



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 268**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95942913 .5**

86 Fecha de presentación : **27.11.1995**

87 Número de publicación de la solicitud: **0797664**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.1997**

54 Título: **Uso de un receptor de la interleuquina 11 humana.**

30 Prioridad: **22.12.1994 US 362304**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

73 Titular/es: **Genetics Institute, L.L.C.**
87 Cambridge Park Drive
Cambridge, Massachusetts 02140, US

72 Inventor/es: **Tobin, James F.**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 275 268 T3

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

Uso de un receptor de la interleuquina 11 humana.

5 **Campo de la invención**

La presente invención está relacionada con el uso de una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en (a) la secuencia de aminoácidos de ID de SEC N°:2; y (b) la secuencia de aminoácidos de ID de SEC N°:2 de los aminoácidos 24 a 422; o producida por una célula huésped transformada con las secuencias de polinucleótidos que codifican dichas proteínas, y un transportador farmacéuticamente aceptable, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir la pérdida de masa ósea en un sujeto mamífero.

Antecedentes de la invención

Se han identificado varias moléculas reguladoras, conocidas como citoquinas, lo que incluye la interleuquina-11 (IL-11). Las diferentes formas de la proteína IL-11 y los DNA que codifican las diferentes formas de actividad de la IL-11 se describen en Bennett *et al.*, USPN 5.215.895 (1 de junio de 1993); McCoy *et al.*, USPN 5.270.181 (14 de diciembre de 1993); y McCoy *et al.*, USPN 5.292.646 (8 de marzo de 1994), todos incorporados aquí como referencia. Así, el término "IL-11" incluye las proteínas con la actividad biológica descrita en estas patentes, tanto si se han obtenido mediante técnicas de ingeniería genética recombinante: purificadas a partir de células que producen el factor naturalmente o tras la inducción con otros factores, como si se han sintetizado mediante técnicas químicas; o una combinación de lo anterior.

La IL-11 es una citoquina pleiotrópica que se ha implicado en la producción de varias actividades biológicas, lo que incluye: la inducción de la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas multipotenciales (Musashi *et al.* (1991) *Blood*, 78, 1448-1451); la potenciación de la formación de megacariocitos y plaquetas (Burstein *et al.* (1992) *J. Cell. Physiol.*, 153, 305-312); la estimulación de la síntesis de proteínas de fase aguda (Baumann *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 20424-20427); la inhibición de la actividad lipoproteína lipasa de los adipocitos (Kawashima *et al.* (1991) *FEBS Lett.*, 283, 199-202); y efectos sobre el fenotipo neurotransmisor (Fann *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 43-47).

La IL-11 puede utilizarse en una preparación o formulación farmacéutica para tratar deficiencias inmunes, específicamente deficiencias en las células progenitoras hematopoyéticas, o trastornos relacionados con las mismas. También puede utilizarse IL-11 en el tratamiento de otros trastornos o en la estimulación del sistema inmune en las células de los mismos. La IL-11 también puede utilizarse en los métodos para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades. Tales estados patológicos pueden resultar de una enfermedad, exposición a radiación o drogas, y incluyen, por ejemplo, leucopenia, infecciones bacterianas y víricas, anemia, deficiencias de células B o células T como en la deficiencia de células inmunes o de células hematopoyéticas tras un trasplante de médula ósea. La IL-11 también puede utilizarse para potenciar la respuesta inmune a una serie de vacunas, dando lugar a una inmunidad más duradera y más efectiva. El tratamiento terapéutico del cáncer y otras enfermedades con IL-11 puede evitar efectos colaterales no deseados causados por el tratamiento con los fármacos disponibles en la actualidad.

Como la mayoría de las citoquinas, la IL-11 muestra ciertas actividades biológicas a través de su interacción con un receptor de IL-11 (IL-11R) en la superficie de las células diana. Sería interesante la identificación y clonación de la secuencia del receptor humano, de forma que las proteínas IL-11R pudieran producirse para varios usos, lo que incluye la producción de terapéuticos y el cribado de inhibidores de la unión de IL-11 al receptor y de la señalización del receptor.

Resumen de la invención

La especificación describe los polinucleótidos que codifican el receptor de la interleuquina-11 humana. La especificación también describe un polinucleótido aislado que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de entre el grupo que consiste en:

(a) la secuencia nucleotídica con ID de SEC N°:1 del nucleótido 803 al nucleótido 1999;

(b) una secuencia nucleotídica que es diferente de la secuencia de la secuencia nucleotídica especificada en (a) como resultado de la degeneración del código genético; y

(c) una variante alélica de la secuencia nucleotídica especificada en (a). La secuencia nucleotídica descrita codifica una proteína con una actividad biológica del receptor de IL-11 humana. La secuencia nucleotídica puede estar ligada operativamente a una secuencia de control de la expresión. El polinucleótido descrito comprende la secuencia nucleotídica de ID de SEC N°:1 del nucleótido 803 al nucleótido 1999 o un fragmento de la misma; la secuencia nucleotídica de ID de SEC N°:1 del nucleótido 803 al nucleótido 1828 o un fragmento de la misma; la secuencia nucleotídica de ID de SEC N°:1 del nucleótido 1904 al nucleótido 1999 o un fragmento de la misma; la secuencia nucleotídica de ID de SEC N°:1 del nucleótido 734 al nucleótido 1999 o un fragmento de la misma; la secuencia nucleotídica de ID de SEC N°:1 del nucleótido 1067 al nucleótido 1828 o un fragmento de la misma; o la secuencia nucleotídica de ID de SEC N°:1 del nucleótido 1067 al nucleótido 1999 o un fragmento de la misma. El polinucleótido descrito comprende una

ES 2 275 268 T3

secuencia nucleotídica capaz de hibridar con la secuencia nucleotídica de ID de SEC N°:1 bajo condiciones altamente astringentes.

