo en presencia de un agente reductor. Se pueden fijar grupos PEG al polipéptido a través de un grupo -CH₂-NH.

La derivatización a través de una alquilación reductora para producir un producto monoPEGilado se aprovecha de la reactividad diferencial de los diferentes tipos de grupos amino primario asequibles para derivatización. Típicamente, la reacción se lleva a cabo a un pH que permite aprovecharse de las diferencias de pKa entre los grupos ϵ -amino de los restos de lisina y el grupo α -amino del resto N-terminal de la proteína. Mediante dicha derivatización selectiva, se controla la fijación de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo, tal como un aldehído, a una proteína. La conjugación con el polímero se produce predominantemente en el extremo N de la proteína sin una modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de la lisina.

La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de una molécula de conjugación de monopolímero y componente de anticuerpo puede comprender las operaciones de: (a) hacer reaccionar un componente de anticuerpo con un PEG reactivo bajo unas condiciones de alquilación reductora, en un pH adecuado que permita la modificación selectiva del grupo α -amino del extremo amínico del componente de anticuerpo, y (b) obtener el(los) producto(s) de reacción. El agente reductor utilizado para la alquilación reductora debería ser estable en disolución acuosa y, preferiblemente, ser capaz de reducir sólo la base de Schiff formada en el proceso inicial de la alquilación reductora. Los agentes reductores preferidos incluyen borohidruro sódico, cianoborohidruro sódico, dimetilamina-borano, trimetilamina-borano y piridina-borano.

Para una población sustancialmente homogénea de productos de conjugación de monopolímero y componente de anticuerpo, las condiciones de la reacción de alquilación reductora son aquellas que permiten la fijación selectiva del grupo polímero soluble en agua al extremo N del componente de anticuerpo. Dichas condiciones de reacción prevén generalmente las diferencias de pKa entre los grupos amino de la lisina y el grupo α -amino del extremo N. El pH también afecta a la relación de polímero a proteína que se va a utilizar. En general, si el pH es menor, se deseará un exceso mayor de polímero a proteína porque, cuanto menos reactivo sea el grupo α N-terminal, más polímero se necesitará para alcanzar las condiciones óptimas. Si el pH es mayor, no es necesario que la relación polímero:componente de anticuerpo sea tan grande porque se dispone de grupos más reactivos. Típicamente, el pH caerá en el intervalo de 3 a 9, o de 3 a 6.

En la técnica se conocen métodos generales para preparar productos de conjugación que comprendan un polipéptido y grupos polímeros solubles en agua. Véanse, por ejemplo, Karasiewicz *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.382.657; Greenwald *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.738.846; Nieforth *et al.*, Clin. Pharmacol. Ther. 59: 636 (1996); y Monkarsh *et al.*, Anal. Biochem. 247: 434 (1997).

5

También se pueden conjugar citotoxinas polipeptídicas con un polímero soluble utilizando los métodos anteriores, ya sea antes o después de la conjugación con un componente de anticuerpo. También se pueden conjugar polímeros solubles con proteínas de fusión de anticuerpos.

10 Los anticuerpos anti-zcytor19 desnudos, o los fragmentos de anticuerpo, pueden ser complementados con la administración de un producto de inmunconjugación o una proteína de fusión de anticuerpo. En una variación, se administran anticuerpos anti-zcytor19 desnudos (o fragmentos de anticuerpos desnudos) con anticuerpos anti-zcytor19 o fragmentos de anticuerpo radiomarcados en dosis baja. Como una segunda alternativa, se administran anticuerpos anti-zcytor19 desnudos (o fragmentos de anticuerpo) con productos de inmunconjugación de citocina-anticuerpos
15 anti-zcytor19 radiomarcados en dosis baja. Como una tercera alternativa, se administran anticuerpos anti-zcytor19 desnudos (o fragmentos de anticuerpo) con productos de inmunconjugación de citocina-anti-zcytor19 que no están radiomarcados. Con respecto a las “dosis bajas” de los productos de inmunconjugación marcados con ¹³¹I, una dosis preferible está en el intervalo de 555 a 1480 MBq, aunque el intervalo más preferible es de 740 a 1110 MBq. Por contraste, una dosis preferida de los productos de inmunconjugación marcados con ⁹⁰Y está en el intervalo de 370 a 1110 MBq, aunque el intervalo más preferible es de 370 a 740 MBq. Similarmente, los componentes de anticuerpo
20 biespecíficos pueden ser complementados con la administración de un producto de inmunconjugación o una proteína de fusión de anticuerpo.

Los productos de inmunconjugación que tienen un vehículo cargado con productos de adición de boro para
25 terapia por activación de neutrones térmicos se obtendrán normalmente de maneras similares. Sin embargo, antes de llevar a cabo la irradiación con neutrones, resultará ventajoso esperar hasta que el producto de inmunconjugación no dirigido sea aclarado. Se puede acelerar el aclaramiento usando un anticuerpo que se una con el producto de inmunconjugación. Para una descripción de este principio general, véase la Patente de EE.UU. n° 4.624.846.

30 El presente invento también contempla un método de tratamiento mediante el cual se administran inmunomoduladores para evitar, mitigar o invertir la toxicidad sobre células normales, y especialmente sobre células hematopoyéticas, provocada con radiación o provocada con fármacos. La terapia adjunta con inmunomoduladores permite la administración de dosis mayores de agentes citotóxicos a causa de la tolerancia aumentada del mamífero receptor. Además, la terapia adjunta con inmunomoduladores puede evitar, paliar o invertir la toxicidad medular limitante de la dosis.
35 Los ejemplos de inmunomoduladores adecuados para terapia adjunta incluyen el factor estimulante de las colonias de granulocitos, el factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos, la trombopoyetina, IL-1, IL-3, IL-12 y similares. El método de la terapia adjunta con inmunomoduladores es descrito por Goldenberg, Patente de EE.UU. n° 5.120.525.

40 La eficacia de la terapia con anticuerpos anti-zcytor19 puede ser potenciada complementando los componentes de anticuerpos desnudos con productos de inmunconjugación y otras formas de terapia complementaria aquí descritas. En dichos regímenes multimodales, las composiciones terapéuticas complementarias pueden ser administradas antes, concurrentemente o después de la administración de los anticuerpos anti-zcytor19 desnudos. Las terapias multimodales del presente invento incluyen además inmunoterapia con componentes de anticuerpo anti-zcytor19 desnudos,
45 complementada con la administración de productos de inmunconjugación de anti-zcytor19. En otra forma de terapia multimodal, los sujetos reciben anticuerpos anti-zcytor19 desnudos y quimioterapia estándar para el cáncer.

Los anticuerpos, productos de inmunconjugación y proteínas de fusión de anticuerpo aquí descritos pueden ser también ventajosamente complementados con componentes de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos desnudos, fragmentos de anticuerpos desnudos, productos de inmunconjugación, proteínas de fusión de anticuerpos, etc.) que se unen a la llamada “región tallo” del receptor TACI, que se encuentra entre la segunda región rica en cisteína y el dominio transmembranal. Algunos estudios indican que, en cierta medida, las proteínas TACI son escindidas y des-
50 prendidas por las células, quedando un pequeño péptido extracelular o tallo en la superficie celular. Se halló que un anticuerpo monoclonal murino era terapéuticamente útil en un modelo murino de linfoma. Un mapeo epitópico indica que el anticuerpo se une con un fragmento del dominio extracelular de TACI, representado por los restos de aminoácido 110 a 118 de la ID. SEC. n° 4. Se pueden generar anticuerpos contra un polipéptido que representa la región entre el segundo dominio rico en cisteína y el dominio transmembranal (restos de aminoácido 105 a 166 de la ID. SEC. n° 4), o contra un fragmento del mismo (por ejemplo, los restos de aminoácido 110 a 118 de la ID. SEC. n° 4). Dichos anticuerpos son particularmente útiles para el tratamiento de células tumorales que portan TACI, tales como células
60 de linfomas B, células de mielomas, y similares.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo del presente invento pueden ser utilizados como vacunas para tratar los diversos trastornos y enfermedades anteriormente descritos. Como un ejemplo, un componente de anticuerpo de un anticuerpo monoclonal reactivo doble contra TACI/BCMA puede proporcionar una base adecuada para una vacuna.
65 Las regiones ricas en cisteína de los receptores zcytor19 también pueden proporcionar componentes útiles para una vacuna. Por ejemplo, una vacuna puede comprender al menos uno de los siguientes polipéptidos: un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 8 a 41 de la ID. SEC. n° 2, un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 34 a 66 de la ID. SEC. n° 4, y un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 71 a 104 de la ID. SEC. n° 4.

La eficacia de un componente de anticuerpo como una vacuna puede ser potenciada al conjugar el componente de anticuerpo con una proteína portadora inmunogénica soluble. Las proteínas portadoras adecuadas incluyen la toxina/toxide del tétanos, la proteína NTHi de alto peso molecular, la toxina/toxide de la difteria, la toxina A destoxificada de *P. aeruginosa*, la toxina/toxide del cólera, la toxina/toxide pertussis, las exotoxinas/toxide de *Clostridium perfringens*, el antígeno superficial de la hepatitis B, el antígeno nuclear de la hepatitis B, la proteína VP7 de rotavirus, las proteínas F y G del virus sincitial respiratorio, y similares. Los métodos para preparar vacunas conjugadas son conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Cruse y Lewis (redactores), "Conjugate Vaccines" (S. Karger Publishing, 1989); y O'Hagan (redactor), "Vaccine Adjuvants" (Humana Press, Inc., 2000). Una composición para vacunación puede incluir también un agente adyuvante. Los ejemplos de agentes adyuvantes adecuados incluyen hidróxido de aluminio y lípidos. Los métodos para formular composiciones de vacunas son bien conocidos por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. Véanse, por ejemplo, Rola, "Immunizing Agents and Diagnostic Skin Antigens" en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Gennaro (redactor), 19ª edición, páginas 1417-1433 (Mack Publishing Company, 1995).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser suministradas en forma de un kit que comprende un recipiente que comprende componentes de anticuerpos anti-zcytor19, o componentes de anticuerpo biespecíficos. Se pueden proporcionar moléculas terapéuticas en forma de una disolución inyectable para una sola dosis o múltiples dosis, o como un polvo estéril que será reconstituido antes de la inyección. Alternativamente, dicho kit puede incluir un dispensador de polvos secos, un generador de aerosoles líquidos o un nebulizador para la administración de un componente de anticuerpo anti-zcytor19. Dicho kit puede comprender además información escrita sobre las indicaciones y la utilización de la composición farmacéutica. Además, dicha información puede incluir el comunicado de que la composición está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida a anticuerpos exógenos.

También se pueden usar polipéptidos zcytor19, tales como receptores zcytor19 solubles, en sistemas diagnósticos para la detección de los niveles circulantes del ligando. En una realización relacionada, para detectar polipéptidos receptores circulantes se pueden usar anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente con polipéptidos receptores zcytor19. Unos niveles elevados o reducidos de polipéptidos ligandos o receptores pueden ser indicativos de estados patológicos, incluyendo el cáncer. Los polipéptidos receptores solubles pueden contribuir a procesos patológicos y pueden ser marcadores indirectos de una enfermedad subyacente. Por ejemplo, unos niveles elevados del receptor soluble de IL-2 en el suero humano han sido asociados con una gran variedad de estados inflamatorios y neoplásicos, tales como infarto de miocardio, asma, miastenia gravis, artritis reumatoide, leucemia aguda de células T, linfomas de células B, leucemia linfocítica crónica, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer ovárico (Heaney *et al.*, *Blood* 87: 847-857, 1996). Similarmente, puesto que las células de las leucemias de células B expresan zcytor19, un aumento de la expresión de zcytor19 puede incluso servir como un marcador de una enfermedad subyacente, tal como la leucemia.

Se puede preparar un polipéptido de unión a ligandos de un receptor zcytor19, o "receptor soluble", al hacer que se exprese un DNA truncado que codifica el dominio extracelular de unión a citocinas de zcytor19 [restos 21 (Arg) a 226 (Asn) de la ID. SEC. n° 2 o ID. SEC. n° 19], un fragmento de unión a citocinas [por ejemplo, los restos 21 (Arg) a 223 (Pro) de la ID. SEC. n° 2 o ID. SEC. n° 19; ID. SEC. n° 4], la versión soluble de una variante de zcytor19, o la correspondiente región de un receptor no humano. Se prefiere que el dominio extracelular sea preparado en una forma sustancialmente exenta de segmentos polipeptídicos transmembranales e intracelulares. Además, los fragmentos polipeptídicos que se unen al ligando presentes en el dominio ligante de citocinas de zcytor19, anteriormente descritos, pueden también servir como receptores zcytor19 solubles para los usos aquí descritos. Para dirigir la salida de un polipéptido receptor de la célula huésped, el DNA del receptor se enlaza con un segundo segmento de DNA que codifica un péptido secretor, tal como un péptido secretor de t-PA o un péptido secretor de zcytor19. Para facilitar la purificación del polipéptido receptor secretado, se puede fusionar una prolongación C-terminal, tal como una etiqueta de polihistidina, la etiqueta peptídica Glu-Glu, sustancia P, el péptido FlagTM (Hopp *et al.*, *Bio/Technology* 6: 1204-1210, 1988; asequible de Eastman Kodak Co., New Haven, Connecticut, EE.UU.) u otro polipéptido o proteína para el cual se dispone de un anticuerpo u otro agente ligante específico, con el polipéptido receptor.

En un planteamiento alternativo, un dominio extracelular de receptor puede ser expresado como una fusión con regiones constantes de cadena pesada inmunoglobulínica, típicamente un fragmento F_C, que contiene dos dominios de región constante y carece de la región variable. Dichas fusiones son típicamente secretadas como moléculas multímeras en que las porciones F_C están enlazadas entre sí por disulfuros, y dos polipéptidos receptores están dispuestos muy próximos uno de otro. Las fusiones de este tipo pueden ser usadas para purificar por afinidad el ligando afín a partir de una disolución, como una herramienta de ensayo *in vitro*, para bloquear señales *in vitro* al titular específicamente el ligando, y como antagonistas *in vivo* al administrarlas parenteralmente para que se unan al ligando circulante y lo eliminen de la circulación. Para purificar el ligando, se añade una quimera zcytor19-Ig a una muestra que contiene el ligando (por ejemplo, extractos tisulares o medios de cultivo celularmente acondicionados) bajo unas condiciones que facilitan la unión del receptor-ligando (típicamente, una temperatura, un pH y una fuerza iónica casi fisiológicas). El complejo quimera-ligando es luego separado de la mezcla usando proteína A que está inmovilizada en un soporte sólido (por ejemplo, glóbulos de resina insolubles). El ligando es luego eluido usando técnicas químicas convencionales, tal como con un gradiente de sal o de pH. Alternativamente, la propia quimera puede ser unida a un soporte sólido, llevándose a cabo la unión y la elución como antes. Las fracciones recogidas pueden ser fraccionadas de nuevo hasta que se alcance el deseado nivel de pureza.

Además, los receptores zcytor19 solubles pueden ser utilizados como un “sumidero de ligandos”, es decir, como antagonistas, para que se unan al ligando *in vivo* o *in vitro* en aplicaciones terapéuticas u otras aplicaciones en que no se desea la presencia del ligando. Por ejemplo, en cánceres que están expresando una gran cantidad de ligando bioactivo de zcytor19, los receptores zcytor19 solubles pueden ser utilizados como antagonistas directos del ligando *in vivo*, y pueden ayudar a reducir el progreso y los síntomas asociados con la enfermedad. Además, el receptor zcytor19 soluble puede ser utilizado para lentificar el progreso de cánceres que sobreexpresan receptores zcytor19, uniéndose *in vivo* al ligando que, de lo contrario, potenciaría la proliferación de esos cánceres. Se pueden usar aplicaciones *in vitro* similares para un receptor zcytor19 soluble, tal como, por ejemplo, una selección negativa para seleccionar líneas celulares que se desarrollan en ausencia de ligando de zcytor19.

Además, el receptor zcytor19 soluble puede ser utilizado *in vivo* o en aplicaciones diagnósticas para detectar cánceres que expresan ligando de zcytor19 *in vivo* o en muestras tisulares. Por ejemplo, el receptor zcytor19 soluble puede ser conjugado con un radiomarcador o un marcador fluorescente del modo aquí descrito y ser utilizado para detectar la presencia del ligando en una muestra tisular utilizando un ensayo de unión *in vitro* de tipo ligando-receptor o un ensayo de formación de imágenes fluorescentes. Además, se podría administrar *in vivo* un receptor zcytor19 soluble radiomarcado para detectar, por medio de un método formador de imágenes radiactivas conocido en la técnica, tumores sólidos que expresan el ligando. Similarmente, se pueden usar polinucleótidos zcytor19, polipéptidos zcytor19, anticuerpos anti-zcytor19 o fragmentos ligantes de péptidos, para detectar cánceres que expresan el receptor zcytor19. En una realización preferida, se pueden usar polinucleótidos zcytor19, polipéptidos zcytor19, anticuerpos anti-zcytor19 o fragmentos ligantes de péptidos, para detectar leucemias, más preferiblemente leucemias de células B, y muy preferiblemente la leucemia linfoblástica aguda de células pre-B.

La diferenciación es un proceso progresivo y dinámico, que comienza con células madre pluripotenciales y acaba con células terminalmente diferenciadas. Las células madre pluripotenciales que se pueden regenerar sin comprometerse en un linaje expresan un conjunto de marcadores de diferenciación que se pierden cuando se produce el compromiso en un linaje celular. Las células progenitoras expresan un conjunto de marcadores de diferenciación que pueden continuar expresándose o no conforme las células progresan hacia abajo en la ruta del linaje celular, hacia la maduración. Los marcadores de diferenciación que son expresados exclusivamente por células maduras son normalmente propiedades funcionales tales como productos celulares, enzimas para producir productos celulares, y receptores. La fase de diferenciación de una población celular es determinada mediante la identificación de marcadores presentes en la población celular. Se cree que los miocitos, osteoblastos, adipocitos, condrocitos, fibroblastos y células reticulares se originan a partir de una célula madre mesenquimal común (Owen *et al.*, Ciba Fdn. Symp. 136: 42-46, 1988). Los marcadores de las células madre mesenquimales no han sido bien identificados (Owen *et al.*, J. of Cell Sci. 87: 731-738, 1987), por lo que la identificación se realiza normalmente en las fases del progenitor y la célula madura. Los nuevos polipéptidos del presente invento pueden ser útiles en estudios para aislar células madre mesenquimales y miocitos u otras células progenitoras, tanto *in vivo* como *ex vivo*.

Existe una evidencia que sugiere que los factores que estimulan tipos celulares específicos hacia abajo de una ruta, hacia una diferenciación o dediferenciación terminales, afectan a la población celular entera que se origina a partir de un precursor o célula madre común. De esta manera, el presente invento incluye estimular o inhibir la proliferación de células linfoides, células hematopoyéticas y células endoteliales. De este modo, las moléculas del presente invento, tales como receptores zcytor19 solubles, fragmentos ligantes de citocinas, anticuerpos anti-zcytor19, y polinucleótidos sentido y antisentido, pueden ser útiles para inhibir células tumorales y, particularmente, células tumorales linfoides, hematopoyéticas, prostáticas, endoteliales y tiroideas.

Los ensayos para medir diferenciación incluyen, por ejemplo, medir marcadores celulares asociados con la expresión, específica de la fase, de un tejido; actividad enzimática, actividad funcional o cambios morfológicos (Watt, FASEB 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; documentos incorporados aquí por referencia). Alternativamente, el propio polipéptido zcytor19 puede servir como un marcador de superficie celular o secretado adicional, asociado con la expresión, específica de la fase, de un tejido. En sí, la medición directa del polipéptido zcytor19, o la pérdida de su expresión en un tejido conforme se diferencia, puede servir como un marcador para la diferenciación de tejidos. Además, zcytor19 se expresa específicamente en células de leucemia linfoblástica aguda de células pre-B así como en otros diversos cánceres, como aquí se describe. Un experto en la técnica reconocerá que, como tales, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos del presente invento pueden ser usados como marcadores de estos cánceres.

Similarmente, la medición directa del polipéptido zcytor19, o la pérdida de su expresión en un tejido, se puede llevar a cabo en un tejido o unas células conforme experimentan el progreso tumoral. Los aumentos de capacidad invasiva y de motilidad de las células, o la ganancia o pérdida de expresión de zcytor19 en un estado canceroso o precanceroso, en comparación con un tejido normal, pueden servir como un diagnóstico de transformación, invasión y metástasis en el progreso tumoral. En sí, el conocimiento de la fase de progreso o metástasis de un tumor ayudará al médico a elegir la terapia más apropiada, o la agresividad del tratamiento, para un paciente canceroso individual dado. Los métodos para medir la ganancia y pérdida de expresión (de mRNA o de proteína) son bien conocidos en la técnica y aquí descritos y pueden ser aplicados a la expresión de zcytor19. Por ejemplo, la aparición o desaparición de polipéptidos que regulan la motilidad celular puede ser utilizada para facilitar el diagnóstico y el pronóstico de un cáncer de próstata (J. Banyard y B. R. Zetter, Cancer and Metast. Rev. 17: 449-458, 1999). La ganancia o pérdida de expresión de zcytor19, como un efector de la motilidad celular, o como un marcador tumoralmente específico de células B, puede servir como diagnóstico para cánceres linfoides, de células B, endoteliales, hematopoyéticos y

otros. Además, análogamente al antígeno específico de la próstata (PSA; del inglés, prostate specific antigen), como un marcador tisularmente específico y naturalmente expresado, unos niveles aumentados de polipéptidos zcytor19 o anticuerpos anti-zcytor19 en un paciente con respecto a los de un testigo normal pueden ser indicativos de enfermedad en los tejidos normales donde se expresa zcytor19 (véase, por ejemplo, T. M. T. Mulders *et al.*, Eur. J. Surgical Oncol. 16: 37-41, 1990). Además, donde parece que la expresión de zcytor19 está limitada a tejidos humanos normales específicos, una falta de expresión de zcytor19 en esos tejidos o una intensa expresión de zcytor19 en tejidos inespecíficos serviría como diagnóstico de una anomalía en el tipo celular o tisular, o de invasión o metástasis de tejidos cancerosos en un tejido no canceroso, y podría ayudar a un médico a dirigir un ensayo o una investigación ulteriores o a dirigir la terapia. Puesto que zcytor19 se expresa en tumores de esófago, hígado, ovario, recto, estómago y útero, y en melanoma, las sondas diagnósticas son particularmente útiles para diagnosticar e identificar tejidos de estos cánceres.

Además, puesto que zcytor19 es específico de tejidos, las sondas polinucleotídicas, los anticuerpos anti-zcytor19 y la detección de la presencia de polipéptidos zcytor19 en un tejido se pueden utilizar para evaluar si un tejido específico esta presente, por ejemplo, después de una cirugía que ha implicado la escisión de tejidos enfermos o cancerosos en que se expresa zcytor19. Como tales, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos del presente invento pueden ser utilizados como una ayuda para determinar si se ha extirpado todo el tejido después de una cirugía, por ejemplo, después de una cirugía por un cáncer. En tales casos, es especialmente importante eliminar todo tejido potencialmente enfermo para maximizar la recuperación del cáncer y minimizar su reaparición. Las realizaciones preferidas incluyen parejas ligantes del polipéptido zcytor19 y anticuerpos anti-zcytor19 fluorescentes, radiomarcados o colorimétricamente marcados, que pueden ser usados histológicamente o *in situ*. Aquí se describen tejidos específicos en que se expresa zcytor19.

Además, se pueden medir *in vivo* la actividad y el efecto de zcytor19 sobre el progreso tumoral y la metástasis. Se han desarrollado diversos modelos en ratones singénicos para estudiar la influencia de polipéptidos, compuestos u otros tratamientos sobre el progreso tumoral. En estos modelos, células tumorales sometidas a múltiples subcultivos son implantadas en ratones de la misma raza que la del donante del tumor. Las células se desarrollarán hasta unos tumores que tendrán unas características similares en los ratones receptores, y, en algunos de los modelos, también aparecerán metástasis. Los modelos tumorales apropiados para nuestros estudios incluyen el carcinoma pulmonar de Lewis (ATCC nº CRL-1642) y el melanoma B16 (ATCC nº CRL-6323), entre otros. Ambos son líneas tumorales comúnmente usadas, singénicas para el ratón C57BL6, que son fácilmente cultivadas y manipuladas *in vitro*. Los tumores que resultan de la implantación de cualquiera de estas líneas celulares son capaces de metástasis hacia el pulmón en los ratones C57BL6. El modelo del carcinoma pulmonar de Lewis ha sido recientemente usado en ratones para identificar un inhibidor de la angiogénesis (M. S. O'Reilly *et al.*, Cell 79: 315-328, 1994). Se tratan ratones C57BL6/J con un agente experimental mediante la inyección diaria de proteína, agonista o antagonista recombinantes o mediante una sola inyección de adenovirus recombinante. Tres días después de este tratamiento, se implantan de 10^5 a 10^6 células bajo la piel dorsal. Alternativamente, se pueden infectar las propias células con el adenovirus recombinante, tal como uno que exprese zcytor19, antes de la implantación para que se sintetice la proteína en el sitio del tumor o intracelularmente, en lugar de sistémicamente. Los ratones desarrollan normalmente tumores visibles en 5 días. Se deja que los tumores crezcan durante un periodo de hasta 3 semanas, tiempo durante el cual pueden alcanzar un tamaño de 1500-1800 mm³ en el grupo tratado testigo. A lo largo del experimento se determinan cuidadosamente el tamaño tumoral y el peso corporal. En el momento del sacrificio, se extirpa el tumor y se pesa junto con los pulmones y el hígado. Se ha mostrado que el peso pulmonar se correlaciona bien con la carga tumoral metastásica. Como una medida adicional, se cuentan las metástasis de la superficie pulmonar. El tumor, los pulmones y el hígado resecados son preparados para examen histopatológico, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, usando métodos conocidos en la técnica y aquí descritos. De esta manera, se puede valorar la influencia del polipéptido expresado en cuestión, por ejemplo, zcytor19, sobre la capacidad del tumor para abastecerse de la vasculatura y experimentar metástasis. Además, aparte de usar un adenovirus, las células implantadas pueden ser transitoriamente transfectadas con zcytor19. El uso de transfectantes por zcytor19 estables así como el uso de promotores inducibles para activar la expresión de zcytor19 *in vivo* son conocidos en la técnica y se pueden usar en este sistema para valorar la inducción de metástasis por zcytor19. Además, se pueden inyectar directamente zcytor19 purificado o medios acondicionados con zcytor19 en este modelo en ratón y, por lo tanto, se pueden usar en este sistema. Para una referencia general, véanse M. S. O'Reilly *et al.*, Cell 79: 315-328, 1994; y D. Rusciano *et al.*, "Murine Models of Liver Metastasis", Invasion Metastasis 14: 349-361, 1995.

La actividad de zcytor19 y sus derivados (productos de conjugación) sobre el crecimiento y la diseminación de células tumorales derivadas de malignidades hematológicas humanas puede ser también medida *in vivo* en un modelo de xenoinjerto en ratón. Se han desarrollado diversos modelos en ratón, a los que colectivamente se hace referencia como modelos de xenoinjerto, mediante los cuales se implantan células tumorales en ratones inmunodeficientes. Véanse A. R. Cattani y E. Douglas, Leuk. Res. 18: 513-22, 1994; y D. J. Flavell, Hematological Oncology 14: 67-82, 1996. Las características del modelo morbosito variarán con el tipo y la cantidad de células suministradas al ratón. Típicamente, las células tumorales proliferarán rápidamente y podrán hallarse circulando en la sangre y poblando numerosos sistemas orgánicos. Las estrategias terapéuticas apropiadas para ensayar en dicho modelo incluyen toxicidad provocada con anticuerpos, productos de conjugación de ligando-toxina y terapias basadas en células. El último método, al que comúnmente se hace referencia como inmunoterapia adoptiva, implica el tratamiento del animal con componentes del sistema inmune humano (es decir, linfocitos y células NK) y puede incluir la incubación *ex vivo* de células con zcytor19 u otros agentes inmunomoduladores.

El mRNA que corresponde a este nuevo DNA muestra expresión en tejidos linfoides, incluyendo la leucemia linfoblástica aguda de células pre-B, y médula ósea, y se pueden expresar en el bazo, los ganglios linfáticos y leucocitos

de sangre periférica. Estos datos indican un papel del receptor zcytor19 en la leucemia, incluyendo la leucemia de células B, y en la proliferación, diferenciación y/o activación de células inmunes y sugieren un papel en el desarrollo y la regulación de las respuestas inmunes. Los datos también sugieren que la interacción de zcytor19 con su ligando puede estimular la proliferación y el desarrollo de células mieloides y puede, como los receptores citocínicos, IL-2, IL-6, LIF, IL-11 y OSM (Baumann *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 8414-8417, 1993), provocar la síntesis de proteínas de fase aguda en hepatocitos.

Se prefiere purificar los polipéptidos del presente invento hasta una pureza $\geq 80\%$, más preferiblemente hasta una pureza $\geq 90\%$ y aún más preferiblemente hasta una pureza $\geq 95\%$, y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro, es decir, con una pureza superior al 99,9% con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y exento de agentes infecciosos y pirógenos. Preferiblemente un polipéptido purificado está sustancialmente exento de otros polipéptidos, particularmente de otros polipéptidos de origen animal.

Los polipéptidos zcytor19 recombinantes expresados (o polipéptidos zcytor19 quiméricos o de fusión) pueden ser purificados usando fraccionamiento y/o métodos y medios para purificación convencionales. Se pueden usar la precipitación por sulfato amónico y la extracción por ácidos o agentes caotrópicos para el fraccionamiento de las muestras. Las operaciones de purificación ejemplares pueden incluir hidroxipatito, exclusión por tamaños, cromatografía de resolución rápida en estado líquido para proteínas y cromatografía de alta eficacia en estado líquido y fase inversa. Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices especiales, y similares. Se prefieren los derivados de PEI, DEAE, QAE y Q. Los medios cromatográficos ejemplares incluyen los medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como Phenyl-Sepharose FF (Farmacia), Toyopearl Butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, Pennsylvania, EE.UU.), Octyl-Sepharose (Farmacia), y similares; y resinas poliacrílicas tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen glóbulos de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, glóbulos de agarosa, glóbulos de agarosa reticulada, glóbulos de poliestireno, resinas de poliacrilamida reticulada y similares, que son insolubles bajo las condiciones en que se van a usar. Estos soportes pueden ser modificados con grupos reactivos que permiten la fijación de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de hidratos de carbono. Los ejemplos de químicas de copulación incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida, y derivados carboxílicos y amínicos para químicas de copulación con carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son bien conocidos y ampliamente usados en la técnica, y son asequibles de proveedores comerciales. Los métodos para unir polipéptidos receptores a medios de soporte son bien conocidos en la técnica. La selección de un método concreto es una cuestión de diseño rutinario y viene determinada en parte por las propiedades del soporte elegido. Véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Farmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988.