5 La especificación también describe polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica un péptido o proteína que comprenden una secuencia aminoacídica seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- (a) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2;
- 10 (b) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2 del aminoácido 24 al 422;
- (c) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2 del aminoácido 24 al 365;
- (d) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2 del aminoácido 391 al 422;
- 15 (e) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2 del aminoácido 112 al 422;
- (f) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2 del aminoácido 112 al 365; y
- 20 (g) fragmento de (a)-(f) con una actividad biológica del receptor de la IL-11 humana.

También se describen las células huésped, preferiblemente células de mamífero, transformadas con los polinucleótidos.

25 La especificación describe un proceso para producir una proteína IL-11R humana. El proceso comprende:

- (a) el crecimiento de un cultivo de la célula huésped de la presente invención en un medio de cultivo adecuado; y
- 30 (b) la purificación de la proteína IL-11R humana del cultivo.

También se describen proteínas obtenidas de acuerdo con estos métodos.

35 La especificación también describe una proteína IL-11R humana aislada que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- (a) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2;
- 40 (b) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2 del aminoácido 24 al 422;
- (c) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2 del aminoácido 24 al 365;
- (d) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2 del aminoácido 391 al 422;
- 45 (e) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2 del aminoácido 112 al 422;
- (f) la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2 del aminoácido 112 al 365; y

50 (g) fragmentos de (a)-(f) con una actividad biológica del receptor de la IL-11 humana. La proteína puede comprender la secuencia aminoacídica con ID de SEC N°:2; la secuencia del aminoácido 24 al 422 del ID de SEC N°:2; la secuencia del aminoácido 24 al 365 del ID de SEC N°:2; o la secuencia del aminoácido 391 al 422 del ID de SEC N°:2. También se describen las composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de la presente especificación y un transportador farmacéuticamente aceptable.

55 La especificación describe composiciones que comprenden un anticuerpo que reacciona específicamente con una proteína descrita en la presente especificación.

60 También se describen los métodos para la identificación de un inhibidor de la unión de la IL-11 al receptor de la IL-11 humana. Estos métodos comprenden:

- (a) combinar una proteína IL-11R humana o un fragmento de la misma con la IL-11 o un fragmento de la misma, formando dicha combinación una primera mezcla de unión;
- 65 (b) medir la cantidad de unión entre la proteína y la IL-11 o fragmento en esta primera mezcla de unión;
- (c) combinar un compuesto con la proteína y la IL-11 o fragmento para formar una segunda mezcla de unión;

(d) medir la cantidad de unión en la segunda mezcla de unión; y

(e) comparar la cantidad de unión en la primera mezcla de unión con la cantidad de unión en la segunda mezcla de unión;

en la que el compuesto es capaz de inhibir la unión de IL-11 al receptor de la IL-11 humana si aparece una reducción de la cantidad de unión en la segunda mezcla de unión. Opcionalmente, la primera y/o segunda mezcla de unión puede además comprender la gp130 o un fragmento de la misma capaz de unirse a la proteína de la reivindicación 11 o la IL-11 o fragmento utilizado en la misma. Los inhibidores del IL-11R identificados mediante estos métodos y las composiciones farmacéuticas que los contienen también se describen.

También se describen los métodos para inhibir la unión de la IL-11 al receptor de IL-11 humana en un sujeto mamífero, lo que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que contienen una proteína IL-11R humana, un inhibidor del IL-11R o un anticuerpo contra una proteína IL-11R humana.

La presente invención está relacionada con el uso de una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en (a) la secuencia de aminoácidos con ID de SEC N°:2; y (b) la secuencia de aminoácidos con ID de SEC N°:2 del aminoácido 24 al 422; o producida por una célula huésped transformada con las secuencias de polinucleótidos que codifican dichas proteínas, y un transportador farmacéuticamente aceptable, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir la pérdida de masa ósea en un sujeto mamífero.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática de las estructuras del receptor de la IL-11 humana y la gp130.

La Figura 2 presenta los datos que demuestran la actividad biológica de una forma soluble de la proteína IL-11R recombinante humana.

Descripción detallada

La presente especificación describe un polinucleótido que codifica el receptor de la IL-11 humana (IL-11R humano).

El ID de SEC N°:1 proporciona la secuencia nucleotídica de un cDNA que codifica el IL-11R humano. El ID de SEC N°:2 proporciona la secuencia aminoacídica del receptor, incluyendo una secuencia señal putativa de los aminoácidos 1-23. El IL-11R procesado humano se cree tiene la secuencia de los aminoácidos 24-422 del ID de SEC N°:2.

El receptor procesado muestra al menos tres dominios distintos: un dominio extracelular (que comprende aproximadamente los aminoácidos 24-365 del ID de SEC N°:2), un dominio transmembrana (que comprende aproximadamente los aminoácidos 366-390 del ID de SEC N°:2) y un dominio intracelular (que comprende aproximadamente los aminoácidos 391-422 del ID de SEC N°:2). El dominio extracelular está dividido además en un dominio tipo inmunoglobulina (que comprende aproximadamente los aminoácidos 24-111 del ID de SEC N°:2) y un dominio citoquina tipo I (que comprende aproximadamente los aminoácidos 112-365 del ID de SEC N°:2).

También pueden producirse formas solubles de la proteína IL-11R humana. Tales formas solubles incluyen sin limitación a proteínas que comprenden los aminoácidos 1-365 y 24-365 del ID de SEC N°:2. Las formas solubles del IL-11R humano se caracterizan también por ser solubles en solución acuosa; preferiblemente a temperatura ambiente. También pueden producirse proteínas IL-11R humanas que comprenden solo el dominio intracelular o una porción del mismo. Cualquier forma del IL-11R humano de longitud menor a la total está incluida en la presente invención y colectivamente éstas se denominan aquí "IL-11R humano" o "proteínas IL-11R humanas". Las proteínas IL-11R humanas de longitud menor a la total pueden producirse expresando un fragmento correspondiente del polinucleótido que codifica la proteína IL-11R humana completa (ID de SEC N°:1). Estos fragmentos de polinucleótido correspondientes también forman parte de la presente especificación. Pueden obtenerse polinucleótidos modificados como los descritos anteriormente mediante técnicas de biología molecular estándar, lo que incluye la construcción de los mutantes apropiados con la delección deseada, métodos de mutagénesis dirigida o mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores oligonucleótidos adecuados.

En base a la similitud con la estructura del receptor de la IL-6, se puede predecir que las proteínas IL-11R que contienen solo el dominio citoquina tipo I de la región extracelular del receptor completo serán capaces de unirse a la IL-11 e inducir la señalización del receptor. Como resultado, las proteínas IL-11R que comprenden los aminoácidos del 112 al 365 del ID de SEC N°:2, las proteínas IL-11R que comprenden los aminoácidos del 112 al 390 del ID de SEC N°:2 y las proteínas IL-11R que comprenden los aminoácidos del 112 al 422 del ID de SEC N°:2 se describen en la presente especificación. Los polinucleótidos que codifican tales proteínas (como por ejemplo un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos del ID de SEC N°:1 del nucleótido 1067 al nucleótido 1828, un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos del ID de SEC N°:1 del nucleótido 1067 al nucleótido 1906 y, un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos del ID de SEC N°:1 del nucleótido 1067 al nucleótido 1999, respectivamente) también se describen en la especificación.

ES 2 275 268 T3

Para los propósitos de la presente invención, una proteína tiene “una actividad biológica del receptor IL-11 humano” si posee una o más de las siguientes características: (1) la capacidad de unirse a IL-11 o a un fragmento de la misma (preferiblemente un fragmento biológicamente activo de la misma); (2) la capacidad de unirse a proteínas o moléculas citosólicas, involucradas en la vía de señalización desencadenada por la unión de IL-11 al IL-11R humano; (3) la capacidad de producir una señal característica de la unión de la IL-11 al IL-11R humano (en la que la proteína en cuestión contiene una porción capaz de unirse a IL-11 o en la que la proteína en cuestión produciría tal señal junto a otra proteína que es capaz de unirse a IL-11); (4) la capacidad de unirse a gp130 o a un fragmento de la misma (en presencia o ausencia de IL-11); (5) la capacidad de inducir la fosforilación de tirosina en la gp130; (6) la capacidad de inducir la fosforilación de tirosina de las quinasas JAK; o (7) la capacidad de inducir la fosforilación de tirosina de las proteínas de unión a DNA de la familia STAT (Zhong *et al.* (1994) *Science* 264, 95-98). Preferiblemente, la actividad biológica que posee la proteína es la capacidad de unirse a IL-11 o a un fragmento de la misma, más preferiblemente con una K_D de alrededor de 0,1 a alrededor de 100 nM, aún más preferiblemente con una K_D de alrededor de 1 a alrededor de 10 nM.

El IL-11R humano o fragmentos activos del mismo (proteínas IL-11R humanas) pueden fusionarse a moléculas transportadoras como las inmunoglobulinas; Por ejemplo, las formas solubles del IL-11R humano pueden fusionarse a través de secuencias “enlazantes” a la porción Fc de una inmunoglobulina. Pueden utilizarse otras proteínas de fusión, como aquellas con GST, Lex-A o MBP.

La especificación también incluye variaciones alélicas de la secuencia nucleotídica expuesta en el ID de SEC N°:1, es decir, formas alternativas que aparecen naturalmente del polinucleótido aislado del ID de SEC N°:1 que también codifican proteínas IL-11R humanas, preferiblemente aquellas proteínas con una actividad biológica del IL-11R humano. También se incluyen en la especificación los polinucleótidos aislados que hibridan con la secuencia de nucleótidos que muestra el ID de SEC N°:1 bajo condiciones altamente astringentes (por ejemplo, 0,1xSSC a 65°C). Los polinucleótidos aislados que codifican proteínas IL-11R humanas pero que son diferentes de la secuencia nucleotídica que muestra el ID de SEC N°:1 a causa de la degeneración del código genético también están incluidos en la presente invención. Las variaciones en la secuencia nucleotídica expuesta en el ID de SEC N°:1 que son causadas por mutaciones puntuales o y por modificaciones inducidas también se incluyen en la especificación.

Los polinucleótidos aislados de la invención pueden estar ligados operativamente a una secuencia de control de la expresión como los vectores de expresión pMT2 o pED, descritos en Kaufman *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19, 4485-4490 (1991), para producir la proteína IL-11R humana de forma recombinante. En la materia se conocen varias secuencias de control de la expresión adecuadas. Los métodos generales de expresión de proteínas recombinantes también son conocidos y se ejemplifican en R. Kaufman, *Methods in Enzymology* 185, 537-566 (1990). Como se define aquí, “ligado operativamente” significa ligado enzimáticamente o químicamente para formar un enlace covalente entre el polinucleótido aislado de la invención y la secuencia de control de la expresión, de tal forma que la proteína IL-11R humana se exprese en una célula huésped que ha sido transformada (transfectada) con la ligación del polinucleótido y la secuencia de control de la expresión.