Los polipéptidos del presente invento pueden ser aislados por explotación de sus propiedades bioquímicas, estructurales y biológicas. Por ejemplo, se puede usar la cromatografía de adsorción sobre iones metálicos inmovilizados (IMAC; del inglés, *immobilized metal ion adsorption chromatography*) para purificar proteínas ricas en histidina, incluyendo las que comprenden etiquetas de polihistidina. En resumen, se carga primero un gel con iones metálicos divalentes para formar un quelato (Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3: 1-7, 1985). Las proteínas ricas en histidina quedarán adsorbidas en esta matriz con diferentes afinidades, dependiendo del ion metálico utilizado, y serán eluidas por elución competitiva, reducción del pH o uso de agentes quelantes fuertes. Otros métodos de purificación incluyen la purificación de proteínas glicosiladas, mediante cromatografía de afinidad sobre lectina y cromatografía de intercambio iónico (*Methods in Enzymol.*, volumen 182, "Guide to Protein Purification", redactado por M. Deutscher, Acad. Press, San Diego, 1990, páginas 529-39). En realizaciones adicionales del invento, se puede construir una fusión del polipéptido de interés y una etiqueta de afinidad (por ejemplo, proteína ligante de maltosa o un dominio inmunoglobulínico) para facilitar la purificación.

Además, usando métodos descritos en la técnica, se construyen fusiones polipeptídicas o proteínas zcytor19 híbridas utilizando regiones o dominios del zcytor19 del invento en combinación con aquellos de otras proteínas de la familia de los receptores citocínicos humanos, o proteínas heterólogas (Sambrook *et al.*, *ibídem*; Altschul *et al.*, *ibídem*; Picard, *Curr. Opin. Biology* 5: 511-5, 1994, y sus referencias). Estos métodos permiten la determinación de la importancia biológica de dominios o regiones más grandes en un polipéptido de interés. Dichos híbridos pueden alterar la cinética de reacción y la unión, estrechar o ensanchar la especificidad del sustrato, o alterar las localizaciones tisular y celular de un polipéptido, y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

Se pueden preparar polipéptidos o proteínas de fusión mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, preparando cada componente de la proteína de fusión y conjugándolos químicamente. Alternativamente, se puede generar un polinucleótido que codifique uno o más componentes de la proteína de fusión en el marco de lectura apropiado usando técnicas conocidas y hacer que se exprese mediante los métodos aquí descritos. Por ejemplo, parte de, o todo(s), un(unos) dominio(s) que confiere(n) una función biológica puede(n) ser cambiado(s) en el zcytor19 del presente invento por el(los) dominio(s) funcionalmente equivalente(s) de otro miembro de la familia de las citocinas. Dichos dominios incluyen, pero no se limitan a, la secuencia señal secretora, el dominio extracelular ligante de citocinas, un fragmento ligante de citocinas, dominios de fibronectina de tipo III, el dominio transmembranal y el dominio intracelular de señalización, como aquí se describe. Se puede esperar que dichas proteínas de fusión tengan un perfil funcional biológico que sea igual o similar al de los polipéptidos del presente invento o al de otras proteínas familiares conocidas, dependiendo de la fusión construida. Además, dichas proteínas de fusión pueden presentar otras propiedades, como aquí se describe.

Se pueden usar técnicas estándares de biología molecular y clonación para intercambiar los dominios equivalentes entre el polipéptido zcytor19 y los polipéptidos con que se fusiona. Generalmente, un segmento de DNA que codifica un dominio de interés, por ejemplo, un dominio de zcytor19 aquí descrito, está operativamente enlazado en marco con al menos otro segmento de DNA que codifica un polipéptido adicional [por ejemplo, un dominio o región de otro receptor citocínico, tal como, las cadenas alfa y beta del interferón gamma y las cadenas alfa y beta del receptor del interferón alfa/beta, y los receptores zcytor11 (Patente de EE.UU. n° 5.965.704 comúnmente reconocida), CRF2-4, DIRS1, zcytor7 (Patente de EE.UU. n° 5.945.511 comúnmente reconocida) u otro receptor citocínico de clase II], y está insertado en un vector de expresión apropiado, como aquí se describe. Generalmente, las construcciones de DNA se preparan de modo que los diversos segmentos de DNA que codifican las correspondientes regiones de un polipéptido estén operativamente enlazados en marco para crear una sola construcción que codifique la proteína de fusión completa o una porción funcional de la misma. Por ejemplo, una construcción de DNA codificaría del extremo N al extremo C de una proteína de fusión que comprende un polipéptido señal seguido de un dominio ligante de citocinas, seguido de un dominio transmembranal, seguido de un dominio intracelular de señalización. Dichas proteínas de fusión pueden ser expresadas, aisladas y examinadas en cuanto a su actividad del modo aquí descrito. Además, dichas proteínas de fusión pueden ser usadas para que se expresen y secreten fragmentos del polipéptido zcytor19 que se usarán, por ejemplo, para inocular a un animal y que éste genere anticuerpos anti-zcytor19 como los aquí descritos. Por ejemplo, se puede enlazar operativamente una secuencia señal secretora con un dominio extracelular ligante de citocinas, un fragmento ligante de citocinas, dominios de fibronectina de tipo III individuales, un dominio transmembranal y un dominio intracelular de señalización, como aquí se describe, o una combinación de los mismos (por ejemplo, polipéptidos operativamente enlazados que comprenden un dominio de fibronectina III fijado a un conector, o fragmentos de polipéptido zcytor19 aquí descritos), para que secrete un fragmento de polipéptido zcytor19 que puede ser purificado del modo aquí descrito y servir como un antígeno que se inoculará a un animal para que éste produzca anticuerpos anti-zcytor19, como aquí se describe.

Los polipéptidos zcytor19 o sus fragmentos pueden ser también preparados por medio de síntesis química. Los polipéptidos zcytor19 pueden ser monómeros o multímeros, glicosilados o no glicosilados, PEGilados o no PEGilados, y pueden incluir o no un resto inicial del aminoácido metionina.

Los polipéptidos del presente invento pueden ser también sintetizados mediante síntesis exclusiva en fase sólida, métodos parciales en fase sólida, condensación de fragmentos o síntesis clásica en disolución. Los métodos para sintetizar polipéptidos son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149, 1963; y Kaiser *et al.*, *Anal. Biochem.* 34: 595, 1970. Después de la síntesis completa del péptido deseado sobre un soporte sólido, se trata el péptido-resina con un reactivo que escinde el polipéptido de la resina y separa la mayor parte de los grupos protectores de las cadenas laterales. Dichos métodos están bien establecidos en la técnica.

La actividad de las moléculas del presente invento puede ser medida utilizando diversos ensayos que permiten medir la diferenciación y la proliferación celulares. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica y se describen aquí.

Las proteínas del presente invento son útiles para, por ejemplo, tratar trastornos linfoides, inmunes, inflamatorios, esplénicos, sanguíneos u óseos, y pueden ser medidas *in vitro*, usando células cultivadas, o *in vivo*, administrando moléculas del presente invento al modelo animal apropiado. Por ejemplo, células huésped que expresan un polipéptido receptor zcytor19 soluble pueden ser embebidas en un ambiente de alginato y ser inyectadas (implantadas) en animales receptores. La microencapsulación en alginato-poli-L-lisina, la encapsulación en membranas selectivamente permeables y las cámaras de difusión son medios para atrapar células de mamífero transfectadas o células de mamífero primarias. Estos tipos de "encapsulaciones" no inmunogénicas permiten la difusión de proteínas y otras macromoléculas secretadas o liberadas por las células capturadas, al animal receptor. Resulta muy importante el hecho de que las cápsulas enmascaren y protejan las células embebidas extrañas frente a la respuesta inmune del animal receptor. Dichas encapsulaciones pueden prolongar la vida de las células inyectadas, de unas pocas horas o días (células desnudas) a varias semanas (células embebidas). Las hebras de alginato proporcionan un medio sencillo y rápido para generar células embebidas.

Los materiales necesarios para generar las hebras de alginato son conocidos en la técnica. En un procedimiento ejemplar, se prepara alginato al 3% en H₂O estéril y se esteriliza por filtración. Justo antes de la preparación de las hebras de alginato, la disolución de alginato es filtrada de nuevo. Se mezcla una suspensión de células a aproximadamente el 50% (que contiene de aproximadamente 5×10^5 a aproximadamente 5×10^7 células/ml) con la disolución de alginato al 3%. Se extruye 1 ml de la suspensión de alginato/células en una disolución de CaCl₂ 100 mM esterilizada por filtración, a lo largo de un periodo de tiempo de ~ 15 minutos, formándose una "hebra". La hebra extruida es luego transferida a una disolución 50 mM de CaCl₂ y luego a una disolución 25 mM de CaCl₂. La hebra es luego enjuagada con agua desionizada antes de su revestimiento por incubación en una disolución de poli-L-lisina al 0,01%. Finalmente, la hebra es enjuagada con disolución de Ringer con lactato y es extraída de la disolución en un cuerpo de jeringa (sin aguja). Luego se fija una aguja de calibre grande a la jeringa y se inyecta intraperitonealmente la hebra al receptor en un volumen mínimo de la disolución de Ringer con lactato.

Un planteamiento *in vivo* para examinar las proteínas del presente invento implica sistemas de distribución víricos. Los virus ejemplares para este fin incluyen adenovirus, herpesvirus, retrovirus, virus vaccinia y virus adenoasociados (AAV; del inglés, adeno-associated virus). El adenovirus, un virus de DNA de doble cadena, es actualmente el vector de transferencia génica mejor estudiado para la distribución de ácido nucleico heterólogo (para una revisión, véanse T.

C. Becker *et al.*, *Meth. Cell Biol.* 43: 161-89, 1994; y J. T. Douglas y D. T. Curiel, *Science & Medicine* 4: 44-53, 1997). El sistema adenovírico ofrece varias ventajas: (i) el adenovirus puede alojar insertos de DNA relativamente grandes; (ii) puede ser cultivado hasta títulos elevados; (iii) infecta una gran variedad de tipos celulares de mamífero; y (iv) se puede utilizar con un gran número de diferentes promotores, incluyendo promotores ubicuos, tisularmente específicos y regulables. Además, puesto que los adenovirus son estables en la corriente sanguínea, pueden ser administrados mediante inyección intravenosa.

Utilizando vectores adenovíricos en que se han suprimido porciones del genoma adenovírico, se incorporan insertos al DNA viral por ligación directa o por recombinación homóloga con un plásmido introducido por cotransfección. En un sistema ejemplar, se ha suprimido el gen esencial E1 del vector vírico y el virus no se replicará a menos que la célula huésped proporcione el gen E1 (la línea celular 293 humana es ejemplar). Cuando se administra intravenosamente a animales intactos, el adenovirus se dirige esencialmente al hígado. Si el sistema de distribución adenovírico tiene una delección del gen E1, el virus no se puede replicar en las células huésped. Sin embargo, el tejido del huésped (por ejemplo, el hígado) expresará y procesará (y secretará si está presente una secuencia señal secretora) la proteína heteróloga. Las proteínas secretadas entrarán en la circulación por el muy vascularizado hígado, y se podrán determinar efectos sobre el animal infectado.

Además, los vectores adenovíricos que contienen diversas delecciones de genes víricos pueden ser utilizados en un intento para reducir o eliminar las respuestas inmunes hacia el vector. Dichos adenovirus tienen E1 suprimido y contienen además delecciones de E2A o E4 (M. Lusky *et al.*, *J. Virol.* 72: 2022-2032, 1998; S. E. Raper *et al.*, *Human Gene Therapy* 9: 671-679, 1998). Además, se ha comunicado que la delección de E2b reduce las respuestas inmunes (A. Amalfitano *et al.*, *J. Virol* 72: 926-933, 1998). Además, al suprimir el genoma adenovírico completo, se pueden alojar insertos muy grandes de DNA heterólogo. La generación de los llamados adenovirus "sin tripa", en los que se han suprimido todos los genes víricos, es particularmente ventajosa para la inserción de grandes insertos de DNA heterólogo. Para una revisión, véase P. Yeh y M. Perricaudet, *FASEB J.* 11: 615-623, 1997.

El sistema adenovírico puede ser también utilizado para la producción de proteínas *in vitro*. Al cultivar células que no son 293, infectadas con adenovirus, en unas condiciones bajo las cuales no se dividen rápidamente las células, las células pueden producir proteínas durante periodos prolongados de tiempo. Por ejemplo, se cultivan células BHK hasta confluencia en factorías de células y luego se exponen al vector adenovírico que codifica la proteína secretada de interés. Luego se cultivan las células bajo condiciones exentas de suero, lo que permite que las células infectadas sobrevivan durante varias semanas sin una significativa división celular. Alternativamente, las células 293 infectadas con el vector adenovírico pueden ser cultivadas como células adherentes o en cultivo en suspensión con una densidad celular relativamente elevada, para producir cantidades significativas de proteína (véase Garnier *et al.*, *Cytotechnol.* 15: 145-55, 1994). Con cualquier protocolo, se puede aislar repetidamente una proteína heteróloga expresada y secretada del sobrenadante del cultivo celular, un producto de lisis o fracciones de membrana, dependiendo de la disposición de la proteína expresada en la célula. Con el protocolo para producción de células 293 infectadas, también se pueden obtener eficazmente proteínas no secretadas.

A la vista de la distribución tisular observada para zcytor19, los agonistas (incluyendo el ligando/sustrato/cofactor/etc. naturales) y antagonistas tienen un enorme potencial tanto en aplicaciones *in vitro* como *in vivo*. Los compuestos identificados como agonistas de zcytor19 son útiles para estimular el crecimiento de células inmunes y hematopoyéticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los receptores zcytor19 solubles y los compuestos agonistas son útiles como componentes de medios definidos para cultivo celular y pueden ser usados solos o en combinación con otras citocinas y hormonas para reemplazar el suero que se utiliza comúnmente en el cultivo celular. De esta manera, los agonistas son útiles para promover específicamente el crecimiento y/o desarrollo de células T, células B y otras células de los linajes linfoides y mieloides en cultivo. Además, se puede utilizar el receptor zcytor19 soluble, un agonista o un antagonista *in vitro* en un ensayo para medir la estimulación de la formación de colonias a partir de cultivos aislados primarios de médula ósea. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica.

Los antagonistas son también útiles como reactivos de investigación para caracterizar sitios de interacción ligando-receptor. Los inhibidores de la actividad de zcytor19 (antagonistas de zcytor19) incluyen anticuerpos anti-zcytor19 y receptores zcytor19 solubles, así como otros agentes peptídicos y no peptídicos (incluyendo ribozimas).

También se puede utilizar zcytor19 para identificar moduladores (por ejemplo, antagonistas) de su actividad. Se añaden compuestos de prueba a los ensayos aquí descritos para identificar compuestos que inhiben la actividad de zcytor19. Además de los ensayos aquí descritos, se pueden examinar muestras en cuanto a la inhibición de la actividad de zcytor19 en una diversidad de ensayos diseñados para medir la unión de zcytor19, la oligomerización de zcytor19 o la estimulación/inhibición de respuestas celulares dependientes de zcytor19. Por ejemplo, líneas celulares que expresan zcytor19 pueden ser transfectadas con una construcción génica informadora que es sensible a una ruta celular estimulada por zcytor19. Las construcciones génicas informadoras de este tipo son conocidas en la técnica y comprenderán generalmente un elemento de respuesta al DNA de zcytor19 operativamente enlazado con un gen que codifica una proteína analíticamente detectable, tal como luciferasa. Los elementos de respuesta a DNA pueden incluir, pero no se limitan a, elementos de respuesta a AMP cíclico (CRE; del inglés, cyclic AMP response elements), elementos de respuesta a hormonas (HRE; del inglés, hormone response elements), elementos de respuesta a insulina (IRE; del inglés, insulin response elements) (Nasrin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5273-7, 1990) y elementos de respuesta a suero (SRE; del inglés, serum response elements) (Shaw *et al.*, *Cell* 56: 563-72, 1989). Los elementos de respuesta a AMP cíclico han sido revisados por Roestler *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263 (19): 9063-6, 1988, y Habener,

Molec. Endocrinol. 4 (8): 1087-94, 1990. Los elementos de respuesta a hormonas han sido revisados por Beato, *Cell* 56: 335-44, 1989. Se examinan compuestos, disoluciones, mezclas o extractos o medios acondicionados candidatos de diversos tipos celulares en cuanto a la capacidad para potenciar la actividad del receptor zcytor19, según se evidencia por un aumento de la estimulación de la expresión de genes informadores por zcytor19. En los ensayos de este tipo se detectarán compuestos que estimulan directamente la actividad de transducción de señales de zcytor19 al unirse al receptor o, de lo contrario, estimular parte de la cascada de señales. Se proporciona un método para, de por sí, identificar agonistas del polipéptido zcytor19, que comprende proporcionar células sensibles a un polipéptido zcytor19, cultivar una primera porción de las células en ausencia de un compuesto de ensayo, cultivar una segunda porción de las células en presencia de un compuesto de ensayo, y detectar un aumento de una respuesta celular de la segunda porción de las células en comparación con la de la primera porción de las células. Además, se puede usar una tercera célula, que contiene la construcción génica informadora anteriormente descrita pero que no expresa el receptor zcytor19, como una célula testigo para valorar la estimulación inespecífica, o no mediada por zcytor19, del informador. Por lo tanto, los agonistas, incluyendo el ligando natural, son útiles para estimular o aumentar la función del polipéptido zcytor19.

También se puede usar un polipéptido que se una al ligando de zcytor19, tal como el dominio extracelular o el dominio ligante de citocinas aquí descritos, para la purificación del ligando. El polipéptido es inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como glóbulos de agarosa, agarosa reticulada, vidrio, resinas celulósicas, resinas basadas en sílice, poliestireno, poliácridamida reticulada, o materiales similares que son estables bajo las condiciones de uso. Los métodos para enlazar polipéptidos a soportes sólidos son conocidos en la técnica e incluyen la química de aminas, activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo y activación con hidrazida. El medio resultante será generalmente configurado en forma de columna, y los fluidos que contienen el ligando serán hechos pasar a través de la columna una o más veces para permitir que el ligando se una con el polipéptido receptor. Luego se eluye el ligando usando cambios en la concentración de sales, agentes caotrópicos (guanidina-HCl) o el pH para romper la unión ligando-receptor.

Se puede emplear ventajosamente un sistema de ensayo en que se usa un receptor que se une a ligandos (o un anticuerpo, o un miembro de una pareja de complemento/anticomplemento) o un fragmento ligante del mismo, y un instrumento biosensor comercialmente asequible (por ejemplo, BIAcore™, Pharmacia Biosensor, Piscataway, New Jersey, EE.UU.; o la tecnología SELDI™, Ciphergen, Inc., Palo Alto, California, EE.UU.). Dicho receptor, anticuerpo, miembro de una pareja de complemento/anticomplemento o fragmento es inmovilizado sobre la superficie de un chip receptor. El uso de este instrumento es descrito por Karlsson, *J. Immunol. Methods* 145: 229-240, 1991, y por Cunningham y Wells, *J. Mol. Biol.* 234: 554-63, 1993. Un receptor, anticuerpo, miembro o fragmento es fijado covalentemente, usando una química de aminas o sulfhidrilos, a fibras de dextrano que están fijadas a una película de oro dentro de la célula de flujo. Se hace pasar una muestra de ensayo a través de la célula. Si está presente un ligando, un epítipo o el miembro opuesto de la pareja de complemento/anticomplemento en la muestra, se unirá al receptor, anticuerpo o miembro inmovilizado, respectivamente, lo que causará un cambio en el índice de refracción del medio, cambio que es detectado como un cambio en la resonancia de plasmones superficiales de la película de oro. Este sistema permite la determinación de las velocidades de asociación y disociación, a partir de las cuales se puede calcular la afinidad de unión, y la evaluación de la estequiometría de la unión.

Los polipéptidos receptores que se unen a ligandos pueden ser también usados en otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica. Dichos sistemas incluyen el análisis de Scatchard para determinación de la afinidad de unión (véase Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949) y ensayos calorimétricos (Cunningham *et al.*, *Science* 253: 545-48, 1991; Cunningham *et al.*, *Science* 245: 821-25, 1991).

Los polipéptidos zcytor19 pueden ser también usados para preparar anticuerpos que se unan a polipéptidos, péptidos o epítopos de zcytor19. El polipéptido zcytor19 o un fragmento del mismo sirve como un antígeno (inmunógeno) para inocular a un animal y provocar una respuesta inmune. Quien tiene experiencia en la técnica reconocerá que los polipéptidos antigénicos que portan epítopos contienen una secuencia de al menos 6, preferiblemente al menos 9, y más preferiblemente de al menos 15 a aproximadamente 30, restos de aminoácido contiguos de un polipéptido zcytor19 (por ejemplo, la ID. SEC. n° 2, ID. SEC. n° 19 o ID. SEC. n° 21). Se incluyen los polipéptidos que comprenden una porción más grande de un polipéptido zcytor19; es decir, de 30 a 100 restos, hasta la longitud completa de la secuencia de aminoácidos. Los antígenos o los epítopos inmunogénicos pueden incluir también etiquetas, adyuvantes y portadores fijados, como aquí se describe. Los antígenos adecuados incluyen el polipéptido zcytor19 codificado por la ID. SEC. n° 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg), o un fragmento del mismo de 9 a 471 aminoácidos contiguos. Los antígenos adecuados también incluyen el polipéptido zcytor19 codificado por la ID. SEC. n° 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg), o un fragmento del mismo de 9 a 500 aminoácidos contiguos; y el polipéptido zcytor19 soluble y truncado codificado por la ID. SEC. n° 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser), o un fragmento del mismo de 9 a 191 aminoácidos contiguos. Los péptidos preferidos para uso como antígenos son el dominio extracelular ligante de citocinas, un fragmento ligante de citocinas, dominios de fibronectina de tipo III, el dominio intracelular de señalización, y otros dominios y motivos aquí descritos, o una combinación de los mismos; y péptidos zcytor19 hidrófilos tales como los previstos por un experto en la técnica a partir de un gráfico de hidrofobia, determinados, por ejemplo, a partir de un perfil Hopp/Woods de hidrofilia basado en una ventana deslizante de seis restos, ignorándose los restos G, S y T enterrados y los restos H, Y y W expuestos. Los péptidos hidrófilos de zcytor19 incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: (1) los restos 295 a 300 de la ID. SEC. n° 2; (2) los restos 451 a 456 de la ID. SEC. n° 2; (3) los restos 301 a 306 de la ID. SEC. n° 2; (4) los restos 294 a 299 de la ID. SEC. n° 2; y (5) los restos 65 a 70 de la ID. SEC. n° 2. Además, los epítopos antigénicos de zcytor19 pronosticados

mediante un gráfico de Jameson-Wolf utilizando, por ejemplo, el programa Protean de DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, EE.UU.), son antígenos adecuados. Además, los motivos conservados y las regiones variables entre los motivos conservados de zcytor19 son antígenos adecuados. Los anticuerpos generados por esta respuesta inmune pueden ser aislados y purificados del modo aquí descrito. Los métodos para preparar y aislar anticuerpos policlonales y monoclonales son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, “Current Protocols in Immunology”, Cooligan *et al.* (redactores), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, segunda edición, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU., 1989; y J. G. R. Hurrell (redactor), “Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications”, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, EE.UU., 1982.

Como resultará evidente a quien tiene una experiencia normal en la técnica, se pueden generar anticuerpos policlonales tras inocular un polipéptido zcytor19 o un fragmento del mismo a una diversidad de animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, gallinas, conejos, ratones y ratas. Se puede aumentar la inmunogenicidad de un polipéptido zcytor19 mediante el uso de un adyuvante, tal como alúmina (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para la inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales como las fusiones de zcytor19 o de una porción del mismo con un polipéptido inmunoglobulínico o con la proteína ligante de maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una porción de la misma. Si la porción polipeptídica es “de tipo hapteno”, dicha porción puede ser ventajosamente unida o enlazada a un portador macromolecular [tal como hemocianina de lapa *Fissurella* (KLH; del inglés, *keyhole limpet hemocyanin*), albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, *bovine serum albumin*) o toxoide tetánico] para la inmunización.

Como aquí se utiliza, el término “anticuerpos” incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales, y fragmentos ligantes de antígeno tales como los fragmentos proteolíticos F(ab')₂ y Fab. También se incluyen anticuerpos intactos o fragmentos genéticamente contruidos, tales como anticuerpos quiméricos, fragmentos Fv, anticuerpos de una sola cadena y similares, así como péptidos y polipéptidos ligantes de antígeno sintéticos. Los anticuerpos no humanos pueden ser humanizados al injertar CDRs no humanas en regiones estructurales y constantes humanas o al incorporar los dominios variables no humanos completos (opcionalmente “encubriéndolos” con una superficie de tipo humano por sustitución de restos expuestos, siendo el resultado un anticuerpo “enchapado”). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden conservar restos no humanos dentro de los dominios estructurales de las regiones variables humanas para potenciar unas características ligantes apropiadas. Mediante la humanización de anticuerpos, se puede aumentar la semivida biológica y se reduce la posibilidad de reacciones inmunes negativas tras la administración a seres humanos. Además, se pueden producir anticuerpos humanos en animales transgénicos no humanos que han sido contruidos para que contengan genes inmunoglobulínicos humanos, tal como se describe en la Publicación WIPO WO 98/24893. Se prefiere que los genes inmunoglobulínicos endógenos de estos animales sean inactivados o eliminados, tal como por recombinación homóloga.

Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos aquí útiles incluyen la exposición *in vitro* de linfocitos a una proteína o péptido zcytor19 y la selección de bancos de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, por medio del uso de una proteína o péptido zcytor19 inmovilizado o marcado). Los genes que codifican polipéptidos que tienen posibles dominios ligantes del polipéptido zcytor19 pueden ser obtenidos mediante la exploración de bancos peptídicos aleatorios presentados en fagos (presentación en fagos) o en bacterias, tal como en *E. coli*. Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos pueden ser obtenidas de diversas maneras, tal como por medio de mutagénesis aleatoria y síntesis polinucleotídica aleatoria. Estos bancos de presentación de péptidos aleatorios pueden ser utilizados para explorar los péptidos que interaccionan con una diana conocida que puede ser una proteína o un polipéptido, tal como un ligando o un receptor, una macromolécula biológica o sintética, o sustancias orgánicas o inorgánicas. Las técnicas para crear y explorar dichos bancos de presentación de péptidos aleatorios son conocidas en la técnica (Ladner *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.223.409; Ladner *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.946.778; Ladner *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.403.484; y Ladner *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.571.698), y los bancos de presentación de péptidos aleatorios y los kits para explorar dichos bancos son comercialmente asequibles de, por ejemplo, Clontech (Palo Alto, California, EE.UU.), Invitrogen Inc. (San Diego, California, EE.UU.), New England Biolabs Inc. (Beverly, Massachusetts, EE.UU.) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, New Jersey, EE.UU.). Los bancos de presentación de péptidos aleatorios pueden ser explorados usando las secuencias de zcytor19 aquí descritas, para identificar proteínas que se unen a zcytor19. Estos “péptidos ligantes” que interaccionan con polipéptidos zcytor19 pueden ser usados para etiquetar células, tales como, por ejemplo, aquéllas en que se expresa específicamente zcytor19, y para aislar polipéptidos homólogos mediante purificación por afinidad, y pueden ser directa o indirectamente conjugados con fármacos, toxinas, radionucleidos y similares. Estos péptidos ligantes pueden ser también usados en métodos analíticos tales como la exploración de bancos de expresión y la neutralización de actividades. Los péptidos ligantes pueden ser también usados en ensayos diagnósticos para determinar los niveles circulantes de polipéptidos zcytor19 y para detectar o cuantificar polipéptidos zcytor19 solubles como marcadores de una patología o enfermedad subyacente. Estos péptidos ligantes pueden actuar también como “antagonistas” de zcytor19 para bloquear la unión a zcytor19 y la transducción de señales *in vitro* e *in vivo*. Estos péptidos ligantes anti-zcytor19 serían útiles para inhibir la acción de un ligando que se une con zcytor19.

Se considera que los anticuerpos son específicamente ligantes si: 1) presentan un nivel umbral de actividad ligante y 2) no reaccionan cruzadamente de forma significativa con moléculas polipeptídicas relacionadas. Se determina un nivel umbral de unión si los presentes anticuerpos anti-zcytor19 se unen con un polipéptido, péptido o epítipo de zcytor19 con una afinidad al menos 10 veces mayor que la afinidad ligante con respecto a un polipéptido testigo (no

zcytor19). Se prefiere que los anticuerpos presenten una afinidad ligante (K_a) de 10^6 M^{-1} o superior, preferiblemente de 10^7 M^{-1} o superior, más preferiblemente de 10^8 M^{-1} o superior, y muy preferiblemente de 10^9 M^{-1} o superior. La afinidad ligante de un anticuerpo puede ser fácilmente determinada por quien tiene una experiencia normal en la técnica mediante, por ejemplo, un análisis de Scatchard (G. Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949).

Se muestra que los anticuerpos anti-zcytor19 no reaccionan cruzadamente de forma significativa con moléculas polipeptídicas relacionadas si, por ejemplo, detectan el polipéptido zcytor19 pero no polipéptidos relacionados conocidos al usar un análisis estándar por transferencia Western (Ausubel *et al.*, *ididem*). Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos son los descritos en la técnica previa, tales como ortólogos conocidos, y parálogos, y miembros conocidos similares de una familia de proteínas (por ejemplo, receptores citocínicos de clase II. tales como, por ejemplo, las cadenas alfa y beta del interferón gamma y las cadenas alfa y beta del receptor del interferón alfa/beta, y los receptores zcytor11 (Patente de EE.UU. n° 5.965.704 comúnmente reconocida), CRF2-4, DIRS1 y zcytor7 (Patente de EE.UU. n° 5.945.511 comúnmente reconocida). La exploración también se puede realizar usando zcytor19 no humano y polipéptidos zcytor19 mutantes. Además, usando métodos rutinarios, los anticuerpos pueden ser “explorados frente a” polipéptidos relacionados conocidos para aislar una población que se une específicamente a los polipéptidos zcytor19. Por ejemplo, los anticuerpos generados contra zcytor19 son adsorbidos por polipéptidos relacionados adheridos a una matriz insoluble; los anticuerpos específicos para zcytor19 fluirán a través de la matriz bajo las condiciones de tamponamiento apropiadas. La exploración permite el aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales que no presentan reactividad cruzada con conocidos polipéptidos estrechamente relacionados [“Antibodies: A Laboratory Manual”, Harlow y Lane (redactores), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; “Current Protocols in Immunology”, Cooligan *et al.* (redactores), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995]. La exploración y el aislamiento de anticuerpos específicos son bien conocidos en la técnica. Véanse “Fundamental Immunology”, Paul (redactor), Raven Press, 1993; Getzoff *et al.*, *Adv. in Immunol.* 43: 1-98, 1988; “Monoclonal Antibodies: Principles and Practice”, J. W. Goding (redactor), Academic Press Ltd., 1996; y Benjamin *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 2: 67-101, 1984. Mediante diversos métodos de la técnica, descritos más adelante, se pueden detectar los anticuerpos anti-zcytor19 que se unen específicamente.

Para detectar anticuerpos que se unen específicamente a proteínas o péptidos zcytor19, se puede usar una diversidad de ensayos conocidos por los expertos en la técnica. En “Antibodies: A Laboratory Manual”, Harlow y Lane (redactores), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, se describen ensayos ejemplares con detalle. Los ejemplos representativos de dichos ensayos incluyen: inmunoelectroforesis concurrente, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA; del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*), ensayo de transferencia en forma de punto o de transferencia Western, ensayo de inhibición o competición, y ensayo de tipo sándwich. Además, los anticuerpos pueden ser explorados en cuanto a la unión con una proteína o polipéptido zcytor19 de tipo silvestre frente a la unión con una proteína o polipéptido zcytor19 mutante.

Los anticuerpos contra zcytor19 pueden ser usados para etiquetar células que expresan zcytor19; para aislar zcytor19 mediante purificación por afinidad; en ensayos diagnósticos para determinar los niveles circulantes de polipéptidos zcytor19; para detectar o cuantificar zcytor19 soluble como marcador de una patología o enfermedad subyacente; para detectar o cuantificar el receptor zcytor19 en una muestra histológica, biopsia o muestra tisular, como marcador de una patología o enfermedad subyacente; para estimular la citotoxicidad o ADCC sobre células cancerosas que portan zcytor19; en métodos analíticos en que se emplea FACS; para explorar bancos de expresión; para generar anticuerpos antiidiotípicos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear la actividad de zcytor19 *in vitro* e *in vivo*. Las etiquetas o marcadores directos adecuados incluyen radionucleidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; las etiquetas o marcadores indirectos se pueden caracterizar por el uso de biotina-avidina o de otras parejas de complemento/anticomplemento como productos intermedios. Los anticuerpos presentes pueden ser también directa o indirectamente conjugados con fármacos, toxinas, radionucleidos y similares, y se pueden utilizar estos productos de conjugación para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas *in vivo*. Además, se pueden usar *in vitro* anticuerpos contra zcytor19 o fragmentos del mismo para detectar zcytor19 desnaturalizado o fragmentos del mismo en ensayos tales como, por ejemplo, transferencias Western y otros ensayos conocidos en la técnica.

Los anticuerpos contra zcytor19 son útiles para etiquetar células que expresan el receptor y examinar los niveles de expresión de zcytor19, para purificación por afinidad, en ensayos diagnósticos para determinar los niveles circulantes de polipéptidos receptores solubles, y en métodos analíticos en que se emplea la clasificación de células activadas por fluorescencia. Se pueden usar anticuerpos divalentes como agonistas para remedar el efecto de un ligando de zcytor19.

Los anticuerpos presentes pueden ser también directa o indirectamente conjugados con fármacos, toxinas, radionucleidos y similares, y se pueden utilizar estos productos de conjugación para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos o polipéptidos ligantes que reconocen zcytor19 del presente invento pueden ser utilizados para identificar o tratar tejidos u órganos que expresan una correspondiente molécula anticomplementaria (es decir, un receptor zcytor19). Más específicamente, los anticuerpos anti-zcytor19, o fragmentos o porciones bioactivas de los mismos, pueden ser copulados con moléculas detectables o citotóxicas y suministrados a un mamífero que tiene células, tejidos u órganos que expresan la molécula de zcytor19. Un uso preferido de dichos anticuerpos conjugados es dirigir el fármaco a cánceres que expresan el receptor zcytor19. Por ejemplo, se pueden usar dichos anticuerpos para dirección a cánceres linfoides, de células B y de leucemias linfoblásticas agudas de células pre-B, tumores de esófago, hígado, ovario, recto, estómago y útero, y melanoma.

Las moléculas detectables adecuadas pueden ser directa o indirectamente fijadas a polipéptidos que se unen a zcytor19 ("polipéptidos ligantes", que incluyen los péptidos ligantes anteriormente descritos), anticuerpos, o fragmentos o porciones bioactivas de los mismos. Las moléculas detectables adecuadas incluyen radionucleidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas pueden ser directa o indirectamente fijadas al polipéptido o el anticuerpo, e incluyen toxinas bacterianas y vegetales (por ejemplo, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y similares), así como radionucleidos terapéuticos tales como yodo-131, renio-188 e itrio-90 (directamente fijados al polipéptido o el anticuerpo, o indirectamente fijados por medio de, por ejemplo, un grupo quelante). También se pueden conjugar polipéptidos ligantes o anticuerpos con fármacos citotóxicos, tal como con adriamicina. Para la fijación indirecta de una molécula detectable o citotóxica, se puede conjugar la molécula detectable o citotóxica con un miembro de una pareja complementaria/anticomplementaria cuyo otro miembro está unido a la porción de polipéptido ligante o de anticuerpo. Para estos fines, la biotina/estreptavidina es una pareja complementaria/anticomplementaria ejemplar.

En otra realización, se pueden usar proteínas de fusión de polipéptido ligante-toxina o proteínas de fusión de anticuerpo-toxina, para la inhibición o ablación de células o tejidos específicos (por ejemplo, para tratar células o tejidos cancerosos tales como, por ejemplo, los tejidos y tumores específicos en que se expresa zcytor19). Alternativamente, si el polipéptido ligante tiene múltiples dominios funcionales (es decir, un dominio de activación o un dominio de unión a ligandos, más un dominio de dirección), una proteína de fusión que sólo incluya el dominio de dirección puede ser adecuada para dirigir una molécula detectable, una molécula citotóxica o una molécula complementaria a un tipo celular o tisular de interés. En los casos en que la proteína de fusión que sólo incluye un único dominio incluya una molécula complementaria, la molécula anticomplementaria podrá ser conjugada con una molécula detectable o citotóxica. De este modo, dichas proteínas de fusión de dominio-molécula complementaria representan un vehículo de dirección genérico para una distribución celular/tisularmente específica de productos de conjugación genéricos de moléculas anticomplementarias-detectables/citotóxicas.

Similarmente, en otra realización, se pueden usar proteínas de fusión de polipéptido ligante de zcytor19-citocina o de anticuerpo-citocina para potenciar la muerte *in vivo* de tejidos diana (por ejemplo, de cánceres sanguíneos, linfoides, de colon y de médula ósea, u otros cánceres aquí descritos en que se expresa zcytor19) si el polipéptido ligante-citocina o el anticuerpo anti-zcytor19 se dirige a la célula hiperproliferativa (véase, en general, Hornick *et al.*, Blood 89: 4437-47, 1997). Ellos describieron proteínas de fusión que permitían la dirección de una citocina a un sitio de acción deseado, proporcionando por ello una elevada concentración local de citocina. Los anticuerpos anti-zcytor19 adecuados se dirigen a una célula o tejido indeseable (es decir, un tumor o una leucemia), y la citocina fusionada media en una lisis mejorada de células diana por células efectoras. Para este fin, las citocinas adecuadas incluyen, por ejemplo, la interleucina 2 y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

Alternativamente, las proteínas de fusión de anticuerpo o de polipéptido ligante de zcytor19 aquí descritas pueden ser usadas para potenciar la muerte *in vivo* de tejidos diana al estimular directamente una ruta apoptótica modulada por zcytor19, para dar lugar a la muerte celular de células hiperproliferativas que expresan zcytor19.

Los productos de conjugación de anticuerpo o polipéptido ligante bioactivo aquí descritos pueden ser suministrados oral, intravenosa, intraarterial o intraductalmente, o pueden ser introducidos localmente en el previsto sitio de acción.

Además, se pueden usar anticuerpos anti-zcytor19 y fragmentos ligantes para etiquetar y clasificar células que expresan específicamente zcytor19, tales como células de médula ósea y tiroides y otras células aquí descritas. Dichos métodos para etiquetar y clasificar células son bien conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, "Molecular Biology of the Cell", 3ª edición, B. Albert *et al.* (Garland Publishing, Londres y New York, 1994)]. Quien tiene experiencia en la técnica reconocerá la importancia de separar tipos de tejidos celulares para estudiar las células, y el uso de anticuerpos para separar tipos de tejidos celulares específicos. Básicamente, los anticuerpos que se unen a la superficie de un tipo celular son copulados con diversas matrices, tales como colágeno, glóbulos de polisacáridos o plástico, para formar una superficie de afinidad a la cual sólo se adherirán las células reconocidas por los anticuerpos. Las células unidas son luego recuperadas mediante técnicas convencionales. Otros métodos implican separar las células por citometría de flujo o usar un sistema clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS; del inglés, fluorescence-activated cell sorter). En esta técnica, se marcan células con anticuerpos que están copulados con un colorante fluorescente. Las células marcadas son luego separadas de las células no marcadas en una máquina FACS. En la clasificación por FACS, células individuales que se desplazan en una sola fila atraviesan un haz de láser, y se mide la fluorescencia de cada célula. Ligeramente más abajo, mediante una boquilla vibratoria se forman minúsculas gotitas, la mayoría de las cuales contienen una célula o no contiene célula alguna. Las gotitas que contienen una sola célula reciben automáticamente una carga positiva o negativa en el momento de su formación, dependiendo de si la célula que contienen es fluorescente, y son luego desviadas mediante un intenso campo eléctrico hacia un recipiente apropiado. Dichas máquinas pueden seleccionar 1 célula entre 1000 y clasificar aproximadamente 5000 células por segundo. Esto produce una población uniforme de células para cultivo celular.

Quien tiene experiencia en la técnica reconocerá que los anticuerpos contra los polipéptidos zcytor19 del presente invento son útiles porque no todos los tipos celulares expresan el receptor zcytor19 y porque es importante que los biólogos puedan separar tipos celulares específicos para un estudio ulterior y/o para reimplantación terapéutica en el organismo. Esto es particularmente relevante en las células en que se expresa zcytor19, tales como las células inmunes.

- Las citocinas con haces de cuatro hélices que se unen a receptores citocínicos así como otras proteínas producidas por linfocitos activados desempeñan un importante papel biológico en la diferenciación, la activación y el reclutamiento celulares y en la homeostasis de células por todo el organismo. Su utilidad terapéutica incluye el tratamiento de enfermedades que requieren regulación inmune, incluyendo enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia gravis, lupus sistémico eritematoso y diabetes. Los antagonistas o agonistas del receptor zcytor19, incluyendo los receptores solubles zcytor19, los anticuerpos anti-receptores y el ligando natural, pueden ser importantes en la regulación de la inflamación y, por lo tanto, serían útiles en el tratamiento de la artritis reumatoide, el asma, la colitis ulcerosa, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de Crohn y la sepsis. Un papel de los antagonistas o agonistas de zcytor19, incluyendo los receptores solubles, los anticuerpos anti-receptores y el ligando natural, puede ser en la mediación de la tumorigénesis, y, por lo tanto, serían útiles en el tratamiento del cáncer. Los antagonistas o agonistas de zcytor19, incluyendo los receptores solubles, los anticuerpos anti-receptores y el ligando natural, pueden ser posibles agentes terapéuticos para suprimir el sistema inmune, lo que sería importante para reducir el rechazo de los injertos o en la prevención de la enfermedad del injerto contra el huésped.
- Alternativamente, los antagonistas o agonistas de zcytor19, incluyendo los receptores solubles, los anticuerpos anti-receptor zcytor19 y el ligando natural, pueden activar el sistema inmune, lo que sería importante en el refuerzo de la inmunidad frente a las enfermedades infecciosas, el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos, tales como pacientes HIV+, o la mejora de vacunas. En particular, los antagonistas o agonistas de zcytor19, incluyendo los receptores solubles, los anticuerpos anti-receptores y el ligando natural, pueden modular, estimular o multiplicar las células NK o sus progenitores y representarían un valor terapéutico en el tratamiento de las infecciones víricas y como factores antineoplásicos. Se piensa que las células NK desempeñan un papel principal en la eliminación de las células tumorales metastásicas, y tanto los pacientes con metástasis como aquellos con tumores sólidos presentan niveles disminuidos de actividad de células NK (Whiteside *et al.*, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 230: 221-244, 1998).
- Los polinucleótidos que codifican polipéptidos zcytor19 son útiles en aplicaciones de terapia génica en que se desea aumentar o inhibir la actividad de zcytor19. Si un mamífero tiene un gen zcytor19 mutado o ausente, se puede introducir el gen zcytor19 en las células del mamífero. En una realización, un gen que codifica un polipéptido zcytor19 es introducido *in vivo* en un vector vírico. Dichos vectores incluyen un virus de DNA atenuado o defectuoso, tal como, pero sin limitarse a, el virus herpes simplex (HSV; del inglés, herpes simplex virus), el papilomavirus, el virus de Epstein Barr (EBV; del inglés, Epstein Barr virus), el adenovirus, el virus adenoasociado (AAV; del inglés, adeno-associated virus), y similares. Se prefieren los virus defectuosos que carecen totalmente o casi totalmente de genes víricos. Un virus defectuoso no es infectivo tras la introducción en una célula. El uso de vectores víricos defectuosos permite la administración a células en una zona específica localizada, sin preocuparse de que el vector pueda infectar otras células. Los ejemplos de vectores particulares incluyen, pero no se limitan a, un vector de virus herpes simplex 1 (HSV1) defectuoso (Kaplitt *et al.*, Molec. Cell. Neurosci. 2: 320-30, 1991); un vector de adenovirus atenuado, tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet *et al.*, J. Clin. Invest. 90: 626-30, 1992; y un vector de virus adenoasociado defectuoso (Samulski *et al.*, J. Virol. 61: 3096-101, 1987; Samulski *et al.*, J. Virol. 63: 3822-8, 1989).
- En otra realización, se puede introducir un gen zcytor19 en un vector retrovílico, como describen, por ejemplo, Anderson *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.399.346; Mann *et al.*, Cell 33: 153, 1983; Temin *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.650.764; Temin *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.980.289; Markowitz *et al.*, J. Virol. 62: 1120, 1988; Temin *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.124.263; Publicación de Patente Internacional n° WO 95/07358, publicada el 16 de Marzo de 1995 por Dougherty *et al.*; y Kuo *et al.*, Blood 82: 845, 1993. Alternativamente, el vector puede ser introducido por lipofección *in vivo* usando liposomas. Se pueden utilizar lípidos catiónicos sintéticos para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador (Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7, 1987; Mackey *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8027-31, 1988). El uso de la lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos *in vivo* presenta ciertas ventajas prácticas. La dirección molecular de liposomas a células específicas representa un área de provecho. Más particularmente, el dirigir la transfección a células particulares representa un área de provecho. Por ejemplo, dirigir la transfección a tipos celulares particulares resultaría particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el páncreas, el hígado, el riñón o el cerebro. Para el fin de dirección, los lípidos pueden ser químicamente copulados con otras moléculas. Se pueden copular químicamente péptidos específicos (por ejemplo, hormonas o neurotransmisores), proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no peptídicas con liposomas.
- Es posible separar las células diana del organismo para introducir el vector como un plásmido de DNA desnudo y reimplantar luego en el organismo las células transformadas. Se pueden introducir vectores de DNA desnudos para terapia génica en las células huésped deseadas por métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato cálcico, uso de una pistola génica y uso de un transportador de vectores de DNA. Véanse, por ejemplo, Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 963-7, 1992; y Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 263: 14621-4, 1988.
- Se puede utilizar la metodología antisentido para inhibir la transcripción del gen zcytor19, tal como para inhibir la proliferación celular *in vivo*. Se diseñan polinucleótidos que son complementarios de un segmento de un polinucleótido que codifica zcytor19 (por ejemplo, un polinucleótido como el expuesto en la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 18 o ID. SEC. n° 20), para que se unan con el mRNA que codifica zcytor19 y para que inhiban la traducción de dicho mRNA. Dichos polinucleótidos antisentido se utilizan para inhibir, en un cultivo celular o en un sujeto, la expresión de genes que codifican el polipéptido zcytor19.

Además, como una molécula de la superficie celular, el polipéptido zcytor19 puede ser utilizado como una diana para introducir terapia génica en una célula. Esta aplicación sería particularmente apropiada para introducir genes terapéuticos en células en que se expresa normalmente zcytor19, tales como tejido linfoide, médula ósea, próstata, tiroides y PBLs, o en células cancerosas que expresan el polipéptido zcytor19. Por ejemplo, se puede dirigir una terapia con genes víricos, tal como la anteriormente descrita, a tipos celulares específicos en que se expresa un receptor celular, tal como un polipéptido zcytor19, en lugar del receptor vírico. Se pueden usar anticuerpos, u otras moléculas que reconocen moléculas de zcytor19 en la superficie de la célula diana, para dirigir el virus para que infecte y administre material terapéutico génico a la célula diana. Véanse, S. L. C. Woo, *Nature Biotech.* 14: 1538, 1996; T. J. Wickham *et al.*, *Nature Biotech.* 14: 1570-1573, 1996; J. T. Douglas *et al.*, *Nature Biotech.* 14: 1574-1578, 1996; B. Rihova, *Crit. Rev. Biotechnol.* 17: 149-169, 1997; y R. G. Vile *et al.*, *Mol. Med. Today* 4: 84-92, 1998. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo biespecífico que contenga un fragmento Fab neutralizante de virus copulado con un anticuerpo específico para zcytor19, para dirigir el virus a células que expresan el receptor zcytor19 y permitir la entrada eficaz del virus que contiene un elemento genético en las células. Véanse, por ejemplo, T. J. Wickham *et al.*, *J. Virol.* 71: 7663-7669, 1997; y T. J. Wickham *et al.*, *J. Virol.* 70: 6831-6838, 1996.

El presente invento también proporciona reactivos que resultarán útiles en aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo, se puede utilizar el gen zcytor19, una sonda que comprenda DNA o RNA de zcytor19 o una subsecuencia de los mismos, para determinar si el gen zcytor19 está presente en el cromosoma 1 o si se ha producido una mutación. Zcytor19 está situado en la región 1p36.11 del cromosoma 1. Las aberraciones cromosómicas detectables en el locus del gen zcytor19 incluyen, pero no se limitan a, aneuploidía, cambios en el número de copias génicas, inserciones, deleciones, cambios en sitios de restricción y transposiciones. Dichas aberraciones pueden ser detectadas usando polinucleótidos del presente invento mediante el empleo de técnicas de genética molecular, tales como el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP; del inglés, *restriction fragment length polymorphisms*), métodos de hibridación *in situ* con fluorescencia, el análisis de repeticiones cortas en tándem (STR; del inglés, *short tandem repeats*) empleando técnicas de PCR, y otras técnicas para el análisis de ligamientos genéticos conocidas en la técnica (Sambrook *et al.*, *ibidem*; Ausubel *et al.*, *ibidem*; Marian, *Chest* 108: 255-65, 1995).

El conocimiento exacto de la posición de un gen puede ser útil para diversos fines, que incluyen: 1) determinar si una secuencia es parte de un contigto existente y obtener secuencias genéticas circundantes adicionales en varias formas, tales como cromosomas artificiales de levadura (YAC), cromosomas artificiales de bacteria (BAC) o clones de cDNA; 2) proporcionar un posible candidato génico para una enfermedad heredable que muestre ligamiento con la misma región cromosómica; y 3) organismos modelo de referencia cruzada, tal como el ratón, que pueden ayudar a determinar qué función podría tener un gen concreto.

El gen zcytor19 está situado en la región 1p36.11 del cromosoma 1. Un experto en la técnica reconocerá que, en diversos cánceres, incluyendo neuroblastoma, melanoma y cánceres de mama, colon, próstata y otros, están implicadas aberraciones cromosómicas en, y cerca de, la región 1p36. Dichas aberraciones incluyen anormalidades cromosómicas groseras, tales como translocaciones, pérdida de heterogeneidad (LOH; del inglés, *loss of heterogeneity*) y similares, en, y cerca de, 1p36. De este modo, un marcador del locus 1p36.11, tal como el proporcionado por los polinucleótidos del presente invento, sería útil para detectar translocaciones, aneuploidía, transposiciones, LOH y otras anormalidades cromosómicas que afectan a esta región cromosómica y están presentes en cánceres. Por ejemplo, se pueden usar sondas del polinucleótido zcytor19 para detectar anormalidades o genotipos asociados con el neuroblastoma, en el que predomina una LOH entre 1p36.1 y 1p36.3 y es evidente un punto de ruptura en 1p36.1. Al menos el 70% de los neuroblastomas presentan aberraciones cromosómicas citogenéticamente visibles en 1p, incluyendo translocación y deleción, y la anormalidad es debida muy probablemente a mecanismos de translocación y deleción complejos. Véanse, por ejemplo, M. K. Ritke *et al.*, *Cytogenet. Cell Genet.* 50: 84-90, 1989; y A. Weith *et al.*, *Genes Chromosomes Cancer* 1: 159-166, 1989). Puesto que zcytor19 está localizado en 1p36.11, y cae directamente en la región en que predominan aberraciones en el neuroblastoma, un experto en la técnica apreciará que los polinucleótidos del presente invento podrían servir como agentes diagnósticos para el neuroblastoma, así como en la elucidación de los mecanismos de translocación y deleción que dan lugar al neuroblastoma. Además, es evidente una LOH en 1p36 en el melanoma [N. C. Dracopoli *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 45 (supl.): A19, 1989; N. C. Dracopoli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 4614-4618, 1989; A. M. Goldstein *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 52: 537-550, 1993), así como en el cáncer de próstata en familias con una historia tanto de cáncer de próstata como de cerebro (1p36, LOH) (M. Gibbs *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 64: 776-787, 1999), y en el cáncer de mama, siendo deleciones y duplicaciones del cromosoma 1 las aberraciones más comunes en el carcinoma de mama (1p36) (G. Kovacs, *Int. J. Cancer* 21: 688-694, 1978; C. Rodgers *et al.*, *Cancer Genet. Cytogenet.* 13: 95-119, 1984; y M. Genuardi *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 45: 73-82, 1989). Puesto que predominan la translocación, la LOH y otras aberraciones en esta región del cromosoma 1 humano en los cánceres humanos, y el gen zcytor19 está específicamente situado en 1p36.11, los polinucleótidos del presente invento son útiles para detectar tales aberraciones que están claramente asociadas con enfermedades humanas, como aquí se describe.

Además, hay más evidencia del cáncer que resulta de mutaciones en la región 1p36 en que está situado zcytor19, y se pueden usar sondas polinucleotídicas para detectar anormalidades o genotipos asociados con ella: P73, un posible supresor tumoral, mapea en 1p36, una región frecuentemente suprimida en el neuroblastoma y otros cánceres (M. Kaghad *et al.*, *Cell* 90: 809-819, 1997); el rhabdoidosarcoma, que implica una translocación en la región 1p36.2-p36.12 del cromosoma 1 que da lugar a una fusión del gen PAX7 del cromosoma 1 con el gen FKHR del cromosoma 13; la proteína asociada con la leucemia (LAP; del inglés, *leukemia-associated protein*) (1p36.1-p35) está aumentada en las células de diversos tipos de leucemia; el proteoglicano de sulfato de heparán (perlecán) (1p36.1) asociado con

tumores y en el que se han visto translocaciones; y el cáncer de colon (1p36-p35). Además, se pueden usar sondas de polinucleótidos zcytor19 para detectar anomalías o genotipos asociados con deleciones y translocaciones en el cromosoma 1p36.11 asociadas con enfermedades humanas y preferiblemente cánceres, como se describió anteriormente. Además, entre otros loci genéticos, los de componentes del complemento C1q (C1QA, B y G) (1p36.3-p34.1);
 5 dislexia (1p36-p34); el antígeno de activación linfocitaria CD30 (1p36); el canal de sodio de tipo 1 no regulado por voltaje (1p36.3-p36.2); receptores de factores de necrosis tumoral (TNFRSF1b y TNFRSF12 (1p36.3-p36.2), que son receptores citotóxicos como zcytor19; la fosfolipasa A2 (PLA2) (1p35); y la distrofia muscular con espina rígida (1p36-p35), se manifiestan en estados morbosos humanos y también mapean en esta región del genoma humano. Para esta región del cromosoma 1 humano, véase el mapa génico del "Online Mendelian Inheritance of Man" (OMIM™, National
 10 Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, Maryland, EE.UU.), y las referencias en él citadas, en un servidor públicamente disponible de la Red Global Mundial (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmap?chromosome=1p36>). Todos estos sirven como posibles candidatos genéticos para una enfermedad heredable que muestra ligamiento con la misma región cromosómica que el gen zcytor19. De esta forma, se pueden usar sondas del polinucleótido zcytor19 para detectar anomalías o genotipos asociados con estos defectos.

Similarmente, defectos en el propio gen zcytor19 pueden dar lugar a un estado morbo humano heredable. El gen zcytor19 (1p36.11) está situado cerca de otro receptor de clase II, el gen del receptor citotóxico zcytor11 (1p35.1) (Patente de EE.UU. n° 5.965.704 comúnmente reconocida), así como de receptores de TNF (1p36.3-p36.2), lo que sugiere que esta región cromosómica está comúnmente regulada y/o es importante para la función inmune. Además,
 20 un experto en la técnica apreciará que es sabido que defectos en los receptores citotóxicos causan estados morbosos en los seres humanos. Por ejemplo, una mutación en el receptor de la hormona de crecimiento da lugar a enanismo (S. Amselem *et al.*, New Eng. J. Med. 321: 989-995, 1989), una mutación en el receptor gamma de IL-2 da lugar a la inmunodeficiencia combinada grave (SCID; del inglés, severe combined immunodeficiency (M. Noguchi *et al.*, Cell 73: 147-157, 1993), una mutación en c-Mpl da lugar a trombocitopenia (K. Ihara *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 3132-3136, 1999) y, en pacientes deficientes en el receptor de la interleucina 12, aparecen infecciones micobacterianas y por *Salmonella* graves (R. de Jong *et al.*, Science 280: 1435-1438, 1998), entre otros. De esta manera, similarmente, defectos en zcytor19 pueden causar un estado morbo o susceptibilidad a una enfermedad o infección. Puesto que zcytor19 es un receptor citotóxico en un punto cromosómico crítico para aberraciones implicadas en numerosos cánceres y se ha mostrado que se expresa en células de leucemias agudas de células pre-B y otros cánceres aquí descritos, las moléculas del presente invento podrían también estar directamente implicadas en la formación de cáncer o la metástasis. Puesto que el gen zcytor19 está situado en la región 1p36.11, se pueden usar sondas del polinucleótido zcytor19 para detectar una pérdida, trisomía, duplicación o translocación en el cromosoma 1p36.11 asociada con enfermedades humanas, tales como cánceres de células inmunes, neuroblastoma, cánceres de médula ósea, cánceres de tiroides, paratiroides y próstata, melanoma y otros cánceres, o enfermedades inmunes. Además, las moléculas
 35 del presente invento, tales como los polipéptidos, antagonistas, agonistas, polinucleótidos y anticuerpos del presente invento, ayudarían a la detección, el diagnóstico, la prevención y el tratamiento asociados con un defecto genético de zcytor19.

Un agente diagnóstico podría ayudar a los médicos a determinar el tipo de enfermedad y la apropiada terapia asociada, o a obtener asesoramiento genético. Como tales, los anticuerpos anti-zcytor19, polinucleótidos y polipéptidos del invento pueden ser utilizados para la detección del polipéptido zcytor19, mRNA zcytor19 o anticuerpos anti-zcytor19, sirviendo de esta manera como marcadores, y ser directamente utilizados para detectar enfermedades genéticas o cánceres, como aquí se describe, utilizando métodos conocidos en la técnica y aquí descritos. Además, se pueden utilizar sondas del polinucleótido zcytor19 para detectar anomalías o genotipos asociados con deleciones y translocaciones en el cromosoma 1p36.11 asociadas con enfermedades humanas, otras translocaciones implicadas en el progreso maligno de tumores u otras mutaciones en 1p36.11 que supuestamente están implicadas en transposiciones cromosómicas en malignidades; o en otros cánceres o en el aborto espontáneo. Similarmente, se pueden usar sondas del polinucleótido zcytor19 para detectar anomalías o genotipos asociados con trisomía y pérdida cromosómica en el cromosoma 1p36.11 asociadas con enfermedades humanas. De este modo, se pueden usar sondas del polinucleótido zcytor19 para detectar anomalías o genotipos asociados con estos defectos.

Como se discutió anteriormente, defectos en el propio gen zcytor19 pueden dar lugar a un estado morbo humano heredable. Las moléculas del presente invento, tales como los polipéptidos, antagonistas, agonistas, polinucleótidos y anticuerpos del presente invento, ayudarían a la detección, el diagnóstico, la prevención y el tratamiento asociados con un defecto genético en zcytor19. Además, se pueden usar sondas del polinucleótido zcytor19 para detectar diferencias alélicas en el locus cromosómico de zcytor19 entre individuos enfermos y no enfermos. Como tales, las secuencias de zcytor19 pueden ser utilizadas como agentes diagnósticos en la perfiladura forense de DNA.

En general, los métodos diagnósticos utilizados en el análisis de ligamientos genéticos para detectar una anomalía o aberración genética en un paciente son conocidos en la técnica. Las sondas analíticas tendrán generalmente una longitud de al menos 20 nt, aunque se pueden utilizar sondas algo más cortas (por ejemplo, de 14-17 nt). Los cebadores de PCR tienen una longitud de al menos 5 nt, preferiblemente de 15 o más, más preferiblemente de 20-30 nt. Para el análisis grosero de genes o de DNA cromosómico, la sonda del polinucleótido zcytor19 puede comprender un exón completo o más. Los exones son fácilmente determinados por quien tiene experiencia en la técnica comparando secuencias de zcytor19 (ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 18 o ID. SEC. n° 20) con el DNA genómico humano para zcytor19 (n° de acceso de Genbank: AL358412). En general, los métodos diagnósticos utilizados en un análisis de ligamientos genéticos para detectar una anomalía o aberración genética en un paciente son conocidos en la técnica. La mayoría de los métodos diagnósticos comprenden las operaciones de (a) obtener una muestra genética de un

paciente posiblemente enfermo, un paciente enfermo o un posible portador no enfermo de un alelo morbosos recesivo; (b) obtener un primer producto de reacción al incubar la muestra genética con una sonda del polinucleótido zcytor19, polinucleótido que se hibridará con una secuencia polinucleotídica complementaria, tal como en un análisis de RFLP, o al incubar la muestra genética con cebadores sentido y antisentido en una reacción PCR bajo unas condiciones de reacción PCR apropiadas; (c) visualizar el primer producto de reacción por electroforesis en gel y/o otro método conocido tal como visualizar el primer producto de reacción con una sonda del polinucleótido zcytor19, polinucleótido que se hibridará con la secuencia polinucleotídica complementaria de la primera reacción; y (d) comparar el primer producto de reacción visualizado con un segundo producto de reacción testigo de una muestra genética procedente de un paciente de tipo silvestre. Una diferencia entre el primer producto de reacción y el producto de reacción testigo es indicativa de una anomalía genética en el paciente enfermo o posiblemente enfermo, o la presencia de un fenotipo portador recesivo heterocigótico en un paciente no enfermo, o la presencia de un defecto genético en un tumor de un paciente enfermo, o la presencia de una anomalía genética en un feto o en un embrión para preimplantación. Por ejemplo, una diferencia en el patrón de fragmentos de restricción, la longitud de los productos de PCR, la longitud de secuencias repetitivas en el locus genético de zcytor19, y similares, es indicativa de una anomalía genética, una aberración genética o una diferencia alélica en comparación con el testigo normal de tipo silvestre. Los testigos pueden proceder de miembros familiares no afectados o de individuos no relacionados, dependiendo del ensayo y la disponibilidad de muestras. Las muestras genéticas para uso en el presente invento incluyen DNA genómico, mRNA y cDNA aislados de cualquier tejido u otra muestra biológica de un paciente, tales como, pero sin limitarse a, sangre, saliva, semen, células embrionarias, fluido amniótico y otros. La sonda o el cebador polinucleotídicos puede ser RNA o DNA y comprenderá una porción de la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 18 o ID. SEC. n° 20, el complemento de la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 18 o ID. SEC. n° 20, o un equivalente de RNA de las mismas. Dichos métodos para mostrar ligamientos genéticos a fenotipos morbosos humanos son bien conocidos en la técnica. Para referencia a métodos basados en PCR para diagnóstico, véanse, de forma general, Mathew (redactor), "Protocols in Human Molecular Genetics" (Humana Press, Inc., 1991); White (redactor), "PCR Protocols: Current Methods and Applications" (Humana Press, Inc., 1993); Cotter (redactor), "Molecular Diagnosis of Cancer" (Humana Press, Inc., 1996); Hanausek y Walaszek (redactores), "Tumor Marker Protocols" (Humana Press, Inc., 1998); Lo (redactor), "Clinical Applications of PCR" (Humana Press, Inc., 1999); y Meltzer (redactor), "PCR in Bioanalysis" (Humana Press, Inc., 1998).