Un número de tipos celulares pueden actuar como células huésped adecuadas para la expresión de la proteína IL-11R humana. Puede utilizarse cualquier tipo celular capaz de expresar proteína IL-11R humana funcional. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, las células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón humanas 293, células epidérmicas humanas A431, células Colo205 humanas, células 3T3, células CV-1, otras líneas celulares transformadas de primate, células diploides normales, cepas de células derivadas a partir de cultivos *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HeLa, células L de ratón, células BHK, HL-60, U937, HaK, Rat2, BaF3, 32D, FDCEP-1, PC12, M1x o C2C12.

La proteína IL-11R humana también puede obtenerse ligando operativamente el polinucleótido aislado de la invención a secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insecto, y utilizando un sistema de expresión de insecto. Los materiales y métodos para los sistemas de expresión de baculovirus/ células de insecto están disponibles comercialmente en forma de equipos de, por ejemplo, Invitrogen, San Diego, California, USA (el equipo MaxBac®), y tales métodos son bien conocidos en la materia, como se describe en Summers y Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)*, incorporado aquí como referencia. Las formas solubles de la proteína IL-11R humana también pueden producirse en células de insecto utilizando los polinucleótidos aislados apropiados como se ha descrito anteriormente.

Alternativamente, la proteína IL-11R humana puede obtenerse en eucariotas inferiores como las levaduras o en procariotas como las bacterias. Las cepas de levadura adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. Las cepas bacterianas adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar proteínas heterólogas.

La expresión en las bacterias puede resultar en la formación de cuerpos de inclusión que incorporan la proteína recombinante. Así, puede ser necesario un nuevo plegamiento de la proteína recombinante para producir material activo o más activo.

En la materia son conocidos varios métodos para la obtención de proteínas heterólogas correctamente plegadas a partir de cuerpos de inclusión bacterianos. Estos métodos generalmente involucran la solubilización de la proteína a

ES 2 275 268 T3

partir de los cuerpos de inclusión, luego una desnaturalización completa de la proteína utilizando un agente caotrópico. Cuando están presentes residuos de cisteína en la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína, es a menudo necesario realizar el replegamiento en un ambiente que permita la correcta formación de puentes disulfuro (un sistema rédox). Los métodos generales de replegamiento se describen en Kohno, *Meth. Enzym.*, 185:187-195 (1990). La PE 5 0433225 y la solicitud copendiente USSN 08/163,877 describen otros métodos adecuados.

La proteína IL-11R humana de la invención también puede expresarse como un producto en animales transgénicos, por ejemplo como un componente de la leche de vacas, cabras, cerdos u ovejas transgénicas que se caracterizan por tener células somáticas o germinales que contienen una secuencia polinucleotídica que codifica la proteína IL-11R humana. 10

La proteína IL-11R humana de la invención puede obtenerse mediante el crecimiento de un cultivo de células huésped transformadas bajo las condiciones de cultivo necesarias para expresar la proteína deseada. La proteína expresada resultante puede entonces purificarse a partir del medio de cultivo o los extractos celulares. Las formas solubles de la proteína IL-11R humana de la invención pueden purificarse a partir de medios condicionados. Las 15 formas unidas a la membrana de la proteína IL-11R humana de la invención pueden purificarse mediante la preparación de una fracción total de membrana de las células que las expresan y extrayendo las membranas con un detergente no iónico como el Triton X-100.

La proteína IL-11R humana puede purificarse utilizando métodos conocidos para los expertos versados en la materia. Por ejemplo, la proteína IL-11R humana de la invención puede concentrarse utilizando un filtro de concentrado de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras el paso de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación como un medio de gel filtración. Alternativamente, puede utilizarse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato con grupos dietilaminoetil(DEAE) o polietilenimina (PEI) fijados. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos normalmente utilizados en la purificación de proteínas. Alternativamente, puede utilizarse un paso de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Son preferibles los grupos sulfopropilo (por ejemplo, columnas de S-Sepharose®). La purificación de la proteína IL-11R humana a partir de sobrenadantes de cultivo puede también incluir uno o más pasos a través de columnas con tales resinas de afinidad como la agarosa-concanavalina A, toyopearl®-heparina o Sepharose® 3GA Cibacrom blue; o mediante cromatografía de interacción hidrofóbica utilizando tales resinas como el fenil éter, butil éter, o propil éter; o mediante cromatografía de inmunoafinidad. Finalmente, pueden utilizarse uno o más pasos de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) utilizando medios de RP-HPLC hidrofóbicos, por ejemplo, gel de sílice con grupos metilo u otros grupos alifáticos fijados, para purificar 25 más la proteína IL-11R humana. También pueden utilizarse columnas de afinidad que contienen la IL-11 o fragmentos de la misma, o que contienen anticuerpos contra la proteína IL-11R en la purificación de acuerdo con los métodos conocidos. También pueden utilizarse algunos de los pasos de purificación anteriores, en diferentes combinaciones o con otros métodos conocidos, para proporcionar una proteína recombinante aislada sustancialmente purificada. Preferiblemente, la proteína IL-11R humana aislada se purifica de modo que esté sustancialmente libre de otras proteínas de mamífero. 30 35 40

Las proteínas IL-11R humanas de la especificación también pueden utilizarse para buscar agentes capaces de unirse a la IL-11R humana o interferir en la unión de IL-11 con el IL-11R humano (bien el dominio extracelular o intracelular) y por lo tanto puedan actuar como inhibidores de la unión y acción normales de la citoquina (inhibidores de IL-11R). Los ensayos de unión que utilizan una proteína de unión deseada, inmovilizada o no, son bien conocidos en la materia y pueden utilizarse para este propósito utilizando la proteína IL-11R humana descrita en la especificación. Los ensayos de cribaje basados en células purificadas o basados en proteínas (libres de células) pueden utilizarse para identificar tales agentes. Por ejemplo, la proteína IL-11R humana puede inmovilizarse en forma purificada sobre un transportador y la unión a la proteína IL-11R humana purificada puede medirse en presencia y en ausencia de los 45 50 agentes potencialmente inhibidores. Un ensayo de unión adecuado puede utilizar alternativamente una forma soluble del IL-11R humano de la invención.

En tal ensayo de cribaje, una primera mezcla de unión se obtiene al combinar IL-11 o un fragmento de la misma y proteína IL-11R humana, y se mide la cantidad de unión en la primera mezcla de unión (B_0). Una segunda mezcla de unión se obtiene también al combinar IL-11 o un fragmento de la misma, proteína IL-11R humana y el compuesto o agente a evaluar, y se mide la cantidad de unión en la segunda mezcla de unión (B). Las cantidades de unión en la primera y segunda mezclas de unión se comparan, por ejemplo realizando un cálculo de la proporción B/B_0 . Un compuesto o agente se considera que es capaz de inhibir la unión si se observa una reducción en la unión en la segunda mezcla de unión comparado con la primera mezcla de unión. 55 60

Opcionalmente, puede añadirse gp130 a una o ambas mezclas de unión. La formulación y optimización de las mezclas de unión está al alcance de los expertos en la materia, dichas mezclas de unión también pueden contener los tampones y sales necesarias para potenciar u optimizar la unión, y pueden incluirse ensayos de control adicionales en el ensayo de cribaje descrito en la especificación. 65

Los compuestos que se encontraron reducían la actividad de unión de la proteína IL-11R humana a la IL-11 o un fragmento de ésta en cualquier grado, preferiblemente en al menos alrededor de un 10%, más preferiblemente superior a alrededor de un 50% o más, pueden identificarse de este modo y luego evaluarse de forma secundaria en

otros ensayos de unión y ensayos *in vivo*. Mediante estos métodos pueden identificarse compuestos con actividad inhibitoria de la unión a IL-11R que pueden resultar adecuados como agentes terapéuticos.

5 Las proteínas IL-11R humanas, y los polinucleótidos que codifican para ellas, también pueden utilizarse como agentes diagnósticos para la detección de la expresión o presencia de IL-11R, IL-11 o de células que expresan IL-11R o IL-11. Las proteínas o polinucleótidos pueden utilizarse para este propósito en procedimientos estándar para ensayos diagnósticos que utilizan este tipo de materiales. Los métodos adecuados son bien conocidos para los expertos en la materia.

10 El IL-11R humano actúa como mediador de las actividades biológicas conocidas de IL-11. Como resultado, la proteína IL-11R humana aislada y los inhibidores de IL-11R pueden ser útiles en el tratamiento o modulación de varias condiciones médicas en las que está implicada la IL-11 o que están causadas por la actividad (o falta de la misma) de IL-11 (colectivamente denominadas “condiciones relacionadas con IL-11”). Las condiciones relacionadas con IL-11 incluyen sin limitación las inmunodeficiencias, específicamente las deficiencias en las células progenitoras
15 hematopoyéticas, o los trastornos relacionados con éstas, el cáncer y otras enfermedades. Tales estados patológicos pueden resultar de una enfermedad, exposición a radiación o a drogas, e incluyen por ejemplo, la leucopenia, infecciones bacterianas y víricas, anemia, deficiencias de células B o células T como la deficiencia de células inmunes o deficiencia de células hematopoyéticas tras un trasplante de médula ósea.

20 También se cree IL-11 y IL-11R pueden estar involucrados en la regulación de la maduración y reparación ósea (Girasole *et al.* (1994) *J. Clin. Invest.*, 93, 1516-1524; Passeri *et al.* (1992) *J. Bone Miner. Res.*, 7(S1), S110 Abst.; Passeri *et al.* (1993) *J. Bone Miner. Res.*, 8(S1), S162 Abst.). Como resultado, la proteína IL-11R humana y los inhibidores de IL-11R pueden ser útiles en el tratamiento de la pérdida ósea (lo que incluye la asociada con la osteoporosis, osteoporosis post-menopáusicas, osteoporosis senil, osteoporosis idiopática, enfermedad de Pagets, mieloma múltiple
25 y condiciones de hipogonadismo).

La proteína IL-11R humana, purificada a partir de células o producida de forma recombinante, puede utilizarse como una composición farmacéutica si se combina con un transportador farmacéuticamente aceptable. Tal composición puede contener, además de la IL-11R humana o ligando y el transportador, diluyentes, materiales de relleno, sales,
30 tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en la materia. El término “farmacéuticamente aceptable” significa un material no tóxico que no interfiera con la efectividad de la actividad biológica del(de los) ingrediente(s) activo(s). Las características del transportador dependerán de la vía de administración.

La composición farmacéutica de la invención puede contener también citoquinas, linfoquinas u otros factores hematopoyéticos como el M-CSF, GM-CSF, 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-15, G-CSF, factor de células madre y eritropoyetina. La composición farmacéutica puede contener factores trombolíticos o antitrombóticos como el activador de plasminógeno y el factor VIII. La composición farmacéutica puede contener además otros agentes antiinflamatorios. Tales factores y/o agentes adicionales pueden incluirse en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con la proteína IL-11R humana aislada o para minimizar
40 los efectos colaterales causados por la proteína IL-11R humana aislada. De forma inversa, puede incluirse la proteína IL-11R humana aislada en formulaciones de la citoquina, linfoquina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombótico o agente antiinflamatorio particular para minimizar los efectos colaterales de la citoquina, linfoquina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombótico o agente antiinflamatorio.