Se pueden detectar mutaciones asociadas con el locus de zcytor19 usando moléculas de ácido nucleico del presente invento y empleando métodos estándares para el análisis directo de mutaciones, tales como el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, el análisis de repeticiones cortas en tándem empleando técnicas de PCR, el análisis de sistemas de mutaciones refractarias a la multiplicación, la detección de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla, métodos de escisión con RNasa, electroforesis en gel con gradiente desnaturante, el análisis de apareamientos erróneos asistido por fluorescencia, y otras técnicas de análisis genético conocidas en este campo técnico [véanse, por ejemplo, Mathew (redactor), "Protocols in Human Molecular Genetics" (Humana Press, Inc., 1991); Marian, *Chest* 108: 255 (1995); Coleman y Tsongalis, "Molecular Diagnostics" (Humana Press, Inc., 1996); Elles (redactor) "Molecular Diagnosis of Genetic Diseases" (Humana Press, Inc., 1996); Landegren (redactor), "Laboratory Protocols for Mutation Detection" (Oxford University Press, 1996); Birren *et al.* (redactores), "Genome Analysis", Vol. 2: "Detecting Genes" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998); Dracopoli *et al.* (redactores), "Current Protocols in Human Genetics" (John Wiley & Sons, 1998); y Richards y Ward, "Molecular Diagnostic Testing" en "Principles of Molecular Medicine", páginas 83-88 (Humana Press, Inc., 1998)]. El análisis directo de un gen zcytor19 en cuanto a una mutación se puede llevar a cabo usando DNA genómico de un sujeto. Los métodos para multiplicar DNA genómico, obtenido, por ejemplo, de linfocitos de sangre periférica, son bien conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica [véase, por ejemplo, Dracopoli *et al.* (redactores), "Current Protocols in Human Genetics", páginas 7.1.6 a 7.1.7 (John Wiley & Sons, 1998)].

También se pueden generar ratones contruidos para que expresen el gen zcytor19, a los que se hace referencia como "ratones transgénicos", y ratones que presenten una completa ausencia de la función del gen zcytor19, a los que se hace referencia como "ratones inoperantes [knock-out (KO) en inglés]" (Snouwaert *et al.*, *Science* 257: 1083, 1992; Lowell *et al.*, *Nature* 366: 740-42, 1993; M. R. Capecchi, *Science* 244: 1288-1292, 1989; R. D. Palmiter *et al.*, *Annu. Rev. Genet.* 20: 465-499, 1986). Por ejemplo, se pueden usar ratones transgénicos que sobreexpresen zcytor19, sea ubicuamente o sea bajo un promotor tisularmente específico o tisularmente restringido, para preguntarse si la sobreexpresión causa un fenotipo. Por ejemplo, la sobreexpresión de un polipéptido zcytor19 de tipo silvestre, un fragmento polipeptídico o un mutante del mismo puede alterar procesos celulares normales para dar lugar a un fenotipo que identifica un tejido en que la expresión de zcytor19 es funcionalmente relevante, y puede indicar una diana terapéutica para zcytor19, sus agonistas o sus antagonistas. Por ejemplo, un ratón transgénico preferido para construir es uno que expresa un fenotipo "dominante-negativo", tal como uno que sobreexpresa el polipéptido zcytor19 que comprende un dominio extracelular de unión a citocinas con el dominio transmembranal fijado [aproximadamente de los aminoácidos 21 (Arg) a 249 (Trp) de la ID. SEC. n° 2 o ID. SEC. n° 19; o ID. SEC. n° 4, fijados en marco a un dominio transmembranal]. Otro ratón transgénico preferido es uno que sobreexpresa receptores zcytor19 solubles tales como los aquí descritos. Además, dicha sobreexpresión puede dar lugar a un fenotipo que muestre similitud con enfermedades humanas. Similarmente, se pueden usar ratones zcytor19 inoperantes para determinar si zcytor19 es absolutamente necesario *in vivo*. El fenotipo de los ratones inoperantes permite pronosticar los efectos *in vivo*, tales como los aquí descritos, que puede tener un antagonista de zcytor19. El cDNA de zcytor19 humano o de ratón puede ser utilizado para aislar mRNA, cDNA y DNA genómico murinos de zcytor19, los cuales se usan posteriormente para generar ratones inoperantes. Estos ratones transgénicos e inoperantes se pueden emplear para estudiar en un sistema *in vivo* el gen zcytor19 y la proteína por él codificada, y se pueden usar como modelos *in vivo* para las correspondientes enfermedades humanas o animales (tales como aquéllas de poblaciones animales comercialmente

viabiles). Los modelos en ratón del presente invento son particularmente relevantes como modelos tumorales para el estudio de la biología y el progreso del cáncer. Dichos modelos son útiles en el desarrollo y la eficacia de las moléculas terapéuticas utilizadas en cánceres humanos. Puesto que los aumentos de la expresión de zcytor19, así como las disminuciones de la expresión de zcytor19, se asocian con cánceres humanos específicos, tanto los ratones transgénicos como los ratones inoperantes servirían como modelos animales útiles para el cáncer. Además, en una realización preferida, el ratón transgénico para zcytor19 puede servir como un modelo animal para tumores específicos, particularmente para tumores de esófago, hígado, ovario, recto, estómago y útero, melanoma, leucemia de células B y otros cánceres linfoides. Más aún, la expresión de polinucleótidos zcytor19 antisentido o de ribozimas dirigidas contra zcytor19 en ratones transgénicos, aquí descrita, se puede aplicar análogamente a los ratones transgénicos anteriormente descritos.

Para uso farmacéutico, los polipéptidos receptores solubles del presente invento se formulan para distribución parenteral, particularmente intravenosa o subcutánea, de acuerdo con métodos convencionales. La administración intravenosa será mediante inyección de bolos o infusión durante un periodo típico de una a varias horas. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán un polipéptido receptor soluble zcytor19 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa al 5% en agua, o similar. Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, agentes solubilizadores, agentes tampón, albúmina para evitar la pérdida de proteínas en las superficies de los viales, etc. Los métodos de formulación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington: "The Science and Practice of Pharmacy", redactado por Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, EE.UU., 19ª edición, 1995. Las dosis terapéuticas estarán generalmente en el intervalo de 0,1 a 100 µg/kg de peso del paciente por día, preferiblemente 0,5-20 mg/kg por día, siendo determinada la dosis exacta por el clínico de acuerdo con normas aceptadas, teniendo en cuenta la naturaleza y la gravedad del estado que se trata, las características del paciente, etc. La determinación de la dosis está dentro del nivel de experiencia normal en la técnica. Las proteínas se pueden administrar para un tratamiento agudo, durante una semana o menos, a menudo durante un periodo de uno a tres días, o se pueden usar en un tratamiento crónico, durante varios meses o años. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido receptor soluble zcytor19 es una cantidad suficiente para producir un efecto clínicamente significativo.

Los polinucleótidos y polipéptidos del presente invento resultarán adicionalmente útiles como herramientas educativas en forma de kits para prácticas de laboratorio en cursos relacionados con genética y biología molecular, química de proteínas y producción y análisis de anticuerpos. A causa de sus secuencias polinucleotídica y polipeptídica únicas, las moléculas de zcytor19 pueden ser usadas como patrones o como "desconocidos" con fines de ensayo. Por ejemplo, los polinucleótidos zcytor19 se pueden utilizar como una ayuda, tal como, por ejemplo, para enseñar a un estudiante cómo preparar construcciones de expresión para la expresión en bacterias, virus y/o mamíferos, incluyendo construcciones de fusión en que zcytor19 es el gen que se va a expresar; para determinar los sitios de escisión por endonucleasas de restricción en los polinucleótidos; para determinar la localización de mRNA y DNA de los polinucleótidos zcytor19 en los tejidos (es decir, mediante transferencias Northern y Southern así como mediante la reacción en cadena de la polimerasa); y para identificar polinucleótidos y polipéptidos relacionados mediante la hibridación de ácido nucleico.

Los polipéptidos zcytor19 se pueden usar educativamente como una ayuda para enseñar la preparación de anticuerpos; identificar proteínas mediante transferencia Western; la purificación de proteínas; determinar el peso de los polipéptidos zcytor19 expresados como una relación con respecto a la proteína total expresada; identificar sitios de escisión peptídica; copular etiquetas amínicas y carboxílicas terminales; el análisis de la secuencia de aminoácidos, así como, pero sin limitarse a, la determinación de actividades biológicas tanto de la proteína nativa como de la etiquetada (es decir, unión al receptor, transducción de señales, proliferación y diferenciación) *in vitro* e *in vivo*. También se pueden utilizar los polipéptidos zcytor19 para enseñar habilidades analíticas tales como espectrometría de masas, dicroísmo circular para determinar la conformación, especialmente de las cuatro hélices alfa, cristalografía por rayos X para determinar la estructura tridimensional con detalle atómico, y espectrometría de resonancia magnética nuclear para revelar la estructura de las proteínas en disolución. Por ejemplo, se puede dar un kit que contenga zcytor19 al estudiante para que lo analice. Puesto que el profesor conoce la secuencia de aminoácidos, se puede dar la proteína específica al estudiante como una prueba para determinar o desarrollar sus habilidades; el profesor sabría entonces si el estudiante ha analizado correctamente el polipéptido o no. Puesto que cada polipéptido es único, la utilidad educativa de zcytor19 sería en sí única.

Además, puesto que zcytor19 presenta una expresión tisularmente específica y es un polipéptido con una estructura de receptor citocínico de clase II y una localización cromosómica y un patrón de expresión distintos, se puede medir la actividad utilizando ensayos de proliferación y los ensayos de luciferasa y unión aquí descritos. Además, se puede analizar la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos zcytor19 en tejidos linfoides y otros tejidos con objeto de entrenar a los estudiantes en el uso de métodos diagnósticos y para la identificación específica de tejidos. Además, puesto que se conoce su locus, los polinucleótidos zcytor19 pueden ser usados para entrenar a los estudiantes en el uso de métodos para detección y diagnóstico cromosómicos. Además, los estudiantes pueden ser específicamente entrenados y educados acerca del cromosoma 1 humano y, más específicamente, del locus 1p36.11 en que está situado el gen zcytor19. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica y pueden ser utilizados en un escenario educativo para enseñar a los estudiantes acerca de proteínas receptoras de citocinas y examinar las diferentes propiedades, tales como los efectos celulares sobre células, cinéticas enzimáticas, afinidades variables en la unión con anticuerpos, especificidad tisular y otras, entre zcytor19 y otros polipéptidos receptores de citocinas de la técnica.

Los anticuerpos que se unen específicamente con zcytor19 pueden ser utilizados como una ayuda didáctica para instruir a los estudiantes sobre cómo preparar columnas para cromatografía de afinidad para purificar zcytor19, y cómo clonar y secuenciar el polinucleótido que codifica un anticuerpo y, por lo tanto, como una práctica para enseñar a un estudiante cómo diseñar anticuerpos humanizados. Además, los anticuerpos que se unen específicamente con zcytor19 pueden ser utilizados como una ayuda didáctica para uso en la detección de tejido tumoral de células B, tumores de esófago, hígado, ovario, recto, estómago y útero, melanoma, leucemia linfoblástica de células pre-B y otros cánceres linfoides, usando, entre otros, métodos histológicos e *in situ* conocidos en la técnica. El gen, polipéptido o anticuerpo zcytor19 sería entonces envasado por compañías de reactivos y sería vendido a universidades y otras entidades educativas para que los estudiantes adquirieran experiencia en el campo de la biología molecular. Puesto que cada gen y cada proteína son únicos, cada gen y cada proteína crean retos y experiencias de aprendizaje únicos para los estudiantes en una práctica de laboratorio. Se considera que dichos kits educativos que contienen el gen, polipéptido o anticuerpo zcytor19 están dentro del alcance del presente invento.

El invento es adicionalmente ilustrado mediante los siguientes ejemplos no restrictivos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación y aislamiento de cDNA humano de longitud completa de zcytor19

Se identificó zcytor19 como un previsto cDNA de longitud completa a partir del DNA genómico humano AL358412 (Genbank). La secuencia del previsto polinucleótido zcytor19 de longitud completa se muestra en la ID. SEC. n° 1, y el correspondiente polipéptido se muestra en la ID. SEC. n° 2. Se identificó una secuencia variante de cDNA de zcytor19 de longitud completa, que se muestra en la ID. SEC. n° 18, y los correspondientes polinucleótidos se muestran en la ID. SEC. n° 19. Además, se identificó una forma soluble trunca de la secuencia de cDNA de zcytor19, que se muestra en la ID. SEC. n° 20, y los correspondientes polinucleótidos se muestran en la ID. SEC. n° 21.

Ejemplo 2

Distribución tisular en grupos tisulares utilizando transferencia Northern y PCR

A. Distribución tisular de zcytor19 humano utilizando transferencia Northern

Se sondan transferencias Northern de múltiples tejidos (MTN; del inglés, multiple tissue Northern) humanos (Transferencias I y II MTN del carril 12 humano, y Transferencia II MTN del sistema inmune humano) (Clontech) para determinar la distribución tisular de la expresión de zcytor19 humano. Se multiplica una sonda derivada por PCR, que se hibrida con la ID. SEC. n° 1 o la ID. SEC. n° 18, utilizando métodos de multiplicación por PCR estándares. Se lleva a cabo una reacción PCR ejemplar del modo siguiente utilizando cebadores diseñados para que se hibriden con la ID. SEC. n° 1, la ID. SEC. n° 18 o su complemento: 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 65°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto; seguidos de 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. El producto de la PCR se visualiza mediante electroforesis en gel de agarosa y es purificado en gel del modo aquí descrito. Se marca radiactivamente la sonda utilizando, por ejemplo, el kit PRIME IT II™ (Stratagene) para marcación aleatoria de cebadores, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se purifica la sonda usando, por ejemplo, una columna de empuje NUCTRAP™ (Stratagene). Se usa una disolución EXPRESSHYB™ (Clontech) para la prehibridación y como una disolución de hibridación para las transferencias Northern. Se lleva a cabo la prehibridación a, por ejemplo, 68°C durante 2 horas. La hibridación tiene lugar durante la noche a aproximadamente 68°C con aproximadamente $1,5 \times 10^6$ cpm/ml de sonda marcada. Las transferencias son lavadas tres veces a temperatura ambiental en SSC 2x, SDS al 0,05%, lo que va seguido de 1 lavado durante 10 minutos en SSC 2x, SDS al 0,1%, a 50°C. Se espera que, después de una exposición a una película para rayos X, se vea un transcrito correspondiente a la longitud de la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 18 o ID. SEC. n° 20, o de un mRNA que codifica la ID. SEC. n° 2, ID. SEC. n° 19 o ID. SEC. n° 21, en los tejidos que expresan específicamente zcytor19 pero no en otros tejidos.

Se lleva también a cabo un análisis Northern usando MTN™ de líneas de células cancerosas humanas (Clontech). Las condiciones de la PCR y la sonda son como se describieron anteriormente. Una intensa señal en una línea cancerosa sugiere que la expresión de zcytor19 puede ser expresada en células activadas y/o puede indicar un estado morbozo canceroso. Además, usando métodos conocidos en la técnica, las transferencias Northern o el análisis por PCR de células linfocíticas activadas pueden también mostrar si se expresa zcytor19 en células inmunes activadas. Basándose en información Northern electrónica, se mostró que zcytor19 se expresaba específicamente en células de leucemia linfoblástica aguda de células pre-B.

B. Distribución tisular en grupos tisulares usando PCR

Utilizando la PCR, se exploró un grupo de cDNAs de tejidos humanos en cuanto a la expresión de zcytor19. El grupo se preparó de forma casera y contenía 94 muestras de cDNA y cDNA Marathon procedentes de diversas líneas

celulares y tejidos humanos cancerosos y normales, como se muestra más adelante en la Tabla 5. Los cDNAs procedían de bancos caseros o de cDNAs Marathon de preparaciones de RNA caseras, RNA de Clontech o RNA de Invitrogen. Los cDNAs Marathon fueron preparados usando el kit Marathon-Ready™ (Clontech, Palo Alto, California, EE.UU.), ensayados con los cebadores de clatrina ZC21195 (ID. SEC. nº 6) y ZC21196 (ID. SEC. nº 7) para control de calidad y luego diluidos basándose en la intensidad de la banda de clatrina. Para asegurar la calidad de las muestras del grupo, se desarrollaron tres ensayos para control de calidad (CC): (1) para evaluar la calidad del RNA usado para los bancos, los cDNAs caseros fueron examinados en cuanto al tamaño medio de inserto por PCR con oligonucleótidos vectores que eran específicos para las secuencias vectores para un banco de cDNA individual; (2) la normalización de la concentración del cDNA en las muestras del grupo se llevó a cabo usando métodos de PCR estándares para multiplicar el cDNA de G3PDH o de tubulina alfa de longitud completa usando el oligonucleótido vector 5' ZC14.063 (ID. SEC. nº 8) y el cebador oligonucleotídico 3' ZC17.574 (ID. SEC. nº 9) específico de alfa tubulina o el cebador oligonucleotídico 3' ZC17.600 (ID. SEC. nº 10) específico de G3PDH; y (3) se envió una muestra a secuenciar para comprobar una posible contaminación por DNA ribosómico o mitocondrial. El grupo se ajustó a una estructura de 96 pocillos que incluía una muestra testigo positiva de DNA genómico humano (Clontech, Palo Alto, California, EE.UU.). Cada pocillo contenía aproximadamente 0,2-100 pg/ μ l de cDNA. Se ajustó la PCR usando los oligonucleótidos ZC37685 (ID. SEC. nº 26) y ZC37681 (ID. SEC. nº 27), TaKaRa Ex Taq™ (TAKARA Shuzo Co. Ltd., Biomedicals Group, Japón) y colorante Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville, Alabama, EE.UU.). La multiplicación se llevó a cabo del modo siguiente: 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos, 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 70°C durante 30 segundos, 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 64°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguidos de 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos. Se sometieron aproximadamente 10 μ l del producto de la reacción PCR a una electroforesis estándar en gel de agarosa utilizando un gel de agarosa al 4%. Se observó el previsto fragmento de DNA de tamaño correcto en la glándula adrenal, vejiga, cuello del útero, colon, corazón fetal, piel fetal, hígado, pulmón, melanoma, ovario, glándula salival, intestino delgado, estómago, cerebro, hígado fetal, riñón, próstata, médula espinal, tiroides, placenta, testículo, esófago tumoral, hígado tumoral, ovario tumoral, recto tumoral, estómago tumoral, útero tumoral, médula ósea, banco de CD3+, banco de HaCAT, banco de HPV y banco de HPVS. Puesto que esta pareja de cebadores no abarca un intrón, puede existir el riesgo de que ciertos tejidos que estén contaminados con DNA genómico o mensajes de mRNA no procesados creen un falso positivo en este ensayo.

Por lo tanto, se utilizó una diferente pareja de cebadores que abarcan intrones, ZC38481 (ID. SEC. nº 47) y ZC38626 (ID. SEC. nº 48), utilizando los métodos anteriormente descritos, para reevaluar la distribución tisular. Se observó el previsto fragmento de DNA de tamaño correcto [256 pares de bases (bp; del inglés, base pairs)] en el colon, corazón fetal, hígado fetal, riñón, hígado, pulmón, glándula mamaria, próstata, glándula salival, intestino delgado, banco de adipocitos, banco de cerebro banco de islotes, banco de próstata, RPMI 1788 (línea de células B), médula espinal, banco de placenta, testículo, esófago tumoral, ovario tumoral, recto tumoral, estómago tumoral, banco de HaCAT, banco de HPV y banco de HPVS.

También se examinaron grupos de tejidos de ratón usando otro conjunto de pares de cebadores: (1) ZC38706 (ID. SEC. nº 49) y ZC38711 (ID. SEC. nº 50) (producto de 800 bp), utilizando los métodos anteriormente descritos. Este grupo mostró una limitada distribución tisular para zcytor19 de ratón: piel, banco de glándulas salivales y líneas celulares prostáticas de ratón.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 5

Línea tisular/celular c	Nº de muestras	Línea tisular/celular	Nº de muestras
Glándula adrenal	1	Médula ósea	3
Vejiga	1	Cerebro fetal	3
Médula ósea	1	Islote	2
Cerebro	1	Próstata	3
Cuello del útero	1	RPMI nº 1788 (ATCC nº CCL-156)	2
Colon	1	Testículo	4
Cerebro fetal	1	Tiroides	2
Corazón fetal	1	WI38 (ATCC nº CCL-75)	2
Riñón fetal	1	ARIP (ATCC nº CRL-1674 – rata)	1
Hígado fetal	1	HaCat – queratinocitos humanos	1
Pulmón fetal	1	HPV (ATCC nº CRL-2221)	1
Músculo fetal	1	Glándula adrenal	1
Piel fetal	1	Prostata SM	2
Corazón	2	PBMCs seleccionadas CD3+, estimuladas con ionomicina + PMA	1
K562 (ATCC nº CCL-243)	1	HPVS (ATCC nº CRL-2221) – seleccionada	1
Riñón	1	Corazón	1
Hígado	1	Hipófisis	1
Pulmón	1	Placenta	2

ES 2 334 888 T3

TABLA 5 (continuación)

	Línea tisular/celular c	Nº de muestras	Línea tisular/celular	Nº de muestras
5	Ganglio linfático	1	Glándula salival	1
10	Melanoma	1	HL60 (ATCC nº CCL-240)	3
	Páncreas	1	Plaqueta	1
15	Hipófisis	1	HBL-100	1
	Placenta	1	Mesangial renal	1
20	Próstata	1	Célula T	1
	Recto	1	Neutrófilo	1
25	Glándula salival	1	MPC	1
	Músculo esquelético	1	Hut-102 (ATCC nº TIB-162)	1
	Intestino delgado	1	Endotelial	1
30	Médula espinal	1	HepG2 (ATCC nº HB-8065)	1
	Bazo	1	Fibroblasto	1
35	Estómago	1	E. Histo	1
	Testículo	2		
40	Timo	1		
	Tiroides	1		
45	Tráquea	1		
	Útero	1		
50	Tumor esofágico	1		
	Tumor gástrico	1		
	Tumor renal	1		
55	Tumor hepático	1		
	Tumor pulmonar	1		
60	Tumor ovárico	1		
	Tumor rectal	1		
65	Tumor uterino	1		

Ejemplo 3

Mapeo cromosómico del gen zcytor19, basado en la PCR

5 Se mapea zcytor19 en el cromosoma 1 usando el “conjunto de híbridos por radiación (RH; del inglés, radiation hybrid) Genebridge 4 para mapeo” (Research Genetics, Inc., Huntsville, Alabama, EE.UU.) comercialmente asequible. El conjunto de RH Genebridge 4 contiene DNA de cada uno de 93 clones híbridos por radiación, más dos DNAs testigo (el dador HFL y el aceptor A23). Un servidor WWW públicamente disponible (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) permite mapear con respecto al mapa de híbridos por radiación del genoma humano del Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research (el mapa de híbridos por radiación “WICGR”), que se construye con el conjunto de RH Genebridge 4.

15 Para el mapeo de zcytor19 con el conjunto de RH Genebridge 4, se preparan mezclas de reacción de 20 µl en una placa para microtitulación de 96 pocillos compatible para PCR (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) y se utilizan en un termociclador “RoboCycler Gradient 96” (Stratagene). Cada una de las 95 mezclas de reacción PCR consistía en 2 µl de tampón de reacción PCR KlenTaq 10X (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California, EE.UU.), 1,6 µl de mezcla de dNTPs (cada uno 2,5 mM, Perkin-Elmer, Foster City, California, EE.UU.), 1 µl del cebador sentido ZC27.895 (ID. SEC. nº 14), 1 µl del cebador antisentido ZC27.899 (ID. SEC. nº 24), 2 µl de “RediLoad” (Research Genetics, Inc., Huntsville, Alabama, EE.UU.), 0,4 µl de mezcla de polimerasas Advantage KlenTaq 50X (Clontech Laboratories, Inc.), 25 ng de DNA de un clon híbrido individual o de testigo, y agua destilada para un volumen total de 20 µl. Las mezclas de reacción son cubiertas con una cantidad igual de aceite mineral y son selladas. Las condiciones del termociclador para PCR son las siguientes: 1 ciclo inicial de 5 minutos de desnaturalización a 94°C, 35 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación a 54°C, y 1 minuto y 15 segundos de extensión a 72°C, seguidos de 1 ciclo final de extensión de 7 minutos a 72°C. Las mezclas de reacción son sometidas a separación por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (EM Science, Gibbstown, New Jersey, EE.UU.) y son visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio. Los resultados muestran que zcytor19 mapea en el mapa de híbridos por radiación WICGR del cromosoma 1, en la región cromosómica 1p36.11.

Ejemplo 4

Construcción de vectores de expresión de mamífero que expresan los receptores zcytor19 solubles: zcytor19CEE, zcytor19CFLG, zcytor19CHIS y zcytor19-Fc4

35 A. Construcción del vector de expresión de mamífero de zcytor19 que contiene zcytor19CEE, zcytor19CFLG y zcytor19CHIS

Se prepara un vector de expresión para la expresión del dominio extracelular soluble del polipéptido zcytor19, pC4zcytor19CEE, en que la construcción es diseñada para que exprese un polipéptido zcytor19 compuesto de la prevista metionina de iniciación y truncado adyacentemente al previsto dominio transmembranal, y con una etiqueta Glu-Glu C-terminal (ID. SEC. nº 11).

45 Usando la PCR, se crea un fragmento de DNA de zcytor19 que comprende el dominio extracelular o ligante de citocinas de zcytor19 aquí descrito, y se purifica utilizando métodos estándares. El DNA escindido es subclonado en un vector de expresión plasmídico que tiene un péptido señal, por ejemplo el péptido señal nativo de zcytor19, y fija una etiqueta Glu-Glu (ID. SEC. nº 11) al extremo C de la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido zcytor19. Dicho vector de expresión de mamífero contiene un casete de expresión que tiene un promotor de mamífero, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias de codificación, un codón de parada y un terminador de mamífero. El plásmido puede tener también un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor, un potenciador y un origen de replicación de SV40, un gen DHFR y el terminador de SV40.

55 El inserto de zcytor19 digerido por restricción y el vector previamente digerido son ligados usando técnicas de biología molecular estándares, introducidos por electroporación en células competentes tales como células competentes DH10B (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, sembrados en placas LB que contienen 50 mg/ml de ampicilina, e incubados durante la noche. Las colonias son exploradas por análisis de restricción del DNA preparado a partir de colonias individuales. La secuencia del inserto de los clones positivos es verificada mediante un análisis de secuencias. Se realiza una preparación plasmídica a gran escala usando un kit Qiagen® Maxi Prep (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

60 Se usa el mismo procedimiento para preparar los receptores zcytor19 solubles con una etiqueta His C-terminal, compuesta de 6 restos de His seguidos, y una etiqueta Flag® C-terminal (ID. SEC. nº 12), zcytor19CFLAG. Para realizar estas construcciones, el susodicho vector tiene la etiqueta CHIS o FLAG® en lugar de la etiqueta Glu-Glu (ID. SEC. nº 11).

65

B. Construcción de expresión de mamífero del receptor zcytor19 humano soluble: zcytor19-Fc4

Se preparó un vector de expresión, zcytor19/Fc4/pzmp20, para que expresara una versión soluble de zcytor19 C-terminalmente etiquetada con Fc4 (zcytor19 humano-Fc4) en células BHK. Un fragmento del cDNA de zcytor19 que incluye la secuencia polinucleotídica del dominio extracelular del receptor zcytor19 fue fusionado en marco con la secuencia polinucleotídica de Fc4 (ID. SEC. n° 13) para generar una fusión zcytor19-Fc4 (ID. SEC. n° 22 e ID. SEC. n° 23). El vector pzmp20 es un vector de expresión de mamífero que contiene la secuencia polinucleotídica de Fc4 y un sitio de clonación que permite la rápida construcción de fusiones C-terminales de Fc4 utilizando técnicas de biología molecular estándares.

Se generó un fragmento de 630 pares de bases por PCR, que contenía el dominio extracelular de zcytor19 humano con sitios BamHI y BglII codificados en los extremos 5' y 3', respectivamente. Este fragmento por PCR fue generado utilizando los cebadores ZC37967 (ID. SEC. n° 24) y ZC37972 (ID. SEC. n° 25) mediante multiplicación a partir de un banco de cDNA de cerebro humano. Las condiciones de la reacción PCR fueron las siguientes: 30 ciclos de 94°C durante 20 segundos y 68°C durante 2 minutos; 1 ciclo a 68°C durante 4 minutos; seguidos de un empapamiento a 10°C. El fragmento fue digerido con las endonucleasas de restricción BamHI y BglII y fue posteriormente purificado mediante electroforesis en gel al 1% y purificación de bandas utilizando el kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen). El DNA purificado resultante fue ligado durante 5 horas, a temperatura ambiental, en un vector pzmp20 previamente digerido con BglII que contenía Fc4 en 3' con respecto a los sitios BglII.

Se sometió 1 µl de la mezcla de ligación a electroporación en 37 µl de células electrocompetentes DH10B de *E. coli* (Gibco) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células transformadas fueron diluidas en 400 µl de medio LB y fueron sembradas en placas LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina. Se analizaron los clones mediante digestiones de restricción y se enviaron los clones positivos a una secuenciación de DNA para confirmar la secuencia de la construcción de fusión.

Ejemplo 5

Transfección y expresión de polipéptidos receptores solubles zcytor19

A. Receptor soluble zcytor19 humano de expresión en mamífero: zcytor19/Fc4

Se sembraron células BHK 570 (ATCC n° CRL-10314) en matraces T-75 para cultivo tisular y se dejaron crecer hasta una confluencia de aproximadamente 50 a 70% a 37°C y CO₂ al 5% en medio DMEM-FBS [DMEM, Gibco/BRL High Glucose (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.), suero bovino fetal al 5%, L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas, EE.UU.), piruvato sódico 1 mM (Gibco BRL)]. Las células fueron luego transfectadas con el plásmido zcytor19/Fc4/pzmp20 (Ejemplo 4B) utilizando Lipofectamine™ (Gibco BRL) en una formulación de medio (DMEM, 10 mg/ml de transferrina, 5 mg/ml de insulina, 2 mg/ml de fetuina, L-glutamina al 1% y piruvato sódico al 1%) exento de suero (SF; del inglés, serum free). Se diluyeron 10 µg del DNA plasmídico zcytor19/Fc4/pzmp20 (Ejemplo 4B) en un tubo de 15 ml de capacidad hasta un volumen final total de 500 µl con medio SF. Se mezclaron 50 µl de Lipofectamine con 450 µl de medio SF. La mezcla de Lipofectamine fue añadida a la mezcla de DNA y dejada en incubación aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiental. Se añadieron 4 ml de medio SF a la mezcla de DNA:Lipofectamine. Las células se enjuagaron una vez con 5 ml de medio SF y se aspiraron, y se añadió la mezcla de DNA:Lipofectamine. Se incubaron las células a 37°C durante cinco horas y luego se añadieron 5 ml de medio DMEM/FBS al 10%. Se incubó el matraz a 37°C durante la noche, después de lo cual se dividieron las células en el medio de selección [el medio DMEM/FBS de antes con la adición de metotrexato 1 µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE.UU.)], en placas de 150 mm, hasta 1:2, 1:10 y 1:50. Aproximadamente 10 días después de la transfección, se trató con tripsina una placa de 150 mm de colonias resistentes a metotrexato 1 µM, se reunieron las células y se volvió a sembrar la mitad de las células en metotrexato 10 µM para amplificar más la expresión de la proteína zcytor19/Fc4. Una muestra de medio acondicionado procedente de esta colección de células amplificadas fue examinada en cuanto a los niveles de expresión utilizando SDS-PAGE y análisis Western.

Los clones individuales que expresan los receptores solubles pueden ser también aislados, explorados y desarrollados en un medio de cultivo celular, y purificados utilizando técnicas estándares. Además, las células CHO son también células adecuadas para dichos fines.

Ejemplo 6

Evaluación de la heterodimerización del receptor zcytor19 usando el ensayo ORIGEN

Se biotinila el receptor zcytor19 soluble zcytor19CFLAG (Ejemplo 4 y Ejemplo 5) o gp130 (M. Hibi *et al.*, Cell 63: 1149-1157, 1990) por reacción con sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce, Inc., Rockford, Illinois, EE.UU.) en un exceso molar de cinco órdenes de magnitud, de acuerdo con el protocolo del fabricante. El receptor zcytor19 soluble y otra subunidad de receptor soluble, tal como, por ejemplo, los receptores citocínicos de clase II solubles, tales como, por ejemplo, las cadenas alfa y beta del interferón gamma y las cadenas alfa y beta del receptor del interferón alfa/beta, y los receptores solubles zcytor11 (Patente de EE.UU. n° 5.965.704 comúnmente reconocida), CRF2-4, DIRS1 y

zcytor7 (Patente de EE.UU. n° 5.945.511 comúnmente reconocida). Los receptores de esta subfamilia se pueden asociar para formar homodímeros que transducen una señal. Estos receptores solubles son marcados con Ru-BPY-NHS (Igen, Inc., Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) en un exceso molar de cinco órdenes de magnitud, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las formas biotinilada y marcada con Ru-BPY-NHS del receptor zcytor19 soluble pueden ser respectivamente denominadas receptor Bio-zcytor19 y Ru-zcytor19; las formas biotinilada y marcada con Ru-BPY-NHS de la otra subunidad de receptor soluble pueden ser similarmente denominadas. Se pueden llevar a cabo ensayos usando medios acondicionados procedentes de células que expresan un ligando que se une a receptores heterodímeros zcytor19, o usando ligandos purificados. Son ligandos preferidos aquellos que se pueden unir a receptores citocínicos heterodímeros de clase II, tales como IL-10, IL-9, IL-TIF, interferones, TSLP (S. D. Levine *et al.*, *ibídem*; D. E. Isaksen *et al.*, *ibídem*; R. J. Ray *et al.*, *ibídem*; S. L. Friend *et al.*, *ibídem*), y similares.

Para la caracterización inicial de la unión al receptor, se examina un grupo de citocinas o medios acondicionados, para determinar si pueden mediar en la homodimerización del receptor zcytor19 y si pueden mediar en la heterodimerización del receptor zcytor19 con las subunidades de receptor soluble anteriormente descritas. Para hacer esto, se combinan 50 μ l de medio acondicionado o TBS-B que contiene una citocina purificada, con 50 μ l de TBS-B (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, 1 mg/ml de BSA, pH de 7,2) que contiene, por ejemplo, 400 ng/ml de receptor Ru-zcytor19 y Bio-zcytor19, o 400 ng/ml de receptor Ru-zcytor19 y, por ejemplo, Bio-gp130, o 400 ng/ml de, por ejemplo, Ru-subunidad de clase II y Bio-zcytor19. Después de una incubación durante una hora a temperatura ambiental, se añaden 30 μ g de glóbulos magnéticos de 2,8 mm revestidos con estreptavidina (Dynal, Inc., Oslo, Noruega) y se incuba la mezcla de reacción una hora más a temperatura ambiental. Luego se añaden 200 μ l de tampón de ensayo ORIGEN (Igen, Inc., Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) y se mide el grado de asociación del receptor usando un analizador M8 ORIGEN (Igen, Inc.).

Ejemplo 7

Construcción para generar un heterodímero de receptor zcytor19

Se construye un vector que expresa un heterodímero secretado de zcytor19 humano. En esta construcción, se fusiona el dominio extracelular de zcytor19, ligante de citocinas, con la cadena pesada de IgG gamma 1 (IgG γ 1) (ID. SEC. n° 14 e ID. SEC. n° 15), mientras que se fusiona la porción extracelular de la subunidad heterómera del receptor citocínico [por ejemplo, receptores citocínicos de clase II tales como, por ejemplo, las cadenas alfa y beta del interferón gamma y las cadenas alfa y beta del receptor del interferón alfa/beta, y los receptores zcytor11 (Patente de EE.UU. n° 5.965.704 comúnmente reconocida), CRF2-4, DIRS1 y zcytor7 (Patente de EE.UU. n° 5.945.511 comúnmente reconocida)] con una cadena ligera kappa humana (cadena ligera κ humana (ID. SEC. n° 16 e ID. SEC. n° 17)).

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

Se clona la cadena pesada de IgG γ 1 (ID. SEC. n° 14) en el vector de expresión de mamífero Zem229R (n° de depósito del ATCC: 69447) para que todo deseado dominio extracelular de receptor citocínico que tenga unos sitios 5' EcoRI y 3' NheI pueda ser clonado para dar lugar a una fusión de dominio extracelular N-terminal/IgG γ 1 C-terminal. El fragmento de IgG γ 1 utilizado en esta construcción se prepara usando la PCR para aislar la secuencia de IgG γ 1 a partir de un banco de cDNA de hígado fetal humano de Clontech como molde. Los productos de la PCR son purificados usando métodos aquí descritos y son digeridos con MluI y EcoRI (Boehringer-Mannheim), precipitados con etanol y ligados, con oligonucleótidos que comprenden un conector MluI/EcoRI, en Zem229R previamente digerido con MluI y EcoRI usando técnicas de biología molecular estándares aquí descritas.

Se clona la cadena ligera κ humana (ID. SEC. n° 16) en el vector de expresión de mamífero Zem228R (n° de depósito del ATCC: 69446) para que todo deseado dominio extracelular de receptor citocínico que tenga un sitio 5' EcoRI y un sitio 3' KpnI pueda ser clonado para dar lugar a una fusión de dominio extracelular citocínico N-terminal/cadena ligera κ humana C-terminal. Puesto que hay un sitio KpnI en la secuencia de la cadena ligera κ humana (escindida por la enzima KpnI después del nucleótido 62 de la ID. SEC. n° 16), se diseña un cebador especial para clonar el extremo 3' del dominio extracelular deseado de un receptor citocínico en este sitio KpnI. El cebador es diseñado para que el producto de PCR resultante contenga el deseado dominio extracelular de receptor citocínico con un segmento de la cadena ligera κ humana hasta el sitio KpnI (ID. SEC. n° 16). Este cebador comprende preferiblemente una porción de al menos 10 nucleótidos del extremo 3' del deseado dominio extracelular de receptor citocínico, fusionada en marco 5' con la ID. SEC. n° 16. El fragmento de cadena ligera κ humana usado en esta construcción se prepara usando una PCR para aislar la secuencia de la cadena ligera κ humana a partir del mismo banco de cDNA de hígado fetal humano de Clontech anteriormente usado. Los productos de la PCR son purificados usando métodos aquí descritos y son digeridos con MluI y EcoRI (Boehringer-Mannheim), precipitados con etanol y ligados, con el conector MluI/EcoRI anteriormente descrito, en Zem228R previamente digerido con MluI y EcoRI usando técnicas de biología molecular estándares aquí descritas.

B. Inserción de dominios extracelulares de receptor zcytor19 o subunidad heterodímera en construcciones vector de fusión

Usando los vectores de construcción anteriores, se prepara una construcción que tiene zcytor19 fusionado con IgG γ 1. Se realiza esta construcción sometiendo a PCR el dominio extracelular o el dominio ligante de citocinas del receptor zcytor19 aquí descrito procedente de un banco de cDNA de próstata (Clontech) o un banco de cDNA de linfocitos activados, usando métodos estándares y oligonucleótidos que proporcionan sitios de restricción EcoRI y NheI. El producto de PCR resultante es digerido con EcoRI y NheI, purificado en gel del modo aquí descrito, y ligado en el anteriormente descrito Zem229R/IgG γ 1 previamente digerido con EcoRI y NheI y purificado por formación de bandas. El vector resultante es secuenciado para confirmar que es correcta la fusión zcytor19/IgG gamma 1 (zcytor19/Ch1 IgG).

También se construye del modo anterior una construcción diferente que tiene un dominio extracelular de subunidad heterodímera de receptor citocínico, fusionado con cadena ligera κ . La construcción del receptor citocínico/cadena ligera κ humana se lleva a cabo del modo anterior realizando una PCR a partir de, por ejemplo, un banco de cDNA de linfocitos (Clontech) usando métodos estándares, y oligonucleótidos que proporcionan sitios de restricción EcoRI y KpnI. Se digiere el producto de PCR resultante con EcoRI y KpnI y luego se liga este producto en un anteriormente descrito vector Zem228R/cadena ligera κ humana previamente digerido con EcoRI y KpnI y purificado por formación de bandas. El vector resultante es secuenciado para confirmar que es correcta la fusión subunidad de receptor citocínico/cadena ligera κ humana.

C. Coexpresión del dominio extracelular de zcytor19 y de la subunidad heterodímera de receptor citocínico

Se cotransfectan células de mamífero, por ejemplo, células BHK-570 (ATCC n° CRL-10314), con aproximadamente 15 μ g de cada uno de los vectores anteriores usando el reactivo LipofectaminePlusTM (Gibco/BRL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionan en DMEM + FBS al 5% (Gibco/BRL) que contiene metotrexato (MTX) 1 μ M (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y 0,5 mg/ml de G418 (Gibco/BRL) durante 10 días. La resultante colección de transfectantes es seleccionada de nuevo en MTX 10 μ M y 0,5 mg/ml de G418 durante 10 días.

La resultante colección de células doblemente seleccionadas se usa para generar proteína. Se usan tres Factorías (Nunc, Dinamarca) de esta colección para generar 10 l de medio acondicionado exento de suero. Se hace pasar el medio acondicionado por una columna de 1 ml de proteína A y se realiza la elución en fracciones de aproximadamente 10.750 microlitros. Las fracciones que tienen la máxima concentración de proteína son reunidas y son dializadas (corte de pesos moleculares de 10 kDa) frente a PBS. Finalmente, el material dializado es sometido a un análisis de aminoácidos (AAA) usando métodos rutinarios.

Ejemplo 8

Reconstitución del receptor zcytor19 in vitro

Para identificar los componentes implicados en el complejo de señalización de zcytor19, se llevan a cabo estudios sobre reconstitución del receptor del modo siguiente. Por ejemplo, células BHK 570 (ATCC n° CRL-10314) transfectadas, usando métodos estándares aquí descritos, con un plásmido vector de expresión de mamífero con informador de luciferasa sirven como una línea celular de bioensayo para medir la respuesta de transducción de señales de un complejo de receptor zcytor19 transfectado al informador de luciferasa en presencia de ligando de zcytor19. Se usarían células BaF3 en el caso de que las células BHK no expresaran endógenamente el receptor zcytor19. Se pueden usar otras líneas celulares. Un vector de expresión de mamífero con informador de luciferasa ejemplar es el plásmido KZ134, que está construido con oligonucleótidos complementarios que contienen elementos ligantes del factor de transcripción STAT procedentes de 4 genes: un elemento inducible por Sis de c-fos modificado (m67SIE o hSIE) (H. Sadowski *et al.*, Science 261: 1739-1744, 1993), el p21 SIE1 del gen p21 WAF1 (Y. Chin *et al.*, Science 272: 719-722, 1996), el elemento de respuesta a glándula mamaria del gen de la β -caseína (M. Schmitt-Ney *et al.*, Mol. Cell. Biol. 11: 3745-3755, 1991) y un elemento, inducible por STAT, del gen Fcg RI (H. Seidel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995). Estos oligonucleótidos contienen extremos compatibles con Asp718-XhoI y son ligados, usando métodos estándares, en un vector aceptor informador de luciferasa de luciérnaga con un promotor de c-Fos (L. K. Poulsen *et al.*, J. Biol. Chem. 273: 6229-6232, 1998) digerido con las mismas enzimas y que contiene un marcador seleccionable para neomicina. El plásmido KZ134 es utilizado para transfectar establemente células BHK o BaF3, usando métodos de transfección y selección estándares, para generar una línea celular BHK/KZ134 o BaF3/KZ134, respectivamente.

La línea celular de bioensayo es transfectada con el receptor zcytor19 solo o es cotransfectada con el receptor zcytor19 junto con una subunidad de otras diversas subunidades de receptor conocidas. Los complejos de receptor incluyen, pero no se limitan a, el receptor zcytor19 solo y diversas combinaciones del receptor zcytor19 con receptores citocínicos de clase II, tales como, por ejemplo, las cadenas alfa y beta del interferón gamma y las cadenas alfa y beta del receptor del interferón alfa/beta, y los receptores zcytor11 (Patente de EE.UU. n° 5.965.704 comúnmente reconocida), CRF2-4, DIRS1 y zcytor7 (Patente de EE.UU. n° 5.945.511 comúnmente reconocida). Luego se examina

cada línea celular con complejo de receptor independiente en presencia de medio acondicionado con citocinas o de citocinas purificadas y se mide la actividad luciferasa usando métodos rutinarios. La línea celular de bioensayo no transfectada sirve como un testigo para la actividad luciferasa de fondo y, por lo tanto, se usa como una línea de base para comparar las señalizaciones por las diversas combinaciones del complejo de receptor. Se espera que el medio acondicionado o la citocina que se une con el receptor zcytor19 en presencia del complejo de receptor correcto proporcione una lectura de luciferasa aproximadamente 5 órdenes de magnitud mayor que el fondo o más.

Como una alternativa, se puede llevar a cabo un ensayo similar en el que se cotransfecta una línea celular BaF3/zcytor19 del modo aquí descrito y se mide la proliferación usando un ensayo conocido tal como un ensayo de proliferación estándar con Alamar Blue.

Ejemplo 9

Transfección de células COS y trampa de secreción

Se puede utilizar un ensayo de trampa de secreción para identificar el ligando del receptor zcytor19. Puesto que zcytor19 es un receptor citocínico de clase II, se examinó la unión de la proteína de fusión zcytor19sR/Fc4 con citocinas conocidas o huérfanas. Utilizando el ensayo de trampa de secreción descrito más adelante, se transfectan células COS con los vectores de expresión pZP7 que contienen cDNAs de citocinas (incluyendo, entre otros, IL-TIF, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma e IL-10 humanos) y se determina la unión de zcytor19sR/Fc4 con las células COS transfectadas. Una unión positiva en este ensayo muestra posibles parejas de receptor zcytor19-ligando.

A. Transfecciones de células COS

La transfección de las células COS se llevó a cabo de la manera siguiente: se mezclan 0,75 µg de DNA de citocina en 50 µl de medio DMEM exento de suero [55 mg de piruvato sódico, 146 mg de L-glutamina, 5 mg de transferrina, 2,5 mg de insulina, 1 µg de selenio y 5 mg de fetuina en 500 ml de DMEM (Gibco/BRL)], con 5 µl de Lipofectamine™ y 45 µl de medio DMEM exento de suero. Se incuba la mezcla a temperatura ambiental durante 30 minutos y luego se añaden 400 µl de medio DMEM exento de suero. Se añade esta mezcla de 500 µl a 1,5x10⁵ células COS/pocillo sembradas en una placa para cultivo tisular de 12 pocillos, y se incuba durante 5 horas a 37°C. Se añaden 500 µl de medio DMEM con FBS al 20% (100 ml de FBS, 55 mg de piruvato sódico y 146 mg de L-glutamina en 500 ml de DMEM) y se incuba durante la noche.

B. Ensayo de la trampa de secreción

Se llevó a cabo la trampa de secreción del modo siguiente: Se separaron las células de los medios mediante enjuague con PBS y luego se fijaron durante 15 minutos con formaldehído al 1,8% en PBS. Las células fueron lavadas 2 veces con TNT (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y Tween-20 al 0,05% en H₂O), permeabilizadas con Triton-X al 0,1% en PBS durante 15 minutos y lavadas 3 veces con TNT. Las células fueron bloqueadas durante 1 hora con TNB [Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y reactivo bloqueante al 0,5% (kit NEN Renaissance TSA-Direct) en H₂O]. Las células fueron incubadas durante 1 hora con 1 µg/ml, 0,5 µg/ml o 0,25 µg/ml de la proteína de fusión de receptor zcytor19 soluble/Fc4 (Ejemplo 10) en TNB. Las células fueron lavadas 3 veces con TNT y fueron incubadas durante otra hora con anti-Ig humana generada en cabra-HRP (específica para Fcγ) (Jackson ImmunoResearch), diluida 1:1000, en TNB. Las células fueron de nuevo lavadas con TNT.

La unión positiva se detectó con el reactivo fluoresceína-tiramida, diluido 1:50 en tampón de dilución (kit de NEN), realizándose una incubación durante 4,5 minutos y un lavado con TNT. Las células se conservaron con Vectashield Mounting Media (Vector Labs, Burlingame, California, EE.UU.) diluido 1:5 en TNT. Se visualizaron las células usando un filtro para FITC en un microscopio de fluorescencia.

Puesto que zcytor19 es un receptor citocínico de clase II, se examina la unión de la proteína de fusión zcytor19sR/Fc4 con citocinas conocidas o huérfanas. Utilizando el ensayo de trampa de secreción anteriormente descrito, se transfectan células COS con los vectores de expresión pZP7 que contienen cDNAs de citocinas (incluyendo, entre otros, IL-TIF, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma e IL-10 humanos) y se determina la unión de zcytor19sR/Fc4 con las células COS transfectadas. Una unión positiva en este ensayo muestra posibles parejas de receptor zcytor19-ligando.

Ejemplo 10

Expresión de zcytor19 humano en E. coli

5 A. Construcción del vector de expresión pTAP170/zcytor19 por fusión zcytor19-MBP

Se construyó, por medio de recombinación homóloga, un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codificaba parte del zcytor19 humano N-terminalmente fusionado con la proteína ligante de maltosa (MBP; del inglés, maltose binding protein). Se aisló un fragmento del cDNA de zcytor19 humano (ID. SEC. n° 1) usando una PCR. Se usaron dos cebadores en la producción del fragmento de zcytor19 humano en una reacción PCR: (1) el cebador ZC39204 (ID. SEC. n° 30), que contenía 40 bp de la secuencia flanqueadora del vector y 24 bp correspondientes al extremo amínico del zcytor19 humano, y (2) el cebador ZC39205 (ID. SEC. n° 31), que contenía 40 bp del extremo 3' correspondiente a la secuencia vector flanqueadora y 24 bp correspondientes al extremo carboxílico del zcytor19 humano. Las condiciones de la reacción PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 94°C durante 1 minuto y luego 20 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1,5 minutos, seguidos de un empapamiento a 4°C, llevándose la reacción a cabo por duplicado. Se desarrollaron 5 µl de cada 100 µl de mezcla de reacción PCR en un gel de agarosa al 1,0% con tampón TBE 1x para el análisis y se vio la esperada banda del fragmento de aproximadamente 700 bp. Los restantes 95 µl de la mezcla de reacción PCR fueron combinados con el segundo tubo de PCR, precipitados con 400 µl de etanol absoluto y resuspendidos en 10 µl de agua para ser usados para recombinación en el vector aceptor pTAP170 cortado con SmaI, para producir la construcción que codificaba la fusión MBP-zcytor19 humano, como se describe más adelante.

El plásmido pTAP170 procedía de los plásmidos pRS316 y pMAL-c2. El plásmido pRS316 es un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae* (P. Hieter y R. Sikorski, Genetics 122: 19-27, 1989). pMAL-C2 (NEB) es un plásmido de expresión de *E. coli*. Lleva el promotor *tac* que conduce *MalE* (el gen que codifica MBP), seguido de una etiqueta de His, un sitio de escisión por trombina, un sitio de clonación y el terminador *rrnB*. El vector pTAP170 se construyó utilizando recombinación homóloga en levadura. Se recombinaron 100 ng de pMAL-c2 cortado con EcoRI, con 1 µg de pRS316 cortado con PvuI, 1 µg de conector y 1 µg de pRS316 cortado con ScaI/EcoRI. El conector consistía en los oligonucleótidos ZC19.372 (100 picomoles), ZC19.351 (1 picomol), ZC19.352 (1 picomol) y ZC19.371 (100 picomoles) combinados en una reacción PCR. Las condiciones fueron las siguientes: 10 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos; seguidos de un empapamiento a 4°C. Los productos de la PCR fueron concentrados por medio de precipitación con etanol al 100%.

Se combinaron cien microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con 10 µl de una mezcla que contenía aproximadamente 1 µg del inserto de zcytor19 humano, y 100 ng de vector pTAP170 digerido con SmaI, y se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/DNA fue electropulsada a 0,75 kV (5kV/cm), infinitos ohmios, 25 µF. Se añadieron 600 µl de sorbitol 1,2 M a cada cubeta. Luego se sembró la levadura en dos partes alícuotas de 300 µl en dos placas URA D, y se realizó una incubación a 30°C.

Después de aproximadamente 48 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una sola placa fueron resuspendidos en 1 ml de H₂O y fueron brevemente centrifugados para recoger las células de levadura en forma de sedimento. El sedimento celular fue resuspendido en 1 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH de 8,0, EDTA 1 mM). Se añadieron quinientos microlitros de la mezcla de lisis a un tubo Eppendorf que contenía 300 µl de glóbulos de vidrio lavados con ácido y 500 µl de fenol-cloroformo y se realizaron dos o tres removimientos durante intervalos de 1 minuto, lo que fue seguido de una centrifugación de 5 minutos en una centrífuga Eppendorf a la máxima velocidad. Se transfirieron trescientos microlitros de la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipitó el DNA con 600 µl de etanol (EtOH), lo que fue seguido de una centrifugación a 4°C durante 10 minutos. El sedimento de DNA fue resuspendido en 100 µl de H₂O.

La transformación de células electrocompetentes de *E. coli* (MC1061; Casadaban *et al.*, *J. Mol. Biol.* 138: 179-207) se realizó con 1 µl de preparación de DNA de levadura y 40 µl de células MC1061. Las células fueron electropulsadas a 2,0 kV, 25 mF y 400 ohmios. Después de la electroporación, se añadieron 0,6 ml de SOC [triptona Bacto™ (Difco, Detroit, Michigan, EE.UU.) al 2%, extracto de levadura (Difco) al 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM] a las células. Después de una incubación durante una hora a 37°C, se sembró una parte alícuota de las células en placas LB Kan [caldo LB (Lennox), agar Bacto™ (Difco) al 1,8%, 30 mg/l de kanamicina].

Los clones individuales que llevaban la construcción de expresión correcta para zcytor19 humano fueron identificados por expresión. Se cultivaron las células en Superbroth II (Becton Dickinson) con 30 µg/ml de kanamicina durante la noche. Se usaron 50 µl del cultivo nocturno para inocular 2 ml de Superbroth II fresco + 30 µg/ml de kanamicina. Se desarrollaron los cultivos a 37°C, sacudiendo durante 2 horas. Se realizó la inducción de 1 ml del cultivo con IPTG 1 mM. 2-4 horas más tarde, se mezclaron los 250 µl de cada cultivo con 250 µl de tampón Thorner con β-ME al 5% y colorante (urea 8 M, Tris 100 mM, pH de 7,0, glicerol al 10%, EDTA 2 mM, SDS al 5%). Se hirvieron las muestras durante 5-10 minutos. Se cargaron 20 µl por carril en un gel de PAGE al 4%-12% (NOVEX). Se desarrollaron los geles en tampón de MES 1x. Los clones positivos fueron denominados pTAP317 y fueron sometidos al análisis de sus secuencias. La secuencia polinucleotídica de la fusión MBP-zcytor19 en pTAP317 se muestra en la ID. SEC. n° 32, y la correspondiente secuencia polipeptídica de la fusión MBP-zcytor19 se muestra en la ID. SEC. n° 33.

B. *Expresión bacteriana de zcytor19 humano*

Se sometieron diez microlitros de DNA de secuenciación a digestión con NotI (NEB) en la mezcla de reacción siguiente para separar el plásmido CEN-ARS: 10 μ l de DNA, 3 μ l de tampón 3 (NEB), 15 μ l de agua y 2 μ l de NotI (10 U/ μ l, NEB) a 37°C durante una hora. Se mezclaron luego 7 μ l del producto de digestión con 2 μ l de tampón 5x y DNA ligasa de T4 (1 U/ μ l, BRL). Se incubó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante una hora. Se transformó la cepa W3110 (ATCC) de *E. coli* con un microlitro de la mezcla de reacción. Las células fueron electropulsadas a 2,0 kV, 25 μ F y 400 ohmios. Después de la electroporación, se añadieron 0,6 ml de SOC [triptona Bacto™ (Difco, Detroit, Michigan, EE.UU.) al 2%, extracto de levadura (Difco) al 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM] a las células. Después de una incubación durante una hora a 37°C, se sembró una parte alícuota de las células en placas LB Kan [caldo LB (Lennox), agar Bacto™ (Difco) al 1,8%, 30 mg/l de kanamicina]. Se analizaron los productos de digestión diagnósticos de los clones individuales en cuanto a la ausencia de marcador de levadura y secuencia de replicación.

Se usó un clon positivo para inocular un cultivo nocturno de arranque de Superbroth II (Becton Dickinson) con 30 μ g/ml de kanamicina. Se usó el cultivo de arranque para inocular a 4 matraces de 2 litros de capacidad con elementos desviadores, cada uno de ellos lleno con 500 ml de Superbroth II + Kan. Se sacudieron los cultivos a 37°C y 250 rpm hasta que la DO₆₀₀ alcanzó un valor de 4,1. En este momento, se sometieron los cultivos a inducción con IPTG 1 mM. Se desarrollaron los cultivos durante dos horas más a 37°C y 250 rpm, momento en que se guardaron 2 ml para análisis y se recogió el resto por medio de centrifugación. El sedimento fue guardado a -80°C hasta su transferencia para purificación de proteínas.

Ejemplo 11

Esquema de purificación para la fusión zcytor19-Fc4

A menos que se indique otra cosa, todos los procedimientos se llevan a cabo a 4°C. El medio acondicionado fue primero concentrado 20 veces usando un cartucho Spiral de Amicon/Millipore con un corte de pesos moleculares de 10 kDa (a temperatura ambiental). Luego se aplicó el medio acondicionado a una columna POROS 50 A (con proteína A copulada) de tamaño apropiado, con un caudal de captura óptimo. La columna fue lavada con 10 volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrio, realizándose luego rápidamente la elución con 3 VC de glicocola 0,1 M, pH de 3. Para neutralizar el pH a aproximadamente 7,2, las fracciones recogidas tenían un volumen predeterminado de Tris 2 M, pH de 8,0, añadido antes de la elución.

Para analizar la elución, se desarrollaron geles NuPAGE teñidos con Brilliant Blue (Sigma). Las fracciones de interés fueron reunidas y fueron concentradas hasta un valor nominal usando un concentrador centrífugo con un corte de pesos moleculares de 30 kDa. La colección concentrada mediante proteína A fue inyectada en una columna Pharmacia Sephacryl 200 de tamaño apropiado, para eliminar los agregados y para cambiar el tampón de la proteína a PBS, pH de 7,3, y se usaron de nuevo geles NuPAGE teñidos con Brilliant Blue (Sigma) para analizar la elución. Se reunieron las fracciones. Se desarrollaron geles NuPAGE teñidos con Brilliant Blue (Sigma) y Western para confirmar la pureza y el contenido. Para un análisis ulterior, la proteína fue sometida a AAA y secuenciación N-terminal. El AAA y la secuenciación N-terminal verificaron el polipéptido zcytor19-Fc; la secuencia de aminoácidos N-terminal era la esperada: SRPRL APPQX VTLLS QNFSV (ID. SEC. n° 34).

Ejemplo 12

Expresión de zcytor19 humano basada en el análisis, por RT-PCR, de grupos de cDNA de primera cadena de múltiples fracciones tisulares y sanguíneas

Se examinó la expresión génica de zcytor19 utilizando grupos normalizados comercialmente asequibles de cDNA de primera cadena de múltiples tejidos (OriGene Technologies, Inc., Rockville, Maryland, EE.UU.; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, California, EE.UU.). Estos incluían el grupo OriGene's Human Tissue Rapid-Scan™ (que contiene 24 tejidos diferentes) y los siguientes grupos de cDNA de múltiples tejidos (MTC™; del inglés, multiple tissue cDNA) de BD Biosciences Clontech: grupo I de MTC humano (que contiene 8 tejidos adultos diferentes), grupo II de MTC humano (que contiene 8 tejidos adultos diferentes), grupo de MTC fetal humano (que contiene 8 tejidos fetales diferentes), grupo de MTC de tumores humanos (que contiene carcinomas de 7 órganos diferentes), grupo de MTC de fracciones sanguíneas humanas (que contiene 9 fracciones sanguíneas diferentes) y grupo de MTC de sistema inmune humano (que contiene 6 órganos diferentes y leucocitos de sangre periférica).

Se prepararon reacciones PCR usando los cebadores oligonucleotídicos ZC40285 (ID. SEC. n° 35) y ZC40286 (ID. SEC. n° 36) específicos para zcytor19, que proporcionaban un producto de 426 bp, DNA polimerasa Qiagen HotStarTaq (Qiagen, Valencia, California, EE.UU.) y colorante RediLoad™ (Research Genetics, Inc., Huntsville, Alabama, EE.UU.). Las condiciones del termociclador para PCR fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de 15 minutos de desnaturalización a 95°C, 35 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de hibridación a 63°C y 1 minuto y 15 segundos de extensión a 72°C, seguidos de 1 ciclo final de extensión de 7 minutos a 72°C. Los productos de reacción fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (EM Science, Gibbstown, New Jersey, EE.UU.) y fueron visualizados mediante tinción con bromuro de etidio.

Se observó un fragmento de DNA con el tamaño correcto en los siguientes tejidos adultos humanos: glándula adrenal, médula ósea, colon, corazón, hígado, pulmón, ganglio linfático, músculo, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, intestino delgado, bazo, estómago, testículo, tiroides y amígdala. Se observó un fragmento de DNA con el tamaño correcto en los siguientes tejidos fetales humanos: corazón, hígado, pulmón, riñón, músculo esquelético, bazo y timo. Se observó un fragmento de DNA con el tamaño correcto en las siguientes fracciones sanguíneas humanas: leucocitos de sangre periférica, células mononucleares (células B, células T y monocitos), células CD8+ en reposo (T supresoras/citotóxicas), células CD19+ en reposo (células B), células CD19+ activadas, células mononucleares activadas y células CD4+ activadas. Se observó un fragmento de DNA con el tamaño correcto en los siguientes tejidos tumorales: carcinoma de mama, adenocarcinoma de colon, carcinoma de pulmón, carcinoma ovárico, adenocarcinoma pancreático y adenocarcinoma prostático.