45 La composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de liposoma en el que se combina proteína IL-11R humana aislada, además de otros transportadores farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos como los lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos o capas lamelares en solución acuosa. Los lípidos adecuados para la formulación liposomal incluyen, sin limitación, los monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de dichas formulaciones liposomales, que está al alcance de los expertos en la materia, se describe por ejemplo en la Patente U.S. N° 4.235.871; Patente U.S. N° 4.501.728; Patente U.S. N° 4.837.028; y Patente U.S. N° 4.737.323, todas ellas
50 incorporadas aquí como referencia.

Como se usa aquí, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o método que es suficiente para dar lugar a un beneficio significativo en el paciente, por ejemplo una mejora de los síntomas, una curación, o un aumento en la tasa de curación de tales condiciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, que se administra solo, el término se refiere a ese único ingrediente. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que resultan en el efecto terapéutico, tanto si se administran en combinación, de forma seriada o de forma
60 simultánea.

En la práctica del método de tratamiento o la utilización de la presente invención, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de proteína IL-11R humana aislada a un mamífero. La proteína IL-11R humana aislada puede administrarse, de acuerdo con el método de la invención, sola o en combinación con otras terapias como los tratamientos que utilizan citoquinas, linfoquinas u otros factores hematopoyéticos. Cuando se coadministra con una o más
65 citoquinas, linfoquinas u otros factores hematopoyéticos, la proteína IL-11R humana puede administrarse simultáneamente con la(s) citoquina(s), linfoquina(s), otro(s) factores hematopoyético(s), factores trombolíticos o antitrombóticos, o secuencialmente. Si se administran secuencialmente, el médico asistente decidirá la secuencia apropiada de

ES 2 275 268 T3

administración de la proteína IL-11R humana en combinación con la(s) citoquina(s), linfoquina(s), otro(s) factores hematopoyético(s), factores trombolíticos o antitrombóticos.

5 La administración de proteína IL-11R humana utilizada en la composición farmacéutica o para poner en práctica el método de la presente invención puede llevarse a cabo de varias formas convencionales, como la ingestión oral, inhalación, o la inyección cutánea, subcutánea, o intravenosa. Es preferible la administración intravenosa al paciente.

10 Si se administra por vía oral una cantidad terapéuticamente efectiva de proteína IL-11R humana, la proteína IL-11R humana estará en forma de un comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Si se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener de forma adicional un transportador sólido como la gelatina o un adyuvante. El comprimido, cápsula y polvo, contienen entre alrededor del 5 y el 95% de proteína IL-11R humana y preferiblemente entre alrededor del 25 y el 90% de proteína IL-11R humana. Si se administra en forma líquida, puede añadirse un transportador líquido como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal como el aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de semilla de soja o aceite de sésamo, o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener además solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos, o glicoles como el etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Si se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene entre alrededor del 0,5 y el 90% en peso de proteína IL-11R humana y preferiblemente entre alrededor del 1 y el 50% de proteína IL-11R humana.

20 Si se administra mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea una cantidad terapéuticamente efectiva de proteína IL-11R humana, la proteína IL-11R humana estará en forma de una solución acuosa libre de pirógenos y aceptable por vía parenteral. La preparación de tales soluciones de proteína aceptables por vía parenteral, con la debida consideración del pH, isotonicidad, estabilidad y similares, está al alcance del experto en la materia. Una composición farmacéutica preferible para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debería contener, además de la proteína IL-11R humana, un vehículo isotónico, como el inyectable de cloruro sódico, inyectable de Ringer, inyectable de dextrosa, inyectable de cloruro sódico y dextrosa, inyectable de de Ringer con lactato u otro vehículo conocido en la materia. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes o otros aditivos conocidos para los expertos en la materia.

30 La cantidad de proteína IL-11R humana en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y severidad de la condición que se está tratando, y de la naturaleza de los tratamiento a los previamente se haya sometido al paciente. En último término, el médico asistente decidirá la cantidad de proteína IL-11R humana con la que tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico asistente administrará dosis bajas de proteína IL-11R humana y observará la respuesta de paciente. Pueden administrarse dosis mayores de proteína IL-11R humana hasta que se obtenga el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y generalmente en ese punto la dosis no se aumenta más. Está contemplado que las diferentes composiciones farmacéuticas utilizadas para poner en práctica el método de la presente invención debe contener entre alrededor de 0,1 mg y alrededor de 100 mg de proteína IL-11R humana por kg de peso corporal.

40 La duración de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica de la presente invención variará en función de la severidad de la enfermedad que se está tratando, y la condición y potencial respuesta idiosincrática de cada paciente individual. Está contemplado que la duración de cada aplicación de proteína IL-11R humana estará en el rango de entre 12 y 24 horas de administración intravenosa continua. En último término, el médico asistente decidirá la duración apropiada de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica de la presente invención.

45 Las proteínas IL-11R humanas de la invención también pueden utilizarse para inmunizar animales para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionen específicamente con la proteína IL-11R humana y que puedan inhibir la unión de la IL-11 o de fragmentos de la misma al receptor. Tales anticuerpos pueden obtenerse utilizando el IL-11R humano completo como inmunógeno o utilizando fragmentos del IL-11R humano, como el IL-11R humano procesado soluble. Fragmentos menores del IL-11R humano también pueden utilizarse para inmunizar animales. Los inmunógenos peptídicos pueden contener de forma adicional un residuo cisteína en el extremo carboxilo, y estar conjugados con un hapteno como la hemocianina de lapa californiana (KLH). Pueden obtenerse otros inmunógenos peptídicos substituyendo los residuos tirosina por residuos tirosina sulfatados. Los métodos para sintetizar tales péptidos son conocidos en la materia, por ejemplo, como los de R.P. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963); J.L. Krstenansky *et al.*, FEBS Lett. 211, 10 (1987).