Puesto que se expresa zcytor19 en estos tejidos tumorales específicos, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos zcytor19 pueden ser utilizados como marcadores tumorales, como aquí se describe. Además, un anticuerpo contra zcytor19 podría tener actividad antitumoral, así como los productos de conjugación de toxinas, productos de conjugación de citocinas u otros productos de conjugación de un anticuerpo, o el propio ligando del receptor zcytor19. Los antagonistas del ligando de zcytor19, tales como anticuerpos anti-zcytor19 y receptores solubles, también pueden actuar como reactivos antitumorales.

Ejemplo 13

Generación y análisis de ratones con zcytor19 KO

A. Identificación de clones de BAC positivos para el gen zcytor19 de ratón

Se identificó un clon de BAC positivo para el gen zcytor19 de ratón usando colecciones de DNA Easy-to-Screen, BAC Mouse ES (Emisión I), de Incyte Genomics (St. Louis, Missouri, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se diseñaron oligonucleótidos para generar un fragmento de PCR que contuviera secuencias parcial del exón 6, completa del intrón 6 y parcial del exón 7.

Se llevaron a cabo reacciones PCR en 25 μ l usando 1,75 unidades de polimerasa Advantage 2 (Clontech). Como molde se usaron 2 μ l o 10 μ l de DNA del banco de BACs en un tampón que contenía Tris 67 mM, pH de 8,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16,6 mM, MgCl_2 6,7 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, 100 μ g/ml de gelatina, dimetilsulfóxido al 10%, desoxinucleótidos 1 mM, el cebador directo ZC39128 (ID. SEC. n° 37) 140 nM y el cebador inverso ZC39129 (ID. SEC. n° 38) 140 nM. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95°C durante 1 minuto; 30 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos; y 68°C durante 2 minutos; seguidos de un mantenimiento a 4°C. Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Se halló que los productos positivos de la PCR tenían 1149 bp.

Usando el conjunto de filtros BAC Mouse Filter Set (Emisión II) de Incyte según las instrucciones del fabricante, se identificaron cuatro clones de BAC adicionales positivos para el gen zcytor19 de ratón. Se diseñaron oligonucleótidos para generar un fragmento de PCR que contuviera secuencias parcial del exón 6 y parcial del exón 7 a partir del molde de cDNA de ratón.

Se llevaron a cabo reacciones PCR en 25 μ l usando 1,75 unidades de polimerasa Advantage 2 (Clontech). Como molde se usaron 2 μ l del banco de cDNA de piel de ratón neonatal (JAK 062700B) en un tampón que contenía Tris 67 mM, pH de 8,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16,6 mM, MgCl_2 6,7 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, 100 μ g/ml de gelatina, dimetilsulfóxido al 10%, desoxinucleótidos 1 mM, el cebador directo ZC39128 (ID. SEC. n° 37) 140 nM y el cebador inverso ZC39129 (ID. SEC. n° 38) 140 nM. Las condiciones de la PCR fueron como las anteriormente descritas. Los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa y purificados usando el kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen). El fragmento de DNA aislado, de aproximadamente 400 bp, fue marcado usando el kit Prime-It II (Stratagene) para marcación aleatoria de cebadores y fue purificado usando columnas MicroSpin S-200HR (Amersham Pharmacia).

La sonda marcada fue usada para explorar un conjunto de bancos de BAC de 7 filtros de Incyte. Las hibridaciones se llevaron a cabo a 55°C durante la noche usando ExpressHyb (Clontech). Los filtros fueron luego lavados 3 veces durante 30 minutos a 50°C con SSC 0,1x, SDS al 0,1%, sometidos durante la noche a autorradiografía y comparados con patrones de retículos del fabricante para identificar los clones positivos.

B. Caracterización de BACs positivos para zcytor19 de ratón

Se obtuvieron cinco clones de BAC positivos para zcytor19 de ratón a partir de bancos de células madre embrionarias de ratones 129/SvJ (Emisiones I y II) de Incyte Genomics. Los clones de BAC fueron desarrollados en la cepa huésped DH10B de *Escherichia coli* en medio líquido y fueron extraídos usando el kit MKB-500 para purificación de plásmidos grandes de BAC (Incyte Genomics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se halló que 4 de los 5 BACs contenían al menos 2000 bp de región 5' no traducida, exón 1 y exón 5, según se determinó por PCR. Se usaron como molde 100 ng de cada DNA de BAC, utilizando las condiciones siguientes: se llevaron a cabo reacciones

PCR en 25 μ l usando 1,75 unidades de polimerasa Advantage 2 (Clontech) en un tampón que contenía Tris 67 mM, pH de 8,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16,6 mM, MgCl_2 6,7 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gelatina, dimetilsulfóxido al 10%, desoxinucleótidos 1 mM, cebador directo 140 nM y cebador inverso 140 nM. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95°C durante 1 minuto; 30 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos; y 68°C durante 2 minutos; seguidos de un mantenimiento a 4°C. Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Utilizando el cebador directo ZC40784 (ID. SEC. n° 39) y el cebador inverso ZC40785 (ID. SEC. n° 40), se multiplicó la región no traducida (UTR; del inglés, *untranslated region*) 5' parcial y se halló que tenía 957 bp. Utilizando el cebador directo ZC40786 (ID. SEC. n° 41) y el cebador inverso ZC40787 (ID. SEC. n° 42), se multiplicó la 5' UTR parcial, el exón 1 completo y el intrón 1 parcial y se halló que tenían aproximadamente 950 bp. Utilizando el cebador directo ZC39128 (ID. SEC. n° 37) y el cebador inverso ZC39129 (ID. SEC. n° 38), se multiplicó una secuencia que contenía el exón 6 parcial, el intrón 6 completo y el exón 7 parcial y se halló que tenía aproximadamente 1149 bp.

Mediante un análisis por transferencia Southern, se halló que 4 de los 5 clones de BAC contenían al menos 3796 bp de 5' UTR y al menos 6922 bp de 3' UTR. Se marcaron terminalmente los oligonucleótidos ZC40784 (ID. SEC. n° 39) y ZC39129 (ID. SEC. n° 38) usando polinucleótido cinasa de T4 (Roche), y se utilizaron para sondear transferencias Southern que contenían 5 BACs candidatos digeridos con las endonucleasas de restricción EcoRI (Life Technologies) y XbaI (New England Biolabs). Los resultados indicaron que 4 de los 5 BACs contenían al menos 3796 bp de 5' UTR, y 5 de los 5 BACs contenían al menos 6922 bp de 3' UTR.

C. Determinación de la secuencia del intrón 6 de *zcyltor19* de ratón

Se diseñaron oligonucleótidos para generar un fragmento de PCR que contuviera secuencias parcial del exón 6, completa del intrón 6 y parcial del exón 7.

Se llevaron a cabo reacciones PCR en 25 μ l usando 1,75 unidades de polimerasa Advantage 2 (Clontech). Como molde se usaron 100 ng de DNA genómico de ratón 129/Sv en un tampón que contenía Tris 67 mM, pH de 8,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16,6 mM, MgCl_2 6,7 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gelatina, dimetilsulfóxido al 10%, desoxinucleótidos 1 mM, el cebador directo ZC39128 (ID. SEC. n° 37) 140 nM y el cebador inverso ZC39129 (ID. SEC. n° 38) 140 nM. Las condiciones de la PCR fueron como las anteriormente descritas. Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y se halló que tenían 1149 bp. Los productos de la PCR fueron luego purificados usando el kit de purificación QiaQuick para PCR (Qiagen). Se realizó la determinación de la secuencia del intrón 6 mediante análisis de secuencias usando los oligonucleótidos ZC39128 (ID. SEC. n° 37) y ZC39129 (ID. SEC. n° 38).

D. Determinación de la secuencia del intrón 5 de *zcyltor19* de ratón

Se diseñaron oligonucleótidos para generar un fragmento de PCR que contuviera el exón 5 parcial, el intrón 5 completo y el exón 6 parcial. Se llevaron a cabo reacciones PCR en 25 μ l usando 1,75 unidades de polimerasa Advantage 2 (Clontech). Como molde se usaron 100 ng de DNA genómico de ratón 129/Sv en un tampón que contenía Tris 67 mM, pH de 8,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16,6 mM, MgCl_2 6,7 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gelatina, dimetilsulfóxido al 10%, desoxinucleótidos 1 mM, el cebador directo ZC39408 (ID. SEC. n° 43) 140 nM y el cebador inverso ZC39409 (ID. SEC. n° 44) 140 nM. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95°C durante 1 minuto; 30 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos; y 68°C durante 2 minutos; seguidos de un mantenimiento a 4°C. Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y se halló que tenían 356 bp. Los productos de la PCR fueron luego purificados usando el kit de purificación QiaQuick para PCR (Qiagen). Se realizó la determinación de la secuencia del intrón 6 mediante análisis de secuencias usando los oligonucleótidos ZC39408 (ID. SEC. n° 43) y ZC39409 (ID. SEC. n° 44).

E. Diseño de oligonucleótidos para la generación de construcciones KO del gen *zcyltor19* de ratón

Para investigar la función biológica del gen *zcyltor19*, se genera un modelo de ratón inoperante mediante tecnología de recombinación homóloga en células madre embrionarias (ES; del inglés, *embryonic stem cells*). En este modelo, se suprimen los exones de codificación 1, 2 y 3 para crear una mutación nula del gen *zcyltor19*. Esta delección elimina el codón de iniciación de la traducción, el dominio de señalización y parte del dominio extracelular de la proteína *zcyltor19*, inactivando de este modo el gen *zcyltor19*.

Se utilizará la técnica de clonación ET para generar el vector KO (Stewart *et al.*, Nucl. Acids Res. 27: 6, 1999). En primer lugar, se usa el casete de resistencia a kanamicina para sustituir los intrones 1, 2 y 3 del gen *zcyltor19* de ratón. Se diseñó un oligonucleótido directo inoperante (ID. SEC. n° 45) para que tuviera una longitud de 121 nucleótidos, que tenía 52 bp de homología con respecto a la 5' UTR de *zcyltor19m*, un conector de 42 bp que tenía sitios de restricción SfiI, FseI, BamHI e HindIII, y 27 bp de homología con respecto al extremo 5' del casete de resistencia a kanamicina. Se diseñó un oligonucleótido inverso inoperante (ID. SEC. n° 46) para que tuviera una longitud de 125 nucleótidos, que tenía 50 bp de homología con respecto al intrón 3 del *zcyltor19* de ratón, un conector de 48 bp que tenía sitios de restricción SfiI, AscI, BamHI e HindIII, y 27 bp de homología con respecto al extremo 3' del casete de resistencia a

kanamicina. Los oligonucleótidos anteriores pueden ser usados para sintetizar un fragmento de PCR, de 1073 bp de longitud, que contiene el casete de resistencia a kanamicina completo, teniendo los primeros 52 bp una homología con respecto a la 5' UTR de *zcyltor19* de ratón y teniendo los últimos 50 bp una homología con respecto al intrón 3.

5 Luego se utilizará el fragmento para construir un vector inoperante por medio de clonación ET, con la que células huésped con BACs positivos para *zcyltor19* de ratón son hechas competentes mediante tratamiento con glicerol y son luego transfectadas con el plásmido pBADalpha/beta/gamma(Amp). La resistencia a cloranfenicol y ampicilina permite seleccionar la célula transformada. Las células son luego transformadas de nuevo con el fragmento de PCR para kanamicina, que contiene brazos de homología. Se inducen las proteínas de recombinación beta y gamma de 10 pBADalpha/beta/gamma(Amp) mediante la adición de arabinosa al medio de crecimiento, a través de la activación del gen Red alfa. Se seleccionan BACs recombinantes mediante la resistencia a kanamicina y ampicilina y luego se exploran por PCR. Una vez que se ha identificado un BAC recombinante, se subclona en un vector derivado de pGEM7 un fragmento que contiene al menos 1800 bp de una secuencia cadena arriba de la inserción del casete de resistencia a kanamicina y al menos 6000 bp de una secuencia cadena abajo. El casete de resistencia a kanamicina 15 es luego sustituido por un casete IRES/LacZ/Neo-MC1 mediante una clonación con ligación estándar. La IRES (del inglés, internal ribosome entry sequence) es una secuencia interna de entrada al ribosoma, procedente del virus de la encefalomiocarditis. Está fusionada en marco con el gen lacZ informador, ligado a una señal de poliA. Cadena abajo del gen informador LacZ/IRES, el promotor de MC1 conduce la expresión de un marcador seleccionable de resistencia a G418, el gen Neo. El casete del marcador seleccionable contiene codones de terminación en los tres marcos de 20 lectura. De esta forma, el gen Neo de resistencia a fármacos se usa para la selección de procesos de recombinación homóloga en células madre embrionarias (ES). Se usará el gen informador LacZ/IRES para determinar la expresión del gen sustituido después de la recombinación homóloga. La recombinación homóloga del vector inoperante y el locus diana en células ES conduce a la sustitución de un total de 17.980 bp, incluyendo los exones 1, 2 y 3 completos, del locus de tipo silvestre por el casete IRES/LacZ/Neo-MC1, que tiene una longitud de aproximadamente 5200 bp.

F. Generación de ratones con *zcyltor19* KO

El vector KO anteriormente descrito es linealizado por digestión con PmeI e introducido por electroporación en 30 células ES. Se identifican procesos de recombinación homóloga mediante una estrategia de exploración por PCR y se confirman mediante análisis por transferencia Southern usando un protocolo KO estándar. Véase A. L. Joyner, "Gene Targeting. A Practical Approach", IRL Press, 1993.

Una vez que se han identificado los procesos de recombinación homóloga, se multiplican las células ES y se inyectan en blastocistos para generar quimeras. Los machos quiméricos se utilizarán para reproducirse con hembras C57 35 negras y conseguir la transmisión de la mutación nula a la línea germinal, de acuerdo con procedimientos estándares. Véase B. Hogan *et al.*, "Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

40 Se criarán animales KO heterocigotos para examinar las funciones biológicas del gen *zcyltor19*. De la descendencia producida, ¼ debería ser de tipo silvestre, ½ debería ser heterocigota y ¼ debería ser homocigota. Los homocigotos se analizarán con detalle del modo descrito más adelante.

45 G. Evaluación microscópica de tejidos de animales homocigotos para *zcyltor19*

Puesto que *zcyltor19* se expresa en los tejidos siguientes, se examinarán cuidadosamente estos tejidos: colon, ovario, 50 placenta, hipófisis, ganglio linfático, intestino delgado, glándula salival, recto, próstata, testículo, cerebro, pulmón, riñón, tiroides, médula espinal, médula ósea y cuello uterino.

Se recogen el bazo, el timo y ganglios linfáticos mesentéricos de animales transgénicos que expresan *zcyltor19*, y se preparan para un examen histológico. Otros tejidos que se recogen rutinariamente incluían los siguientes: hígado, corazón, pulmón, bazo, timo, ganglios linfáticos mesentéricos, riñón, piel, glándula mamaria, páncreas, estómago, intestinos delgado y grueso, cerebro, glándula salival, tráquea, esófago, glándula adrenal, hipófisis, tracto reproductor, 55 glándulas sexuales accesorias del macho, músculo esquelético incluyendo el nervio periférico, y fémur con médula ósea. Los tejidos son recogidos de animales homocigotos así como de testigos de tipo silvestre. Las muestras son fijadas en formol tamponado al 10%, procesadas rutinariamente, embebidas en parafina, seccionadas en un tamaño de 5 µm y teñidas con hematoxilina y eosina. Los portaobjetos son examinados en cuanto a cambios histológicos y patológicos, tales como reacciones inflamatorias, y a la hipoproliferación de ciertos tipos celulares.

H. Análisis citométrico de flujo de tejidos procedentes de mutantes homocigotos de ratón que carecen de *zcyltor19*

65 Para el análisis citométrico de flujo de sangre periférica, timo, ganglio linfático, médula ósea y bazo, se sacrifican animales homocigotos que carecen del gen *zcyltor19*. Se preparan suspensiones celulares a partir de bazo, timo y ganglios linfáticos rasgando el órgano con fórceps en un medio de cultivo enfriado con hielo [500 ml de medio RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas, EE.UU.); 5 ml de L-glutamina 100x (Gibco BRL, Grand Island, New York, EE.UU.); 5 ml de piruvato sódico 100x (Gibco BRL); 5 ml de penicilina, estreptomycin y neomicina

(PSN) 100x (Gibco BRL)] y presionando suavemente las células contra un tamiz celular (Falcon, VWR, Seattle, Washington, EE.UU.). Se recoge sangre periférica (200 ml) en tubos con heparina y se diluye hasta 10 ml con HBSS que contiene 10 U de heparina/ml. Se eliminan los eritrocitos de las preparaciones de bazo y sangre periférica mediante lisis hipotónica. Se preparan suspensiones celulares de médula ósea sacando la médula de los fémures con un medio de cultivo enfriado con hielo. Se cuentan las células y se examina su viabilidad usando azul de tripano (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Se resuspenden las células en un medio de tinción enfriado con hielo (HBSS, suero bovino fetal al 1% y azida sódica al 0,1%), en una concentración de diez millones por mililitro. Se llevó a cabo el bloqueo del receptor de Fc y de la unión inespecífica de anticuerpos a las células añadiendo sueros normales de cabra al 10% y Fc Block (PharMingen, La Jolla, California, EE.UU.) a la suspensión celular.

Las suspensiones celulares son mezcladas con volúmenes iguales de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos (PharMingen), incubadas sobre hielo durante 60 minutos y luego lavadas dos veces con un tampón de lavado enfriado con hielo (PBS, suero bovino fetal al 1% y azida sódica al 0,1%) antes de resuspenderlas en 400 ml de tampón de lavado que contiene 1 mg/ml de 7-AAD (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.) como un marcador de viabilidad en algunas muestras. Los datos de flujo se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems, San Jose, California, EE.UU.). Tanto la adquisición como el análisis se llevaron a cabo utilizando el software CellQuest (BD Immunocytometry Systems).

Se analizaron las poblaciones celulares de todos los órganos linfoides para detectar anomalías en linajes específicos de células T, células B u otros linfocitos, y la celularidad en estos órganos.

Ejemplo 14

Identificación de células que expresan zcytor19 utilizando hibridación in situ

Mediante hibridación *in situ*, se exploró la expresión de zcytor19 en tejidos humanos de carcinoma cervical, colon normal y carcinómico, duodeno, carcinoma endometrial, ovario normal y carcinómico, útero, corazón, hígado, pulmón, sarcoma muscular, y piel normal y carcinómica. Los tejidos fueron fijados en formol tamponado al 10% y fueron bloqueados en parafina utilizando técnicas estándares. Se seccionaron los tejidos con un tamaño de 5 micrómetros. Se prepararon los tejidos utilizando un protocolo estándar ("Development of non-isotopic *in situ* hybridization" en <http://dir.niehs.nih.gov/dirlep/ish.html>). En resumen, los cortes tisulares fueron desparafinados con HistoClear (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, EE.UU.) y fueron luego deshidratados con etanol. A continuación, fueron digeridos con proteinasa K (50 µg/ml; Boehringer Diagnostics, Indianapolis, Indiana, EE.UU.) a 23°C durante 4-15 minutos. Esta operación fue seguida de la acetilación y rehidratación de los tejidos.

Se diseñó una sonda *in situ* contra la secuencia humana de zcytor19. Se digirió el DNA plasmídico 100933 con la enzima de restricción HindIII, que cubre 0,7 kb desde el extremo de 3' UTR. Se utilizó la RNA polimerasa de T-7 para generar una sonda antisentido. La sonda fue marcada con digoxigenina (Boehringer) utilizando un sistema de transcripción *in vitro* (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

La hibridación *in situ* fue llevada a cabo con una sonda para zcytor19 marcada con digoxigenina o biotina (anterior). Se añadió la sonda a los portaobjetos en una concentración de 1 a 5 picomoles/ml durante 12 a 16 horas a 60°C. Luego se lavaron los portaobjetos en SSC 2x y SSC 0,1x a 55°C. Las señales fueron amplificadas utilizando la amplificación de la señal de tiramida (TSA; del inglés, *tyramide signal amplification*) (TSA, kit indirecto *in situ*; NEN) y fueron visualizadas con el kit de sustrato Vector Red (Vector Lab) según las instrucciones del fabricante. Los portaobjetos fueron luego contrateñidos con hematoxilina (Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.).

Se observaron señales positivas en la mayoría de las muestras de carcinoma. En el carcinoma cervical, las células epiteliales de carcinoma eran positivas. Hubo también ciertas señales en un subconjunto de linfocitos de los folículos linfoides. Similarmente, tanto las células de carcinoma como ciertas células inmunes eran positivas en las muestras de carcinoma de colon, mientras que las muestras de colon normal eran negativas. También se vio una tinción débil en el carcinoma endometrial y el carcinoma ovárico, mientras que el ovario y el útero normales eran negativos. Hubo una tinción débil en la zona cancerosa de la muestra de sarcoma muscular. Los queratinocitos eran positivos en las muestras de carcinoma cutáneo y sarcoma de Kaposi, mientras que no se observó tinción alguna en la piel normal. En el corazón y el hígado, un subconjunto de células, posiblemente glóbulos blancos circulantes, era positivo para zcytor19. Parece que las células endoteliales de ciertos vasos pueden ser también positivas. En el pulmón, los neumocitos de tipo II y las células de tipo macrófago eran positivos. El epitelio y el endotelio bronquiales eran también positivos en ciertas muestras pulmonares. En resumen, parece que zcytor19 está suprarregulado en las células de carcinoma. Hay un bajo nivel de mRNA de zcytor19 en un subconjunto de linfocitos y células endoteliales.

Puesto que zcytor19 se expresa en estos tejidos tumorales específicos, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos zcytor19 pueden ser utilizados como marcadores tumorales, como aquí se describe. Además, un anticuerpo contra zcytor19 podría ejercer actividad antitumoral, así como los productos de conjugación de toxinas, productos de conjugación de citocinas u otros productos de conjugación de un anticuerpo, o el propio ligando del receptor zcytor19. Los antagonistas del ligando de zcytor19, tales como anticuerpos anti-zcytor19 o receptores solubles, pueden también actuar como reactivos antitumorales.

Ejemplo 15

Construcción de células BaF3 que expresan el receptor zcytor19 (células BaF3/zcytor19), con vectores resistentes a puomicina y resistentes a zeomicina

Se construyeron dos tipos de células BaF3 que expresaban el receptor zcytor19 de longitud completa utilizando 30 μ g de vectores de expresión para zcytor19, uno resistente a puomicina y uno resistente a zeomicina, descritos más adelante. Las células BaF3 que expresaban el mRNA del receptor zcytor19 con resistencia a puomicina fueron denominadas BaF3/zcytor19-p. Las células BaF3 que expresaban el mRNA del receptor zcytor19 con resistencia a zeomicina fueron denominadas BaF3/zcytor19-z.

A. Construcción de células BaF3 que expresan el receptor zcytor19

Se mantuvo BaF3, una línea celular prelinfoide dependiente de la interleucina 3 (IL-3), procedente de médula ósea murina (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al.*, Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), en medio completo [medio RPMI (JRH Bioscience Inc., Lenexa, Kansas, EE.UU.) complementado con suero de ternera fetal térmicamente inactivado al 10%, 2 ng/ml de IL-3 murina (mIL-3) (R & D, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.), L-glutaMax-1TM 2 mM (Gibco BRL), piruvato sódico 1 mM (Gibco BRL)]. Antes de la electroporación, se preparó y purificó pZP-5N/CRF2-4 usando un kit Qiagen Maxi Prep (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Las células BaF3 para la electroporación fueron lavadas dos veces en PBS (Gibco BRL) y fueron luego resuspendidas en medio RPMI hasta una densidad celular de 10^7 células/ml. Se mezcló 1 ml de células BaF3 resuspendidas con 30 μ g del DNA del plásmido pZP-7p/zcytor19 o 30 μ g del DNA del plásmido pZP-7z/zcytor19 y se transfirió la mezcla a cámaras desechables separadas para electroporación (Gibco BRL). Las células recibieron dos descargas sucesivas (800 IFad/300 V; 1180 IFad/300 V) proporcionadas por un aparato de electroporación (CELL-PORATORTM, Gibco BRL), con una pausa de 1 minuto entre las descargas. Después de un tiempo de recuperación de 5 minutos, las células sometidas a electroporación fueron transferidas a 50 ml de medio completo e introducidas en una incubadora durante 15-24 horas (37°C, CO₂ al 5%). Las células fueron luego separadas por centrifugación, resuspendidas en 50 ml de medio completo que contenía selección por puomicina (Clontech; 2 μ g/ml) para las células transfectadas con pZP-7p/zcytor19 o selección por zeomicina (1:150-1:333) para las células transfectadas con pZP-7z/zcytor19, e introducidas en un matraz T-162, para aislar las colecciones resistentes a los antibióticos. Las colecciones de las células BaF3 transfectadas, llamadas en lo sucesivo células BaF3/zcytor19-puro y BaF3/zcytor19-zeo, fueron examinadas en cuanto a la expresión de zcytor19 mediante RT-PCR.

B. Confirmación de la expresión de zcytor19 mediante RT-PCR

Se recogieron las células BaF3/zcytor19-puro y BaF3/zcytor19-zeo para obtener RNA, el cual fue luego sometido a una reacción de transcriptasa inversa y posteriormente examinado por PCR en cuanto a la presencia de zcytor19.

Se cultivaron células en matraces hasta confluencia y luego se sacaron 10 ml y se centrifugaron para obtener un sedimento celular de centrifugación. Se purificó el RNA del sedimento usando el kit RNeasy para purificación del RNA total, con el sistema adicional RNase-free DNase (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. Luego se sometieron las muestras a transcripción inversa utilizando el kit StrataScript para RT-PCR (Stratagene), siguiendo el protocolo del fabricante hasta la compleción de la reacción de RT. Luego se realizó la PCR mezclando 0,2 picomoles de cada uno de los cebadores ZC40279 y ZC37863, una mezcla de dNTPs (Roche) que contenía cantidades iguales de cada nucleótido (0,2 mM), 5 μ l de tampón 10x para reacción PCR de cDNA (Clontech), 3 μ l de DNA de la reacción de RT y 0,5 μ l de polimerasa Advantage 2 (Clontech), completándose con agua hasta un volumen final de 50 μ l. Se desarrolló la reacción a 95°C, 5 minutos, y luego 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y luego 72°C durante 7 minutos, y un empapamiento a 4°C, en un aparato Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400. Se mezclaron las muestras con 3 ml de colorante de carga, y se desarrollaron 25 ml en un gel de agarosa OmniPur al 1% (Merck). Se detectaron bandas de zcytor19 en el gel tanto para BaF3/zcytor19-puro como para BaF3/zcytor19-zeo, lo que indica que estas células están expresando el gen.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido, en que dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de:

- (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro);
- (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn);
- (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp);
- (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg);
- (e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (f) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg);
- (g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg); e
- (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg);

o en que dicho polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de:

- (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); y
- (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser).

2. Un polinucleótido aislado, en que dicho polinucleótido comprende una secuencia polinucleotídica del grupo de:

- (a) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 61 al nucleótido 669;
- (b) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 61 al 678;
- (c) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 61 al nucleótido 747;
- (d) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 748 al nucleótido 1473;
- (e) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 18, del nucleótido 748 al nucleótido 1560;
- (f) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 61 al nucleótido 1473;
- (g) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 18, del nucleótido 61 al nucleótido 1560;
- (h) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 1 al nucleótido 1473; e

ES 2 334 888 T3

- (i) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 18, del nucleótido 1 al nucleótido 1560;

o en que dicho polinucleótido consiste en una secuencia polinucleotídica del grupo de:

- (j) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 20, del nucleótido 61 al nucleótido 489;
- (k) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 20, del nucleótido 61 al nucleótido 633; y
- (l) un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica como la mostrada en la ID. SEC. nº 20, del nucleótido 1 al nucleótido 633.

3. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende además un dominio transmembranal que consiste en los restos 227 (Trp) a 249 (Trp) de la ID. SEC. nº 2.

4. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende además un dominio intracelular que consiste en los restos 250 (Lys) a 491 (Arg) de la ID. SEC. nº 2, o del 250 (Lys) a 520 (Arg) de la ID. SEC. nº 19.

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

un promotor de la transcripción;

un segmento de DNA que codifica un polipéptido del grupo que consiste en:

- (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro);
- (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn);
- (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp);
- (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg);
- (e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (f) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg);
- (g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg);
- (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); y
- (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y

un terminador de la transcripción,

en que el promotor está operativamente enlazado con el segmento de DNA, y el segmento de DNA está operativamente enlazado con el terminador de la transcripción.

ES 2 334 888 T3

6. Un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 5, que comprende además una secuencia señal secretora operativamente enlazada con el segmento de DNA.

7. Una célula cultivada que comprende un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 5 ó 6, en que la célula expresa un polipéptido codificado por el segmento de DNA.

8. Un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 5, en que el polipéptido comprende además un dominio transmembranal que consiste en los restos 227 (Trp) a 249 (Trp) de la ID. SEC. nº 2.

9. Un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 5, en que el polipéptido comprende además un dominio intracelular que consiste en los restos 250 (Lys) a 491 (Arg) de la ID. SEC. nº 2, o del 250 (Lys) a 520 (Arg) de la ID. SEC. nº 19.

10. Un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 5, que comprende los siguientes elementos operativamente enlazados:

un promotor de la transcripción;

un segmento de DNA que codifica un polipéptido del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro);

(b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn);

(c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp); y

(d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y

un terminador de la transcripción,

en que el promotor está operativamente enlazado con el segmento de DNA, y el segmento de DNA está operativamente enlazado con el terminador de la transcripción.

11. Una célula cultivada en que se ha introducido un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 10, en que la célula expresa un polipéptido receptor soluble codificado por el segmento de DNA.

12. Una construcción de DNA que codifica una proteína de fusión, construcción de DNA que comprende:

un primer segmento de DNA que codifica un polipéptido, en que el polipéptido comprende una secuencia de restos de aminoácido del grupo de:

(a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro);

(b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn);

(c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp);

(d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg);

(e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg);

(f) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 227 (Trp) al número de aminoácido 249 (Trp);

(g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 227 (Trp) al número de aminoácido 491 (Arg);

ES 2 334 888 T3

- (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 227 (Trp) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg);
- (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg); y
- (l) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg);

o en que el polipéptido consiste en una secuencia de restos de aminoácido del grupo de:

- (m) la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 20 (Gly);
- (n) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); y
- (o) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y

al menos otro segmento de DNA que codifica un polipéptido adicional, en que el primer segmento de DNA y el otro segmento de DNA están conectados en marco, y en que el primer segmento de DNA y el otro segmento de DNA codifican la proteína de fusión.

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

un promotor de la transcripción;

una construcción de DNA que codifica una proteína de fusión de acuerdo con la Reivindicación 12; y

un terminador de la transcripción,

en que el promotor está operativamente enlazado con la construcción de DNA, y la construcción de DNA está operativamente enlazada con el terminador de la transcripción.

14. Una célula cultivada que comprende un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 13, en que la célula expresa un polipéptido codificado por la construcción de DNA.

15. Un método para producir una proteína de fusión, que comprende

cultivar una célula de acuerdo con la Reivindicación 14; y

aislar el polipéptido producido por la célula.

16. Un polipéptido aislado, en que dicho polipéptido comprende una secuencia de restos de aminoácido del grupo de:

- (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro);
- (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn);
- (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp);
- (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg);

ES 2 334 888 T3

- (e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (f) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg);
- (g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg); e
- (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg);

o en que dicho polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de:

- (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); y
- (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser).