55 Los anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes (preferiblemente anticuerpos monoclonales) que se unen a la proteína IL-11R humana también pueden ser terapéuticos útiles para ciertos tumores y también en el tratamiento de las condiciones descritas anteriormente. Estos anticuerpos monoclonales neutralizantes pueden ser capaces de bloquear la unión de IL-11 con el IL-11R humano.

ES 2 275 268 T3

Ejemplo 1

Aislamiento del cDNA del IL-11R humano

5 *Generación de las sondas de DNA*

Las sondas de DNA derivadas a partir de la secuencia Etl-2 murina (ID de SEC N°:3) se obtuvieron mediante una PCR de cDNA de placenta murina. La sonda amino-terminal corresponde a los pares de bases 418-570 y la sonda carboxi-terminal a los pares de bases 847-1038 de la secuencia Etl-2 murina. Las sondas de DNA se purificaron en gel y se marcaron radiactivamente utilizando $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP y $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP.

Cribaje de la biblioteca de cDNA

Se generó cDNA a partir de PBMC humanas activadas utilizando el sistema Superscript Choice y se clonó el la diana EcoR1 del ZAP II (Stratagene). Los fagos resultantes se utilizaron para infectar la cepa de *E. coli* BB4. Se sembraron un millón de fagos en placas NZCYM de 150 mm a una densidad de 15000 ufp/placa. Las placas se transfirieron a filtros duplicados de nitrocelulosa Duralose-(Stratagene). Tras una desnaturalización alcalina y fijación con calor los filtros se prehibridaron en 5xSSC, 5xDenhardtts, SDS al 0,1% y tRNA de levadura 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 2 horas a 65°C. Un juego de filtros se hibridó con la sonda amino-terminal y el otro juego con la sonda carboxi-terminal (5 x 10⁵ cpm/ml) durante 48 horas a 55°C en tampón de prehibridación. Los filtros se lavaron con 4xSSC, SDS al 0,1% una vez a 25°C y dos veces a 55°C. Las placas que hibridaron con ambas sondas se identificaron mediante autoradiografía.

Del millón de placas analizadas, dos placas hibridaron con ambas sondas. Estas placas se picaron y los fagos se eluyeron en medio SM que contenía cloroformo. Los fagos resultantes se utilizaron para reinfectar la cepa de *E. coli* BB4 y se plaquearon en placas NZCYM a una densidad de 100-300 ufp/placa para un cribaje secundario.

Tras el cribaje secundario se aisló DNA plasmídico de las placas ZAP II por escisión utilizando un fago ayudante (Stratagene). La secuencia de DNA de los insertos se determinó en un secuenciador de DNA Applied Biosystems.

El clon pHIL11R14-2 que contenía el polinucleótido con la secuencia con ID de SEC N°:1 se depositó en la ATCC con el número de acceso _____ el 22 de Diciembre de 1994.

35 Ejemplo 2

Expresión de proteína IL-11R humana soluble y ensayo de actividad

Una forma soluble de la proteína IL-11R humana se expresó en células de mamífero. La proteína recombinante expresada era capaz de transducir una señal en células BAF130-9.

Una porción de la secuencia completa del IL-11R humano (nucleótidos 734-1828 del ID de SEC N°:1 que codifica los aminoácidos 1-365 del ID de SEC N°:2) que corresponde a una forma soluble se clonó en el vector de expresión de mamífero pED y se utilizó para transfectar células COSM6. 40 horas después de la transfección se separó el medio condicionante, se concentró 5 veces y se utilizó para ensayos de proliferación con la línea celular murina BAF130-9 (Hibi M. *et al.* (1990) Cell 63, 1149-57), un derivado de la línea celular BAFB03 que expresa el transductor de señales gp130 humano. Las células BAF130-9 no proliferan en respuesta a la IL-11 o IL-6 sola, pero proliferan en respuesta a una combinación de IL-6 e IL-6R soluble (Hibi *et al.*, *supra*). Las células BAF130-9 (1x10⁴ células en 0,1 ml) se cultivaron en medio RPMI 1640/FCS al 10% con concentraciones crecientes de IL-11 recombinante humana en presencia o ausencia de 10 μl de medio condicionante de células transfectadas control o de células transfectadas con la secuencia del IL-11R humano soluble. Tras cuarenta horas las células marcaron en pulsos con ³H-timidina (0,5 $\mu\text{Ci}/\text{pocillo}$) durante ocho horas y se determinó el nucleótido incorporado. Como se muestra en la figura 2, las células BAF130-9 no proliferan en respuesta a la IL-11 o el IL-11R soluble solos, pero proliferan en presencia de ambos IL-11 y IL-11R soluble.

Otras proteínas IL-11R humanas pueden testarse en este modelo para determinar si muestran una “actividad biológica” de IL-11R humano como se ha definido aquí.

60 Ejemplo 3

Otros sistemas para la determinación de la actividad biológica de la proteína IL-11R humana

Pueden utilizarse otros sistemas para determinar si una proteína IL-11R humana específica muestra una “actividad biológica” de IL-11R humano como se ha definido aquí. A continuación se exponen ejemplos de tales sistemas.