17. Un polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 16, en que el polipéptido consiste en una secuencia de restos de aminoácido que es del grupo de:

- (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 223 (Pro);
- (b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn);
- (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 249 (Trp);
- (d) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg);
- (e) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (f) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg);
- (g) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (h) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 491 (Arg);
- (i) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 19, del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 520 (Arg);
- (j) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 163 (Trp); y
- (k) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser).

18. Un polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 16, en que el polipéptido comprende además un dominio transmembranal que consiste en los restos 227 (Trp) a 249 (Trp) de la ID. SEC. nº 2.

19. Un polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 16, en que el polipéptido comprende además un dominio intracelular que consiste en los restos 250 (Lys) al número de aminoácido 491 (Arg) de la ID. SEC. nº 2, o del 250 (Lys) al número de aminoácido 520 (Arg) de la ID. SEC. nº 19.

ES 2 334 888 T3

20. Un método para producir un polipéptido, que comprende

cultivar una célula de acuerdo con la Reivindicación 7; y

5 aislar el polipéptido producido por la célula.

21. Un polipéptido aislado, en que dicho polipéptido comprende un segmento de aminoácidos del grupo de:

10 (a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn); y

(b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 4;

15 o secuencias que son al menos 90% idénticas a la de (a) o (b):

o en que dicho polipéptido consiste en:

20 (c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); o

(d) secuencias que son al menos 90% idénticas a la de (c).

25 en que el polipéptido está sustancialmente exento de los dominios transmembranales e intracelulares comúnmente asociados con los receptores hematopoyéticos.

22. Un método para producir un polipéptido, que comprende

30 cultivar una célula de acuerdo con la Reivindicación 11; y

aislar el polipéptido producido por la célula.

35 23. Un método para producir un anticuerpo contra un polipéptido, que comprende:

inocular a un animal no humano un polipéptido del grupo de:

40 (a) un polipéptido que consiste en una secuencia contigua de 50 a 471 aminoácidos, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 491 (Arg) de la ID. SEC. nº 2;

(b) un polipéptido que consiste en una secuencia contigua de 50 a 500 aminoácidos, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 520 (Arg) de la ID. SEC. nº 19;

45 (c) un polipéptido que consiste en una secuencia contigua de 50 a 191 aminoácidos, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser) de la ID. SEC. nº 19;

(d) un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 17;

50 (e) un polipéptido que consiste en del número de aminoácido 21 (Arg) al 119 (Tyr) de la ID. SEC. nº 2;

(f) un polipéptido que comprende del número de aminoácido 125 (Pro) al 223 (Pro) de la ID. SEC. nº 2; y

55 (g) un polipéptido que consiste en un péptido hidrófilo de la ID. SEC. nº 2, según se pronostica a partir de un gráfico de hidrofobia usando un perfil Hopp/Woods de hidrofilia basado en una ventana deslizante de seis restos, ignorándose los restos G, S y T enterrados y los restos H, Y y W expuestos;

en que el polipéptido provoca una respuesta inmune en el animal para producir el anticuerpo; y

60 aislar el anticuerpo del animal.

24. Un anticuerpo producido mediante el método de la Reivindicación 23, que se une específicamente con un polipéptido de ID. SEC. nº 2, ID. SEC. nº 19 o ID. SEC. nº 21.

65 25. El anticuerpo de la Reivindicación 24, en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

26. Un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido de la Reivindicación 16.

27. Un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido de la Reivindicación 17.

28. Un método para detectar, en una muestra de ensayo, la presencia de un modulador de la actividad de una proteína receptora de citocinas, que comprende:

cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 5, en que la célula expresa la proteína codificada por el segmento de DNA, en presencia y ausencia de una muestra de ensayo;

comparar, mediante un ensayo biológico o bioquímico, los niveles de actividad de la proteína en presencia y ausencia de la muestra de ensayo; y

determinar, a partir de la comparación, la presencia de un modulador de la actividad de la proteína receptora de citocinas en la muestra de ensayo.

29. Un método para detectar un ligando de receptor citocínico en una muestra de ensayo, que comprende:

poner una muestra de ensayo en contacto con un polipéptido receptor de citocinas, en que el polipéptido receptor de citocinas comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 4; y

(b) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 2, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 226 (Asn);

o en que el polipéptido receptor de citocinas consiste en:

(c) una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 21, del número de aminoácido 21 (Arg) al número de aminoácido 211 (Ser); y

detectar la unión del polipéptido receptor de citocinas con un ligando en la muestra.

30. Un método para detectar un ligando de receptor citocínico de acuerdo con la Reivindicación 29, en que el polipéptido receptor de citocinas está unido a la membrana de una célula cultivada, y la operación de detección comprende medir una respuesta biológica en la célula cultivada.

31. Un método para detectar un ligando de receptor citocínico de acuerdo con la Reivindicación 30, en que la respuesta biológica es proliferación celular o activación de la transcripción de un gen informador.

32. Un método para detectar una anomalía genética en la ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 18 o ID. SEC. nº 20 de un paciente, que comprende:

producir un primer producto de reacción al incubar una muestra genética del paciente con un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 18 o ID. SEC. nº 20, o del complemento de la misma, en unas condiciones bajo las cuales dicho polinucleótido se hibrida con la secuencia polinucleotídica complementaria;

visualizar el primer producto de reacción; y

comparar dicho primer producto de reacción con un producto de reacción testigo procedente de un paciente de tipo silvestre, en que una diferencia entre dicho primer producto de reacción y dicho producto de reacción testigo es indicativa de una anomalía genética en la ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 18 o ID. SEC. nº 20 del paciente.

33. Un método para detectar un cáncer en un paciente, que comprende:

incubar una muestra tisular o biológica del paciente con un anticuerpo de la Reivindicación 27 en unas condiciones bajo las cuales el anticuerpo se une con su polipéptido complementario en la muestra tisular o biológica;

visualizar el anticuerpo unido en la muestra tisular o biológica; y

comparar los niveles de anticuerpo unido en la muestra tisular o biológica del paciente con aquellos en una muestra tisular o biológica testigo normal,

en que un aumento del nivel de anticuerpo unido en la muestra tisular o biológica del paciente con respecto a aquél en la muestra tisular o biológica testigo normal es indicativo de un cáncer en el paciente.

ES 2 334 888 T3

34. Un método para detectar un cáncer en un paciente, que comprende:

marcar un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 18 o ID. SEC. nº 20 o del complemento de la ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 18 o ID. SEC. nº 20;

incubar una muestra tisular o biológica del paciente con dicho polinucleótido marcado, en unas condiciones bajo las cuales el polinucleótido se hibridará con la secuencia polinucleotídica complementaria;

visualizar el polinucleótido marcado en la muestra tisular o biológica; y

comparar el nivel de hibridación del polinucleótido marcado en la muestra tisular o biológica del paciente con aquel en una muestra tisular o biológica testigo normal,

en que un aumento de la hibridación del polinucleótido marcado en la muestra tisular o biológica del paciente con respecto a aquélla en la muestra tisular o biológica testigo normal es indicativo de un cáncer en el paciente.

ES 2 334 888 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics, Inc.

5 <120> RECEPTOR DE CITOCINA ZCYTOR19

<130> 00-108

10 <150> US 60/253.561

<151> 28-11-2000

<150> US 60/267.211

15 <151> 07-02-2001

<160> 50

20 <170> FastSEQ para Windows Versión 3,0

<210> 1

<211> 1476

25 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

30 <221> CDS

<222> (1)...(1473)

35 <400> 1

	atg gcg ggg ccc gag cgc tgg ggc ccc ctg ctc ctg tgc ctg ctg cag	48
	Met Ala Gly Pro Glu Arg Trp Gly Pro Leu Leu Leu Cys Leu Leu Gln	

40	1	5	10	15
----	---	---	----	----

	gcc gct cca ggg agg ccc cgt ctg gcc cct ccc cag aat gtg acg ctg	96
	Ala Ala Pro Gly Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu	

45		20	25	30
----	--	----	----	----

	ctc tcc cag aac ttc agc gtg tac ctg aca tgg ctc cca ggg ctt ggc	144
	Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly	

50		35	40	45
----	--	----	----	----

	aac ccc cag gat gtg acc tat ttt gtg gcc tat cag agc tct ccc acc	192
--	---	-----

55

60

65

ES 2 334 888 T3

	Asn	Pro	Gln	Asp	Val	Thr	Tyr	Phe	Val	Ala	Tyr	Gln	Ser	Ser	Pro	Thr	
	50						55					60					
5	cgt	aga	cgg	tgg	cgc	gaa	gtg	gaa	gag	tgt	gcg	gga	acc	aag	gag	ctg	240
	Arg	Arg	Arg	Trp	Arg	Glu	Val	Glu	Glu	Cys	Ala	Gly	Thr	Lys	Glu	Leu	
10	65					70				75					80		
	cta	tgt	tct	atg	atg	tgc	ctg	aag	aaa	cag	gac	ctg	tac	aac	aag	ttc	288
15	Leu	Cys	Ser	Met	Met	Cys	Leu	Lys	Lys	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asn	Lys	Phe	
				85						90					95		
	aag	gga	cgc	gtg	cgg	acg	gtt	tct	ccc	agc	tcc	aag	tcc	ccc	tgg	gtg	336
20	Lys	Gly	Arg	Val	Arg	Thr	Val	Ser	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Pro	Trp	Val	
				100					105					110			
	gag	tcc	gaa	tac	ctg	gat	tac	ctt	ttt	gaa	gtg	gag	ccg	gcc	cca	cct	384
25	Glu	Ser	Glu	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Leu	Phe	Glu	Val	Glu	Pro	Ala	Pro	Pro	
				115				120					125				
	gtc	ctg	gtg	ctc	acc	cag	acg	gag	gag	atc	ctg	agt	gcc	aat	gcc	acg	432
30	Val	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Glu	Glu	Ile	Leu	Ser	Ala	Asn	Ala	Thr	
				130				135					140				
	tac	cag	ctg	ccc	ccc	tgc	atg	ccc	cca	ctg	ttt	ctg	aag	tat	gag	gtg	480
35	Tyr	Gln	Leu	Pro	Pro	Cys	Met	Pro	Pro	Leu	Phe	Leu	Lys	Tyr	Glu	Val	
40	145					150					155					160	
	gca	ttt	tgg	ggg	ggg	ggg	gcc	gga	acc	aag	acc	cta	ttt	cca	gtc	act	528
45	Ala	Phe	Trp	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Thr	Leu	Phe	Pro	Val	Thr	
				165						170					175		
	ccc	cat	ggc	cag	cca	gtc	cag	atc	act	ctc	cag	cca	gct	gcc	agc	gaa	576
50	Pro	His	Gly	Gln	Pro	Val	Gln	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Ser	Glu	
				180					185					190			
	cac	cac	tgc	ctc	agt	gcc	aga	acc	atc	tac	acg	ttc	agt	gtc	ccg	aaa	624
55	His	His	Cys	Leu	Ser	Ala	Arg	Thr	Ile	Tyr	Thr	Phe	Ser	Val	Pro	Lys	
				195				200					205				
	tac	agc	aag	ttc	tct	aag	ccc	acc	tgc	ttc	ttg	ctg	gag	gtc	cca	gaa	672
60	Tyr	Ser	Lys	Phe	Ser	Lys	Pro	Thr	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Val	Pro	Glu	
				210				215				220					

ES 2 334 888 T3

5	gcc aac tgg gct ttc ctg gtg ctg cca tcg ctt ctg ata ctg ctg tta Ala Asn Trp Ala Phe Leu Val Leu Pro Ser Leu Leu Ile Leu Leu Leu 225 230 235 240	720
10	gta att gcc gca ggg ggt gtg atc tgg aag acc ctc atg ggg aac ccc Val Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Trp Lys Thr Leu Met Gly Asn Pro 245 250 255	768
15	tgg ttt cag cgg gca aag atg cca cgg gcc ctg gaa ctg acc aga ggg Trp Phe Gln Arg Ala Lys Met Pro Arg Ala Leu Glu Leu Thr Arg Gly 260 265 270	816
20	gtc agg ccg acg cct cga gtc agg gcc cca gcc acc caa cag aca aga Val Arg Pro Thr Pro Arg Val Arg Ala Pro Ala Thr Gln Gln Thr Arg 275 280 285	864
25	tgg aag aag gac ctt gca gag gac gaa gag gag gag gat gag gag gac Trp Lys Lys Asp Leu Ala Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp 290 295 300	912
30	aca gaa gat ggc gtc agc ttc cag ccc tac att gaa cca cct tct ttc Thr Glu Asp Gly Val Ser Phe Gln Pro Tyr Ile Glu Pro Pro Ser Phe 305 310 315 320	960
35	ctg ggg caa gag cac cag gct cca ggg cac tcg gag gct ggt ggg gtg Leu Gly Gln Glu His Gln Ala Pro Gly His Ser Glu Ala Gly Gly Val 325 330 335	1008
40	gac tca ggg agg ccc agg gct cct ctg gtc cca agc gaa ggc tcc tct Asp Ser Gly Arg Pro Arg Ala Pro Leu Val Pro Ser Glu Gly Ser Ser 340 345 350	1056
45	gct tgg gat tct tca gac aga agc tgg gcc agc act gtg gac tcc tcc Ala Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Trp Ala Ser Thr Val Asp Ser Ser 355 360 365	1104
50	tgg gac agg gct ggg tcc tct ggc tat ttg gct gag aag ggg cca ggc Trp Asp Arg Ala Gly Ser Ser Gly Tyr Leu Ala Glu Lys Gly Pro Gly 370 375 380	1152
55	caa ggg ccg ggt ggg gat ggg cac caa gaa tct ctc cca cca cct gaa Gln Gly Pro Gly Gly Asp Gly His Gln Glu Ser Leu Pro Pro Pro Glu 385 390 395 400	1200
60		
65		

ES 2 334 888 T3

5	ttc tcc aag gac tcg ggt ttc ctg gaa gag ctc cca gaa gat aac ctc	1248
	Phe Ser Lys Asp Ser Gly Phe Leu Glu Glu Leu Pro Glu Asp Asn Leu	
	405 410 415	
10	tcc tcc tgg gcc acc tgg ggc acc tta cca ccg gag ccg aat ctg gtc	1296
	Ser Ser Trp Ala Thr Trp Gly Thr Leu Pro Pro Glu Pro Asn Leu Val	
	420 425 430	
15	cct ggg gga ccc cca gtt tct ctt cag aca ctg acc ttc tgc tgg gaa	1344
	Pro Gly Gly Pro Pro Val Ser Leu Gln Thr Leu Thr Phe Cys Trp Glu	
	435 440 445	
20	agc agc cct gag gag gaa gag gag gcg agg gaa tca gaa att gag gac	1392
	Ser Ser Pro Glu Glu Glu Glu Glu Ala Arg Glu Ser Glu Ile Glu Asp	
	450 455 460	
25	agc gat gcg ggc agc tgg ggg gct gag agc acc cag agg acc gag gac	1440
	Ser Asp Ala Gly Ser Trp Gly Ala Glu Ser Thr Gln Arg Thr Glu Asp	
	465 470 475 480	
30		
35	agg ggc cgg aca ttg ggg cat tac atg gcc agg tga	1476
	Arg Gly Arg Thr Leu Gly His Tyr Met Ala Arg	
	485 490	
40	<210> 2	
	<211> 491	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 2	
50	Met Ala Gly Pro Glu Arg Trp Gly Pro Leu Leu Leu Cys Leu Leu Gln	
	1 5 10 15	
	Ala Ala Pro Gly Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu	
	20 25 30	
55	Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly	
	35 40 45	
60	Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr	
	50 55 60	
	Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu	
	65 70 75 80	

ES 2 334 888 T3

	Leu	Cys	Ser	Met	Met	Cys	Leu	Lys	Lys	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asn	Lys	Phe
				85						90					95	
5	Lys	Gly	Arg	Val	Arg	Thr	Val	Ser	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Pro	Trp	Val
				100					105					110		
	Glu	Ser	Glu	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Leu	Phe	Glu	Val	Glu	Pro	Ala	Pro	Pro
10			115					120					125			
	Val	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Glu	Glu	Ile	Leu	Ser	Ala	Asn	Ala	Thr
			130				135					140				
15	Tyr	Gln	Leu	Pro	Pro	Cys	Met	Pro	Pro	Leu	Phe	Leu	Lys	Tyr	Glu	Val
	145					150					155					160
	Ala	Phe	Trp	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Thr	Leu	Phe	Pro	Val	Thr
				165						170					175	
20	Pro	His	Gly	Gln	Pro	Val	Gln	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Ser	Glu
			180						185					190		
	His	His	Cys	Leu	Ser	Ala	Arg	Thr	Ile	Tyr	Thr	Phe	Ser	Val	Pro	Lys
25			195					200					205			
	Tyr	Ser	Lys	Phe	Ser	Lys	Pro	Thr	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Val	Pro	Glu
	210						215					220				
30	Ala	Asn	Trp	Ala	Phe	Leu	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu
	225					230					235					240
	Val	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Trp	Lys	Thr	Leu	Met	Gly	Asn	Pro
				245						250				255		
35	Trp	Phe	Gln	Arg	Ala	Lys	Met	Pro	Arg	Ala	Leu	Glu	Leu	Thr	Arg	Gly
			260						265					270		
	Val	Arg	Pro	Thr	Pro	Arg	Val	Arg	Ala	Pro	Ala	Thr	Gln	Gln	Thr	Arg
40			275					280					285			
	Trp	Lys	Lys	Asp	Leu	Ala	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Asp
	290					295					300					
45	Thr	Glu	Asp	Gly	Val	Ser	Phe	Gln	Pro	Tyr	Ile	Glu	Pro	Pro	Ser	Phe
	305					310					315					320
	Leu	Gly	Gln	Glu	His	Gln	Ala	Pro	Gly	His	Ser	Glu	Ala	Gly	Gly	Val
				325						330				335		
50	Asp	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Pro	Leu	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ser
			340						345				350			
	Ala	Trp	Asp	Ser	Ser	Asp	Arg	Ser	Trp	Ala	Ser	Thr	Val	Asp	Ser	Ser
55			355					360					365			
	Trp	Asp	Arg	Ala	Gly	Ser	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ala	Glu	Lys	Gly	Pro	Gly
		370					375					380				
60	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Asp	Gly	His	Gln	Glu	Ser	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu
	385					390					395					400
	Phe	Ser	Lys	Asp	Ser	Gly	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Pro	Glu	Asp	Asn	Leu
65				405						410				415		

ES 2 334 888 T3

Ser Ser Trp Ala Thr Trp Gly Thr Leu Pro Pro Glu Pro Asn Leu Val
 420 425 430
 5 Pro Gly Gly Pro Pro Val Ser Leu Gln Thr Leu Thr Phe Cys Trp Glu
 435 440 445
 Ser Ser Pro Glu Glu Glu Glu Glu Ala Arg Glu Ser Glu Ile Glu Asp
 450 455 460
 10 Ser Asp Ala Gly Ser Trp Gly Ala Glu Ser Thr Gln Arg Thr Glu Asp
 465 470 475 480
 Arg Gly Arg Thr Leu Gly His Tyr Met Ala Arg
 485 490
 15

<210> 3
 20 <211> 1473
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia polinucleotídica degenerada de la SEC. ID NO:2
 30 <221> característica_miscelánea
 <222> (1)...(1473)
 <223> n = A,T,C o G

35 <400> 3
 atggcnggnc cngarmgntg gggncncytn ytnytntggy tnytnccargc ngcncncngn 60
 mgncncmgny tngcncncnc ncaraaygt acnytnytnw snccaraaytt ywsngntay 120
 40 ytnacntggy tncncngnytn nggnaayccn carygtatna cntayttygt ngcntaycar 180
 wsnwsncna cnmgnmgng ntggmgngar gtngargart gygcnggnac naargarytn 240
 ytnygywsna tgatgtgyt naaraarcar gaytntaya ayaarttyaa rggnmngntn 300
 mgnacngtnw snccnwsnws naarwsncn tgggtngarw sngartayt ngaytaytn 360
 45 ttygargtn arcncncnc nccngtnytn gtnytnacnc arancngarga rathytnwsn 420
 gcnaaygcna cntaycaryt nccncntgy atgccncncy tnttytnaa rtaygargtn 480
 gcnttytggg gngngngngc nggnacnaar acnytnnttyc cngtnacnc ncayggncar 540
 50 ccngtncara thacnytnca rccngcngcn wsnargcayc aytgytnws ngcncmgncn 600
 athtayaent tywsngtncc naartaywsn aarttywsna arccnacntg ytytytnytn 660
 gargtnccng argcnaaytg ggcnttytn gtnytnccnw snytnytnat hytnytnytn 720
 55 gtnathgcng cngngngngt nathtggaar acnytnatgg gnaayccntg gttycarmgn 780
 gcnaaratgc cnmngncnytn ngarytnacn mgngngngtnm gncncncnc nmgngtnmgn 840
 gcncncngcna cncarcac nmgntggaar aargaytn cngargayga rgargargar 900
 gaygargarg ayancngarga yggngtnwsn ttycarccnt ayathgarcc nccnwsntty 960
 60 ytnngncarg arcaycargc nccngngncay wsnargcng gngngngtna ywsngngmgn 1020
 cncmgngcnc cnytngtnc nwsngarggn wsnwsngcnt gggaywsnws ngaymgnwsn 1080
 tgggcnwsna cngtnayws nwsntgggay mgngcnggnw snwsngngnta ytnyngcngar 1140
 65

ES 2 334 888 T3

aarggnccng gncarggncc ngngngngay ggncaycarg arwsnytncc nccnccngar 1200
 ttywsnaarg aywsnggntt yytngargar ytnccngarg ayaaytnws nwsntgggcn 1260
 acntggggna cnytnccncc ngarccnaay ytngtnccng gnggnccncc ngtnwsnytn 1320
 5 caracnytna cnttytgytg ggarwsnwsn ccngargarg argargargc nmngargarwsn 1380
 garathgarg aywsngaygc nggnwsntgg ggngcngarw snacncarmg nacngargay 1440
 mgnggnmna cnytnngnca ytayatggcn mgn 1473

<210> 4

<211> 203

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> motivo WSXWS

ES 2 334 888 T3

<221> VARIANTE
 <222> (1)...(5)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 5
 <400> 5
 Trp Ser Xaa Trp Ser
 1 5
 10
 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 15
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC21195

 <400> 6

 25 gaggagacca taacccccga cag 23

 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 30
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC21196

 <400> 7

 40 catagctccc accacacgat ttt 23

 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 45
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC14063

 <400> 8

 55 caccagacat aatagctgac agact 25

 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 60
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC17574

ES 2 334 888 T3

<400> 9

ggtrttgctc agcatgcaca c

21

5

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC17600

15

<400> 10

catgtaggcc atgaggtcca ccac

24

20

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Etiqueta peptídica Glu-Glu

30

<400> 11

Glu Tyr Met Pro Met Glu

35

1

5

<210> 12

40

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> etiqueta peptídica FLAG

<400> 12

50

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

55

<210> 13

<211> 699

<212> DNA

60

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 334 888 T3

<400> 13

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

<210> 14

25 <211> 990

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(990)

35 <400> 14

40	gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag	48
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	
	1 5 10 15	
45	agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac	96
	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
	20 25 30	

50

55

60

65

ES 2 334 888 T3

5	ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	144
	35 40 45	
10	ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	192
	50 55 60	
15	ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	240
	65 70 75 80	
20	tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	288
	85 90 95	
25	aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	336
	100 105 110	
30	cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	384
	115 120 125	
35	aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	432
	130 135 140	
40	gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	480
	145 150 155 160	
45	tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	528
	165 170 175	
50	gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	576
	180 185 190	
55	cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	624
	195 200 205	
60		
65		

ES 2 334 888 T3

5	aaa Lys	gcc Ala	ctc Leu	cca Pro	gcc Ala	ccc Pro	atc Ile	gag Glu	aaa Lys	acc Thr	atc Ile	tcc Ser	aaa Lys	gcc Ala	aaa Lys	ggg Gly	672
		210					215					220					
10	cag Gln	ccc Pro	cga Arg	gaa Glu	cca Pro	cag Gln	gtg Val	tac Tyr	acc Thr	ctg Leu	ccc Pro	cca Pro	tcc Ser	cgg Arg	gat Asp	gag Glu	720
	225					230					235					240	
15	ctg Leu	acc Thr	aag Lys	aac Asn	cag Gln	gtc Val	agc Ser	ctg Leu	acc Thr	tgc Cys	ctg Leu	gtc Val	aaa Lys	ggc Gly	ttc Phe	tat Tyr	768
					245					250					255		
20	ccc Pro	agc Ser	gac Asp	atc Ile	gcc Ala	gtg Val	gag Glu	tgg Trp	gag Glu	agc Ser	aat Asn	ggg Gly	cag Gln	ccg Pro	gag Glu	aac Asn	816
				260				265					270				
25	aac Asn	tac Tyr	aag Lys	acc Thr	acg Thr	cct Pro	ccc Pro	gtg Val	ctg Leu	gac Asp	tcc Ser	gac Asp	ggc Gly	tcc Ser	ttc Phe	ttc Phe	864
			275					280					285				
30	ctc Leu	tac Tyr	agc Ser	aag Lys	ctc Leu	acc Thr	gtg Val	gac Asp	aag Lys	agc Ser	agg Arg	tgg Trp	cag Gln	cag Gln	ggg Gly	aac Asn	912
		290					295					300					
35																	
40	gtc Val	ttc Phe	tca Ser	tgc Cys	tcc Ser	gtg Val	atg Met	cat His	gag Glu	gct Ala	ctg Leu	cac His	aac Asn	cac His	tac Tyr	acg Thr	960
	305					310					315					320	
45																	
	cag Gln	aag Lys	agc Ser	ctc Leu	tcc Ser	ctg Leu	tct Ser	ccg Pro	ggt Gly	aaa Lys							990
					325					330							

50 $\langle 210 \rangle$ 15
 $\langle 211 \rangle$ 330
 $\langle 212 \rangle$ PRT
 $\langle 213 \rangle$ *Homo sapiens*

ES 2 334 888 T3

<400> 15

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

ES 2 334 888 T3

<210> 16
 <211> 321
 <212> DNA
 5 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)...(321)

 <400> 16

 15 act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 48
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15
 20 ttg aaa tct ggt acc gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 96
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 25 ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc.caa tcg 144
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 30 35 40 45
 35 ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc 192
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 40 tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa 240
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 45 cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc 288
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95
 50 gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 321
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *
 100 105
 55

 <210> 17
 <211> 106
 60 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 65

ES 2 334 888 T3

<400> 17

```

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

```

<210> 18

<211> 1563

30 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

35 <221> CDS

<222> (1)...(1563)

<400> 18

```

40     atg gcg ggg ccc gag cgc tgg ggc ccc ctg ctc ctg tgc ctg ctg cag      48
      Met Ala Gly Pro Glu Arg Trp Gly Pro Leu Leu Leu Cys Leu Leu Gln
45     1          5          10          15

      gcc gct cca ggg agg ccc cgt ctg gcc cct ccc cag aat gtg acg ctg      96
      Ala Ala Pro Gly Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu
50          20          25          30

      ctc tcc cag aac ttc agc gtg tac ctg aca tgg ctc cca ggg.ctt ggc      144
      Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly
55          35          40          45

      aac ccc cag gat gtg acc tat ttt gtg gcc tat cag agc tct ccc acc      192
      Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr
60          50          55          60

65     cgt aga cgg tgg cgc gaa gtg gaa gag tgt gcg gga acc aag gag ctg      240

```

ES 2 334 888 T3

	Arg	Arg	Arg	Trp	Arg	Glu	Val	Glu	Glu	Cys	Ala	Gly	Thr	Lys	Glu	Leu	
	65					70					75					80	
5	cta	tgt	tct	atg	atg	tgc	ctg	aag	aaa	cag	gac	ctg	tac	aac	aag	ttc	288
	Leu	Cys	Ser	Met	Met	Cys	Leu	Lys	Lys	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asn	Lys	Phe	
					85					90					95		
10	aag	gga	cgc	gtg	cgg	acg	gtt	tct	ccc	agc	tcc	aag	tcc	ccc	tgg	gtg	336
	Lys	Gly	Arg	Val	Arg	Thr	Val	Ser	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Pro	Trp	Val	
15				100					105					110			
20	gag	tcc	gaa	tac	ctg	gat	tac	ctt	ttt	gaa	gtg	gag	ccg	gcc	cca	cct	384
	Glu	Ser	Glu	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Leu	Phe	Glu	Val	Glu	Pro	Ala	Pro	Pro	
			115					120					125				
25	gtc	ctg	gtg	ctc	acc	cag	acg	gag	gag	atc	ctg	agt	gcc	aat	gcc	acg	432
	Val	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Glu	Glu	Ile	Leu	Ser	Ala	Asn	Ala	Thr	
		130					135					140					
30	tac	cag	ctg	ccc	ccc	tgc	atg	ccc	cca	ctg	gat	ctg	aag	tat	gag	gtg	480
	Tyr	Gln	Leu	Pro	Pro	Cys	Met	Pro	Pro	Leu	Asp	Leu	Lys	Tyr	Glu	Val	
	145					150					155					160	
35	gca	ttc	tgg	aag	gag	ggg	gcc	gga	aac	aag	acc	cta	ttt	cca	gtc	act	528
	Ala	Phe	Trp	Lys	Glu	Gly	Ala	Gly	Asn	Lys	Thr	Leu	Phe	Pro	Val	Thr	
					165				170						175		
40	ccc	cat	ggc	cag	cca	gtc	cag	atc	act	ctc	cag	cca	gct	gcc	agc	gaa	576
	Pro	His	Gly	Gln	Pro	Val	Gln	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Ser	Glu	
45				180					185					190			
50	cac	cac	tgc	ctc	agt	gcc	aga	acc	atc	tac	acg	ttc	agt	gtc	ccg	aaa	624
	His	His	Cys	Leu	Ser	Ala	Arg	Thr	Ile	Tyr	Thr	Phe	Ser	Val	Pro	Lys	
			195					200					205				
55	tac	agc	aag	ttc	tct	aag	ccc	acc	tgc	ttc	ttg	ctg	gag	gtc	cca	gaa	672
	Tyr	Ser	Lys	Phe	Ser	Lys	Pro	Thr	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Val	Pro	Glu	
		210					215					220					
60	gcc	aac	tgg	gct	ttc	ctg	gtg	ctg	cca	tcg	ctt	ctg	ata	ctg	ctg	tta	720
	Ala	Asn	Trp	Ala	Phe	Leu	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu	
65	225					230					235					240	

ES 2 334 888 T3

5	gta att gcc gca ggg ggt gtg atc tgg aag acc ctc atg ggg aac ccc Val Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Trp Lys Thr Leu Met Gly Asn Pro 245 250 255	768
10	tgg ttt cag cgg gca aag atg cca cgg gcc ctg gac ttt tct gga cac Trp Phe Gln Arg Ala Lys Met Pro Arg Ala Leu Asp Phe Ser Gly His 260 265 270	816
15	aca cac cct gtg gca acc ttt cag ccc agc aga cca gag tcc gtg aat Thr His Pro Val Ala Thr Phe Gln Pro Ser Arg Pro Glu Ser Val Asn 275 280 285	864
20	gac ttg ttc ctc tgt ccc caa aag gaa ctg acc aga ggg gtc agg ccg Asp Leu Phe Leu Cys Pro Gln Lys Glu Leu Thr Arg Gly Val Arg Pro 290 295 300	912
25	acg cct cga gtc agg gcc cca gcc acc caa cag aca aga tgg aag aag Thr Pro Arg Val Arg Ala Pro Ala Thr Gln Gln Thr Arg Trp Lys Lys 305 310 315 320	960
30	gac ctt gca gag gac gaa gag gag gag gat gag gag gac aca gaa gat Asp Leu Ala Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Thr Glu Asp 325 330 335	1008
35	ggc gtc agc ttc cag ccc tac att gaa cca cct tct ttc ctg ggg caa Gly Val Ser Phe Gln Pro Tyr Ile Glu Pro Pro Ser Phe Leu Gly Gln 340 345 350	1056
40	gag cac cag gct cca ggg cac tcg gag gct ggt ggg gtg gac tca ggg Glu His Gln Ala Pro Gly His Ser Glu Ala Gly Gly Val Asp Ser Gly 355 360 365	1104
45	agg ccc agg gct cct ctg gtc cca agc gaa ggc tcc tct gct tgg gat Arg Pro Arg Ala Pro Leu Val Pro Ser Glu Gly Ser Ser Ala Trp Asp 370 375 380	1152
50	tct tca gac aga agc tgg gcc agc act gtg gac tcc tcc tgg gac agg Ser Ser Asp Arg Ser Trp Ala Ser Thr Val Asp Ser Ser Trp Asp Arg 385 390 395 400	1200
55	gct ggg tcc tct ggc tat ttg gct gag aag ggg cca ggc caa ggg ccg	1248

65

ES 2 334 888 T3

	Ala Gly Ser Ser Gly Tyr Leu Ala Glu Lys Gly Pro Gly Gln Gly Pro	
	405 410 415	
5		
	ggt ggg gat ggg cac caa gaa tct ctc cca cca cct gaa ttc tcc aag	1296
	Gly Gly Asp Gly His Gln Glu Ser Leu Pro Pro Pro Glu Phe Ser Lys	
10	420 425 430	
	gac tcg ggt ttc ctg gaa gag ctc cca gaa gat aac ctc tcc tcc tgg	1344
	Asp Ser Gly Phe Leu Glu Glu Leu Pro Glu Asp Asn Leu Ser Ser Trp	
15	435 440 445	
	gcc acc tgg ggc acc tta cca ccg gag ccg aat ctg gtc cct ggg gga	1392
20	Ala Thr Trp Gly Thr Leu Pro Pro Glu Pro Asn Leu Val Pro Gly Gly	
	450 455 460	
	ccc cca gtt tct ctt cag aca ctg acc ttc tgc tgg gaa agc agc cct	1440
25	Pro Pro Val Ser Leu Gln Thr Leu Thr Phe Cys Trp Glu Ser Ser Pro	
	465 470 475 480	
	gag gag gaa gag gag gcg agg gaa tca gaa att gag gac agc gat gcg	1488
30	Glu Glu Glu Glu Glu Ala Arg Glu Ser Glu Ile Glu Asp Ser Asp Ala	
	485 490 495	
35		
	ggc agc tgg ggg gct gag agc acc cag agg acc gag gac agg ggc cgg	1536
	Gly Ser Trp Gly Ala Glu Ser Thr Gln Arg Thr Glu Asp Arg Gly Arg	
40	500 505 510	
	aca ttg ggg cat tac atg gcc agg tga	1563
45	Thr Leu Gly His Tyr Met Ala Arg *	
	515 520	

<210> 19
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 19

	Met Ala Gly Pro Glu Arg Trp Gly Pro Leu Leu Leu Cys Leu Leu Gln
	1 5 10 15
60	Ala Ala Pro Gly Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu
	20 25 30

65

ES 2 334 888 T3

	Leu	Ser	Gln	Asn	Phe	Ser	Val	Tyr	Leu	Thr	Trp	Leu	Pro	Gly	Leu	Gly
			35					40				45				
5	Asn	Pro	Gln	Asp	Val	Thr	Tyr	Phe	Val	Ala	Tyr	Gln	Ser	Ser	Pro	Thr
	50						55					60				
	Arg	Arg	Arg	Trp	Arg	Glu	Val	Glu	Glu	Cys	Ala	Gly	Thr	Lys	Glu	Leu
10	65					70				75					80	
	Leu	Cys	Ser	Met	Met	Cys	Leu	Lys	Lys	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asn	Lys	Phe
					85					90					95	
15	Lys	Gly	Arg	Val	Arg	Thr	Val	Ser	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Pro	Trp	Val
				100					105					110		
	Glu	Ser	Glu	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Leu	Phe	Glu	Val	Glu	Pro	Ala	Pro	Pro
				115					120				125			
20	Val	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Glu	Glu	Ile	Leu	Ser	Ala	Asn	Ala	Thr
	130						135					140				
	Tyr	Gln	Leu	Pro	Pro	Cys	Met	Pro	Pro	Leu	Asp	Leu	Lys	Tyr	Glu	Val
25	145					150					155				160	
	Ala	Phe	Trp	Lys	Glu	Gly	Ala	Gly	Asn	Lys	Thr	Leu	Phe	Pro	Val	Thr
					165					170					175	
30	Pro	His	Gly	Gln	Pro	Val	Gln	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Ser	Glu
				180					185					190		
	His	His	Cys	Leu	Ser	Ala	Arg	Thr	Ile	Tyr	Thr	Phe	Ser	Val	Pro	Lys
			195					200					205			
35	Tyr	Ser	Lys	Phe	Ser	Lys	Pro	Thr	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Val	Pro	Glu
	210						215					220				
	Ala	Asn	Trp	Ala	Phe	Leu	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu
40	225					230					235				240	
	Val	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Trp	Lys	Thr	Leu	Met	Gly	Asn	Pro
					245					250					255	
45	Trp	Phe	Gln	Arg	Ala	Lys	Met	Pro	Arg	Ala	Leu	Asp	Phe	Ser	Gly	His
				260					265						270	
	Thr	His	Pro	Val	Ala	Thr	Phe	Gln	Pro	Ser	Arg	Pro	Glu	Ser	Val	Asn
				275				280					285			
50	Asp	Leu	Phe	Leu	Cys	Pro	Gln	Lys	Glu	Leu	Thr	Arg	Gly	Val	Arg	Pro
	290						295					300				
	Thr	Pro	Arg	Val	Arg	Ala	Pro	Ala	Thr	Gln	Gln	Thr	Arg	Trp	Lys	Lys
55	305					310					315				320	
	Asp	Leu	Ala	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Asp	Thr	Glu	Asp
					325					330					335	
60	Gly	Val	Ser	Phe	Gln	Pro	Tyr	Ile	Glu	Pro	Pro	Ser	Phe	Leu	Gly	Gln
				340					345					350		
	Glu	His	Gln	Ala	Pro	Gly	His	Ser	Glu	Ala	Gly	Gly	Val	Asp	Ser	Gly
65				355				360					365			

ES 2 334 888 T3

Arg Pro Arg Ala Pro Leu Val Pro Ser Glu Gly Ser Ser Ala Trp Asp
 370 375 380
 5 Ser Ser Asp Arg Ser Trp Ala Ser Thr Val Asp Ser Ser Trp Asp Arg
 385 390 395 400
 Ala Gly Ser Ser Gly Tyr Leu Ala Glu Lys Gly Pro Gly Gln Gly Pro
 405 410 415
 10 Gly Gly Asp Gly His Gln Glu Ser Leu Pro Pro Pro Glu Phe Ser Lys
 420 425 430
 Asp Ser Gly Phe Leu Glu Glu Leu Pro Glu Asp Asn Leu Ser Ser Trp
 435 440 445
 15 Ala Thr Trp Gly Thr Leu Pro Pro Glu Pro Asn Leu Val Pro Gly Gly
 450 455 460
 20 Pro Pro Val Ser Leu Gln Thr Leu Thr Phe Cys Trp Glu Ser Ser Pro
 465 470 475 480
 Glu Glu Glu Glu Glu Ala Arg Glu Ser Glu Ile Glu Asp Ser Asp Ala
 485 490 495
 25 Gly Ser Trp Gly Ala Glu Ser Thr Gln Arg Thr Glu Asp Arg Gly Arg
 500 505 510
 30 Thr Leu Gly His Tyr Met Ala Arg
 515 520

<210> 20
 35 <211> 674
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 40 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(633)
 45 <400> 20

atg gcg ggg ccc gag cgc tgg ggc ccc ctg ctc ctg tgc ctg ctg cag 48
 50 Met Ala Gly Pro Glu Arg Trp Gly Pro Leu Leu Leu Cys Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 gcc gct cca ggg agg ccc cgt ctg gcc cct ccc cag aat gtg acg ctg 96
 55 Ala Ala Pro Gly Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu
 20 25 30
 60 ctc tcc cag aac ttc agc gtg tac ctg aca tgg ctc cca ggg ctt ggc 144
 Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly
 35 40 45
 65

ES 2 334 888 T3

5	aac ccc cag gat gtg acc tat ttt gtg gcc tat cag agc tct ccc acc Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr	192
	50 55 60	
10	cgt aga cgg tgg cgc gaa gtg gaa gag tgt gcg gga acc aag gag ctg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu	240
	65 70 75 80	
15	cta tgt tct atg atg tgc ctg aag aaa cag gac ctg tac aac aag ttc Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe	288
	85 90 95	
20	aag gga cgc gtg cgg acg gtt tct ccc agc tcc aag tcc ccc tgg gtg Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val	336
	100 105 110	
25	gag tcc gaa tac ctg gat tac ctt ttt gaa gtg gag ccg gcc cca cct Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro	384
	115 120 125	
30	gtc ctg gtg ctc acc cag acg gag gag atc ctg agt gcc aat gcc acg Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr	432
	130 135 140	
35	tac cag ctg ccc ccc tgc atg ccc cca ctg gat ctg aag tat gag gtg Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Val	480
	145 150 155 160	
40	gca ttc tgg aag gag ggg gcc gga aac aag gtg gga agc tcc ttt cct Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Val Gly Ser Ser Phe Pro	528
	165 170 175	
45	gcc ccc agg cta ggc ccg ctc ctc cac ccc ttc tta ctc agg ttc ttc Ala Pro Arg Leu Gly Pro Leu Leu His Pro Phe Leu Leu Arg Phe Phe	576
	180 185 190	
50	tca ccc tcc cag cct gct cct gca ccc ctc ctc cag gaa gtc ttc cct Ser Pro Ser Gln Pro Ala Pro Ala Pro Leu Leu Gln Glu Val Phe Pro	624
	195 200 205	
55	gta cac tcc tgacttctgg cagtcagccc taataaaatc tgatcaaagt Val His Ser	673
	210	
60	a	674

ES 2 334 888 T3

<210> 21
 <211> 211
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 21

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

<210> 22
 55 <211> 1422
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Proteína de fusión Zcytor17-Fc4
 65 <221> CDS
 <222> (1)...(1422)

ES 2 334 888 T3

<400> 22

5	atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15	48
10	gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg 20 25 30	96
15	ttc cgt aga tcc agg ccc cgt ctg gcc cct ccc cag aat gtg acg ctg Phe Arg Arg Ser Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu 35 40 45	144
20	ctc tcc cag aac ttc agc gtg tac ctg aca tgg ctc cca ggg ctt ggc Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly 50 55 60	192
25	aac ccc cag gat gtg acc tat ttt gtg gcc tat cag agc tct ccc acc Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr 65 70 75 80	240
30	cgt aga cgg tgg cgc gaa gtg gaa gag tgt gcg gga acc aag gag ctg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu 85 90 95	288
35	cta tgt tct atg atg tgc ctg aag aaa cag gac ctg tac aac aag ttc Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe 100 105 110	336
40	aag gga cgc gtg cgg acg gtt tct ccc agc tcc aag tcc ccc tgg gtg Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val 115 120 125	384
45	gag tcc gaa tac ctg gat tac ctt ttt gaa gtg gag ccg gcc cca cct Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro 130 135 140	432

55

60

65

ES 2 334 888 T3

5	gtc ctg gtg ctc acc cag acg gag gag atc ctg agt gcc aat gcc acg Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr 145 150 155 160	480
10	tac cag ctg ccc ccc tgc atg ccc cca ctg gat ctg aag tat gag gtg Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Val 165 170 175	528
15	gca ttc tgg aag gag ggg gcc gga aac aag acc cta ttt cca gtc act Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Thr Leu Phe Pro Val Thr 180 185 190	576
20	ccc cat ggc cag cca gtc cag atc act ctc cag cca gct gcc agc gaa Pro His Gly Gln Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser Glu 195 200 205	624
25	cac cac tgc ctc agt gcc aga acc atc tac acg ttc agt gtc ccg aaa His His Cys Leu Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro Lys 210 215 220	672
30	tac agc aag ttc tct aag ccc acc tgc ttc ttg ctg gag gtc cca gaa Tyr Ser Lys Phe Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro Glu 225 230 235 240	720
35	gcc aac tgg aga tct tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca Ala Asn Trp Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro 245 250 255	768
40	gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 260 265 270	816
45	ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 275 280 285	864
50	gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr 290 295 300	912
55	gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 305 310 315 320	960

ES 2 334 888 T3

5	cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	1008
	325 330 335	
10	cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	1056
	340 345 350	
15	gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	1104
	355 360 365	
20	ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu	1152
	370 375 380	
25	acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	1200
	385 390 395 400	
30	agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	1248
	405 410 415	
35	tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	1296
	420 425 430	
40	tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	1344
	435 440 445	
45	ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln	1392
	450 455 460	
50	aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *	1422
	465 470	
55		
60	<210> 23	
	<211> 473	
	<212> PRT	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 334 888 T3

<400> 23

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

65

ES 2 334 888 T3

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320
 5 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350
 10 Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380
 15 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400
 20 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430
 25 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460
 30 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

35

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

40

<213> Secuencia Artificial

<220>

45

<223> Cebador oligonucleotídico ZC37967

<400> 24

50

gcggatccag gccccgtctg gccctcc

28

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

55

<213> Secuencia Artificial

<220>

60

<223> Cebador oligonucleotídico ZC37972

<400> 25

65

gcagatctcc agttggttc tgggacctcc

30

ES 2 334 888 T3

	<210> 26	
	<211> 23	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC37685	
10	<400> 26	
	ccagccctac attgaaccac ctt	23
15	<210> 27	
	<211> 22	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC37681	
25	<400> 27	
	cctcgccctcc tcttctctct ca	22
30	<210> 28	
	<211> 1560	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> Secuencia nucleotídica degenerada de SEC. ID NO:19	
	<221> característica_misclánea	
	<222> (1)...(1560)	
45	<223> n = A,T,C o G	
50		
55		
60		
65		

ES 2 334 888 T3

<400> 28

5	atggcnggnc	cngarmgntg	gggnccnytn	ytntyntgyy	tnytnccargc	ngcncnggn	60
	mgncnmgny	tngcncncc	ncaraaygt	acnytnytnw	sncaraaytt	ywsngtntay	120
	ytnacntggy	tncnggny	nggnaayccn	cargaygt	cntayttygt	ngcntaycar	180
	wsnwsnccna	cnmgmgnmg	ntggmgngar	gtngargart	gygcnggnac	naargarytn	240
10	ytntgywsna	tgatgtgyyt	naaraarcar	gaytntaya	ayaarttyaa	rggnmgngtn	300
	mgnaengtnw	sccnwsnws	naarwsnccn	tgggtngarw	sngartayyt	ngaytayytn	360
	ttygargtn	arccngcnc	nccngtnytn	gtnytnacnc	aracngarga	rathytnwsn	420
15	gcnaaygcna	cntaycaryt	nccncntgy	atgccncny	tngayytnaa	rtaygargtn	480
	gcnttytgga	argargngc	nggnaayaar	acnytnntyc	cngtnacnc	ncayggncar	540
	ccngtncara	thacnytnca	rccngcngcn	wsngarcayc	aytggytnws	ngcnmgnaen	600
20	athtayacnt	tywsngtncc	naartaywsn	aarttywsna	arccnacntg	yttyytnytn	660
	gargtnccng	argcnaaytg	ggcnttyytn	gtnytnccnw	snytnytnat	hytnytnytn	720
	gtnathgcng	cnggngnggt	nathtggaar	acnytnatgg	gnaayccntg	gtytcarmgn	780
25	gcnaaratgc	cnmgngcny	ngayttywsn	ggncayacnc	ayccngtngc	nacnttycar	840
	ccnwsnmgnc	cngarwsngt	naaygayytn	ttyytntgyc	cncaraarga	rytnacnmgn	900
	ggngtnmgnc	cnacnccnmg	ngtnmgngcn	ccngcnacnc	arcaracnmg	ntggaaraar	960
	gaytngcng	argaygarga	rgargargay	gargargaya	cngargaygg	ngtnwsntty	1020
30	carccntaya	thgarccncc	nwsnttyytn	ggncargarc	aycargcnc	nggncaywsn	1080
	gargcnggng	gngtngayws	nggnmgncn	mgngcncny	tngtnccnws	ngarggnwsn	1140
	wsngcntggg	aywsnwsnga	ymgnwsntgg	gcnwsnacng	tngaywsnws	ntgggaymgn	1200
35	gcnggnwsnw	snggntayyt	ngcngaraar	ggncnggnc	arggncngg	nggngaygg	1260
	caycargarw	snytnccncc	nccngartty	wsnaargayw	snggnttyyt	ngargarytn	1320
	ccngargaya	ayytnwsnws	ntgggcnacn	tggggnacny	tccnccnga	rccnaayytn	1380
	gtncnggng	gnccncngt	nwsnytnear	acnytnacnt	tytgytgga	rwsnwsnccn	1440
40	gargargarg	argargcnmg	ngarwsngar	athgargayw	sngaygcngg	nwsntggggn	1500
	gcngarwsna	cncarmgnac	ngargaymgn	ggnmgnacny	tggncayta	yatggcnmgn	1560

45

<210> 29

<211> 633

<212> DNA

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica degenerada de SEC. ID NO:21

55

<221> característica_misclánea

<222> (1)...(633)

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

60

65

ES 2 334 888 T3

<400> 29

	atggcnggnc cngarmgntg gggncnytn ytnytntggy tnytnargc ngcncnggn	60
5	mgncnmgny tngcncncc ncaraaygt acnytnytnw snaraaytt ywsngtntay	120
	ytnacntggy tncnggnyt nggnaayccn cargaygt na cntayttygt ngcntaycar	180
	wsnwsnccna cnmgmngmng ntggmgngar gtngargart gygcnggnac naargarytn	240
10	ytnatgywsna tgatgtgyt naaraarcar gayytnaya ayaarttyaa rggmngngtn	300
	mgnaengtnw snccnwsnws naarwsnccn tgggtngarw sngartayyt ngaytayytn	360
	ttygargtn arcncncnc nccngtnytn gtynytnacn aracngarga rathytnwsn	420
	gcnaaygcna cntaycaryt nccncntgy atgccncny tngayytnaa rtaygargtn	480
15	gcnttytgga argarggngc nggnaayaar gtnggnwsnw snttyccngc nccnmgnytn	540
	ggncnytny tncayccntt yytnytnmgn ttytywsnc cnwsncarcc ngcncngcn	600
	ccnytnytn argargtntt yccngtnay wsn	633

20

<210> 30

<211> 64

<212> DNA

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<223> Cebador oligonucleotídico ZC39204

<400> 30

35	tcaccacgcg aattcggtag cgctggttcc gcgtggatcc aggccccgtc tggccctcc	60
	ccag	64

<210> 31

40

<211> 64

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC39205

<400> 31

50

	tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca ccagttggct tctgggacct	60
	ccag	64

55

<210> 32

<211> 1922

<212> DNA

60

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica de la proteína de fusión MBP-zcytor19 humano

65

<221> CDS

<222> (123)...(1922)

ES 2 334 888 T3

<400> 32

	ttgacaatta atcatcggct cgtataatgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca	60
5	caggaaacag ccagtcggt taggtgtttt cagcagcact tcaccaacaa ggaccataga	120
	tt atg aaa act gaa gaa ggt aaa ctg gta atc tgg att aac ggc gat	167
	Met Lys Thr Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp	
10	1 5 10 15	
	aaa ggc tat aac ggt ctc gct gaa gtc ggt aag aaa ttc gag aaa gat	215
15	Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp	
	20 25 30	
	acc gga att aaa gtc acc gtt gag cat ccg gat aaa ctg gaa gag aaa	263
20	Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys	
	35 40 45	
	ttc cca cag gtt gcg gca act ggc gat ggc cct gac att atc ttc tgg	311
25	Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp	
	50 55 60	
	gca cac gac cgc ttt ggt ggc tac gct caa tct ggc ctg ttg gct gaa	359
30	Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu	
	65 70 75	
	atc acc ccg gac aaa gcg ttc cag gac aag ctg tat ccg ttt acc tgg	407
35	Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp	
	80 85 90 95	
	gat gcc gta cgt tac aac ggc aag ctg att gct tac ccg atc gct gtt	455
40	Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val	
	100 105 110	
	gaa gcg tta tcg ctg att tat aac aaa gat ctg ctg ccg aac ccg cca	503
45	Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro	
	115 120 125	
	aaa acc tgg gaa gag atc ccg gcg ctg gat aaa gaa ctg aaa gcg aaa	551
50	Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys	
	130 135 140	
	ggc aag agc gcg ctg atg ttc aac ctg caa gaa ccg tac ttc acc tgg	599
55	Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp	
	145 150 155	
	ccg ctg att gct gct gac ggg ggt tat gcg ttc aag tat gaa aac ggc	647
60	Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly	
	160 165 170 175	
65		

ES 2 334 888 T3

5	aag tac gac att aaa gac gtg ggc gtg gat aac gct ggc gcg aaa gcg Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala 180 185 190	695
10	ggt ctg acc ttc ctg gtt gac ctg att aaa aac aaa cac atg aat gca Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala 195 200 205	743
15	gac acc gat tac tcc atc gca gaa gct gcc ttt aat aaa ggc gaa aca Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr 210 215 220	791
20	gcg atg acc atc aac ggc ccg tgg gca tgg tcc aac atc gac acc agc Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser 225 230 235	839
25	aaa gtg aat tat ggt gta acg gta ctg ccg acc ttc aag ggt caa cca Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro 240 245 250 255	887
30	tcc aaa ccg ttc gtt ggc gtg ctg agc gca ggt att aac gcc gcc agt Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser 260 265 270	935
35	ccg aac aaa gag ctg gca aaa gag ttc ctc gaa aac tat ctg ctg act Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr 275 280 285	983
40	gat gaa ggt ctg gaa gcg gtt aat aaa gac aaa ccg ctg ggt gcc gta Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val 290 295 300	1031
45	gcg ctg aag tct tac gag gaa gag ttg gcg aaa gat cca cgt att gcc Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala 305 310 315	1079
50	gcc acc atg gaa aac gcc cag aaa ggt gaa atc atg ccg aac atc ccg Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro 320 325 330 335	1127
55	cag atg tcc gct ttc tgg tat gcc gtg cgt act gcg gtg atc aac gcc	1175

ES 2 334 888 T3

	Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala	
	340 345 350	
5		
	gcc agc ggt cgt cag act gtc gat gaa gcc ctg aaa gac gcg cag act	1223
	Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr	
10	355 360 365	
	aat tcg agc tcc cac cat cac cat cac cac gcg aat tcg gta ccg ctg	1271
	Asn Ser Ser Ser His His His His His His Ala Asn Ser Val Pro Leu	
15	370 375 380	
	gtt ccg cgt gga tcc agg ccc cgt ctg gcc cct ccc cag aat gtg acg	1319
20	Val Pro Arg Gly Ser Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr	
	385 390 395	
	ctg ctc tcc cag aac ttc agc gtg tac ctg aca tgg ctc cca ggg ctt	1367
25	Leu Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu	
	400 405 410 415	
	ggc aac ccc cag gat gtg acc tat ttt gtg gcc tat cag agc tct ccc	1415
30	Gly Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro	
	420 425 430	
35		
	acc cgt aga cgg tgg cgc gaa gtg gaa gag tgt gcg gga acc aag gag	1463
	Thr Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu	
40	435 440 445	
	ctg cta tgt tct atg atg tgc ctg aag aaa cag gac ctg tac aac aag	1511
45	Leu Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys	
	450 455 460	
	ttc aag gga cgc gtg cgg acg gtt tct ccc agc tcc aag tcc ccc tgg	1559
50	Phe Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp	
	465 470 475	
	gtg gag tcc gaa tac ctg gat tac ctt ttt gaa gtg gag ccg gcc cca	1607
55	Val Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro	
	480 485 490 495	
60	cct gtc ctg gtg ctc acc cag acg gag gag atc ctg agt gcc aat gcc	1655
	Pro Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala	
	500 505 510	
65		

ES 2 334 888 T3

```

5      acg tac cag ctg ccc ccc tgc atg ccc cca ctg gat ctg aag tat gag      1703
      Thr Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu
      515                                520                                525

10     gtg gca ttc tgg aag gag ggg gcc gga aac aag acc cta ttt cca gtc      1751
      Val Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Thr Leu Phe Pro Val
      530                                535                                540

15     act ccc cat ggc cag cca gtc cag atc act ctc cag cca gct gcc agc      1799
      Thr Pro His Gly Gln Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser
      545                                550                                555

20     gaa cac cac tgc ctc agt gcc aga acc atc tac acg ttc agt gtc ccg      1847
      Glu His His Cys Leu Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro
      560                                565                                570                                575

25     aaa tac agc aag ttc tct aag ccc acc tgc ttc ttg ctg gag gtc cca      1895
      Lys Tyr Ser Lys Phe Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro
      580                                585                                590

30     gaa gcc aac tgg tgt ttt ggc gga tga      1922
      Glu Ala Asn Trp Cys Phe Gly Gly *
      595

35
<210> 33
<211> 599
40 <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
45 <223> Secuencia polipeptídica de la proteína de fusión MBP-zcytor19 humano

    <400> 33

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

65

```

ES 2 334 888 T3

	His	Asp	Arg	Phe	Gly	Gly	Tyr	Ala	Gln	Ser	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Ile	
	65					70					75					80	
5	Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Phe	Gln	Asp	Lys	Leu	Tyr	Pro	Phe	Thr	Trp	Asp	
					85					90						95	
	Ala	Val	Arg	Tyr	Asn	Gly	Lys	Leu	Ile	Ala	Tyr	Pro	Ile	Ala	Val	Glu	
10					100					105					110		
	Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Asn	Pro	Pro	Lys	
					115				120					125			
15	Thr	Trp	Glu	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Lys	Glu	Leu	Lys	Ala	Lys	Gly	
					130				135					140			
	Lys	Ser	Ala	Leu	Met	Phe	Asn	Leu	Gln	Glu	Pro	Tyr	Phe	Thr	Trp	Pro	
20						150					155					160	
	Leu	Ile	Ala	Ala	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ala	Phe	Lys	Tyr	Glu	Asn	Gly	Lys	
					165					170						175	
25	Tyr	Asp	Ile	Lys	Asp	Val	Gly	Val	Asp	Asn	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala	Gly	
					180				185						190		
	Leu	Thr	Phe	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Lys	Asn	Lys	His	Met	Asn	Ala	Asp	
					195				200						205		
30	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Ala	Glu	Ala	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Glu	Thr	Ala	
						215							220				
	Met	Thr	Ile	Asn	Gly	Pro	Trp	Ala	Trp	Ser	Asn	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	
35						230					235					240	
	Val	Asn	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Pro	Thr	Phe	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	
					245					250						255	
40	Lys	Pro	Phe	Val	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Gly	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Pro	
					260				265						270		
	Asn	Lys	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu	Leu	Thr	Asp	
					275				280						285		
45	Glu	Gly	Leu	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Ala	
						295							300				
	Leu	Lys	Ser	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Asp	Pro	Arg	Ile	Ala	Ala	
50						310					315					320	
	Thr	Met	Glu	Asn	Ala	Gln	Lys	Gly	Glu	Ile	Met	Pro	Asn	Ile	Pro	Gln	
					325					330						335	
55	Met	Ser	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ala	Val	Arg	Thr	Ala	Val	Ile	Asn	Ala	Ala	
					340				345						350		
	Ser	Gly	Arg	Gln	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	Thr	Asn	
					355				360					365			
60	Ser	Ser	Ser	His	His	His	His	His	His	Ala	Asn	Ser	Val	Pro	Leu	Val	
						375						380					
	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Pro	Arg	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	Asn	Val	Thr	Leu	
65						390						395				400	

ES 2 334 888 T3

Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly
 405 410 415
 5 Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr
 420 425 430
 Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu
 435 440 445
 10 Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe
 450 455 460
 Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val
 15 465 470 475 480
 Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro
 485 490 495
 20 Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr
 500 505 510
 Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Val
 25 515 520 525
 Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Thr Leu Phe Pro Val Thr
 530 535 540
 30 Pro His Gly Gln Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser Glu
 545 550 555 560
 His His Cys Leu Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro Lys
 565 570 575
 35 Tyr Ser Lys Phe Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro Glu
 580 585 590
 Ala Asn Trp Cys Phe Gly Gly
 40 595

<210> 34
 <211> 20
 45 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 50 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(20)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 55 <400> 34

Ser Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Xaa Val Thr Leu Leu Ser Gln
 60 1 5 10 15
 Asn Phe Ser Val
 20
 65

ES 2 334 888 T3

	<210> 35	
	<211> 24	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC40285	
10	<400> 35	
	gccccagcca cccaacagac aaga	24
15	<210> 36	
	<211> 24	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC40286	
25	<400> 36	
	ccaggtggcc caggaggaga gggt	24
30	<210> 37	
	<211> 24	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC39128	
40	<400> 37	
	ggcatggaag ataatgaaag gaaa	24
45	<210> 38	
	<211> 24	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC39129	
55	<400> 38	
	gccgtcactc ccaactgggg atgt	24
60	<210> 39	
	<211> 25	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 334 888 T3

	<220>		
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC40784		
5	<400> 39		
	ggatagtgtt ttgagtttct gtgga		25
10	<210> 40		
	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC40785		
20	<400> 40		
	accaggagtt caaggtaac cttgg		25
25	<210> 41		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC40786		
35	<400> 41		
	gggaattcct gcagaaactc agta		24
40	<210> 42		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC40787		
50	<400> 42		
	cccttctgc tccttgact gcgt		24
55	<210> 43		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC39408		
65	<400> 43		
	gcccagctgc atcttctag ago		24

ES 2 334 888 T3

<210> 44
 <211> 25
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC39409
 10
 <400> 44

 gggcattgcc aggacagctc tttg 25
 15
 <210> 45
 <211> 121
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido inoperante zcytor19 directo
 25
 <400> 45

 30 cacctgccgc ccaggggcct tgcggcgggc ggcggggacc ccagggaccg aaggccatag 60
 cggccggccc ctaggatccg aattctagaa gctttgtgtc tcaaaatctc tgatgttaca 120
 t 121

 35 <210> 46
 <211> 125
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido inoperante zcytor19 inverso
 45
 <400> 46

 50 cacctgccgc ccaggggcct tgcggcgggc ggcggggacc ccagggaccg aaggccatag 60
 cggccggccc ctaggatccg aattctagaa gctttgtgtc tcaaaatctc tgatgttaca 120
 t 121

 55 <210> 47
 <211> 22
 <212> DNA
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC38481
 65
 <400> 47

 cctcctcca gaatgccacc tc 22

ES 2 334 888 T3

	<210> 48	
	<211> 25	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC38626	
10	<400> 48	
	ctgctatgtt ctatgatgtg cctga	25
15	<210> 49	
	<211> 22	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC38706	
25	<400> 49	
	ggaagataat gaaaggaaac cc	22
30	<210> 50	
	<211> 21	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC38711	
40	<400> 50	
	tatgaggagt cccctgtgct g	21
45		
50		
55		
60		
65		