ES 2 275 268 T3

Ensayos de Unión de IL-11

La capacidad de una proteína IL-11R humana de unirse a IL-11 o a un fragmento de la misma puede determinarse mediante cualquiera de los ensayos adecuados que pueden detectar tal unión. algunos ejemplos adecuados se muestran a continuación.

La unión de la a la región extracelular de la proteína IL-11R humana causará específicamente una rápida inducción de la fosfotirosina en la proteína receptor. Los ensayos de la actividad de unión del ligando en base a la medida de la inducción de la fosforilación se describen a continuación.

Alternativamente, se produce una proteína IL-11R humana (como por ejemplo una forma soluble del dominio extracelular) y se utiliza para detectar la unión de IL-11.

Por ejemplo, se prepara una construcción de DNA en la que el dominio extracelular (truncado previamente, preferiblemente inmediatamente antes, del dominio transmembrana previsto) se liga en el marco de lectura a un cDNA que codifica los dominios bisagra C_H2 y C_H3 de una inmunoglobulina (Ig) γ 1 humana. Esta construcción se genera en un vector de expresión adecuado para células COS, como el pED Δ C o pMT2. El plásmido se transfectó de forma transitoria en las células COS. La proteína de fusión IL-11R-Ig secretada se recogió en el medio condicionante y se purificó mediante una cromatografía de proteína A.

La proteína de fusión IL-11R-Ig purificada IL-11R-Ig se utiliza para demostrar la unión de IL-11 en una serie de aplicaciones. Puede utilizarse IL-11 para recubrir la superficie de una placa de ensayo inmunosorbente acoplado a enzima (ELISA), y entonces se bloquean los sitios de unión adicionales con albúmina sérica bovina o caseína utilizando los tampones de ELISA estándar. La proteína de fusión IL-11R-Ig se une entonces a la IL-11 de la fase sólida, y la unión se detecta con un secundario de cabra anti-Ig humana conjugado con peroxidasa de rábano picante. La actividad del enzima específicamente unido puede medirse con un sustrato colorimétrico, como la tetrametilbenzidina y la lectura de la absorbancia.

La IL-11 puede expresarse también en la superficie de la células, por ejemplo aportando la unión de un dominio transmembrana o glucosil fosfatidil inositol (GPI). Las células que expresan la IL-11 unida a la membrana pueden identificarse utilizando la proteína de fusión IL-11R-Ig. La fusión IL-11R-Ig soluble se une a la superficie de estas células y se detecta con un anticuerpo de cabra anti-Ig humana conjugado con un fluorocromo, como el isotiocianato de fluoresceína y citometría de flujo.

Trampa de Interacción

Un método de selección genética en levaduras, la “trampa de interacción” [Gyuris *et al.*, Cell 75:791-803, 1993], puede utilizarse para determinar si una proteína IL-11R humana tiene una actividad biológica del IL-11R humano como se ha definido aquí. En este sistema, la expresión de los genes marcador a partir de LexAop-Leu2 y LexAop-LacZ depende de la interacción entre la proteína cebo, por ejemplo en este caso una especie que interacciona con el IL-11R humano, y la presa, por ejemplo en este caso una proteína IL-11R humana. Así, se puede medir la fuerza de la interacción por el nivel de expresión de Leu2 o LacZ. El método más simple es la medida de la actividad de la proteína codificada por LacZ, la β -galactosidasa. Esta actividad puede evaluarse por la intensidad de color azul en el medio o filtro que contiene X-Gal. Para la medida cuantitativa de la actividad β -galactosidasa, pueden encontrarse ensayos estándar en “Methods in Yeast Genetics”, Cold Spring Harbor, New York, 1990 (por Rose, M.D., Winston, F. y Hieter, P.).

En tales métodos, si se desea determinar si la proteína IL-11R humana interacciona con una especie particular (como por ejemplo, una proteína citosólica que se une al dominio intracelular del IL-11R humano *in vivo*), puede utilizarse esa especie como un “cebo” en la trampa de interacción con la proteína IL-11R humana a testar actuando como “presa”, o viceversa.

Sistema de Inducción de CAT

La transcripción de los genes de las proteínas plasmáticas de fase aguda, como el gen del β -fibrinógeno de rata, es activada por IL-11 en una serie de líneas celulares. En un sistema de ejemplo, se cotransfectan células COSM6 con plásmidos que codifican la proteína IL-11R humana (como la del IL-11R humano completo o una forma soluble del mismo), el transductor de señal gp130 humano y un gen marcador que contiene la región promotora de 350 pares de bases del gen del β -fibrinógeno de rata fusionado a un gen marcador, CAT (Baumann *et al.*, (1991) J. Biol. Chem. 266, 20424-27). Las células se estimulan con concentraciones crecientes de IL-11 recombinante humana y se monitoriza la transcripción del gen marcador mediante un ensayo para la presencia de actividad CAT.

Fosforilación de la gp130

La actividad también puede determinarse examinando la capacidad de IL-11 de inducir la fosforilación de tirosinas de la gp130 en células transfectadas con una secuencia que codifica la proteína IL-11R humana (como la del IL-11R humano completo o una forma soluble del mismo) (Luttcken *et al.* (1994) Science 263, 89-92).

ES 2 275 268 T3

Fosforilación de las STAT

La actividad también puede determinarse examinando la capacidad de IL-11 de inducir la fosforilación de tirosinas de las STAT (transductores de señal y activadores de la transcripción, una familia de proteínas de unión al DNA) en células transfectadas con una secuencia que codifica la proteína IL-11R humana (como la del IL-11R humano completo o una forma soluble del mismo) (Zhong *et al.*, (1994) Science 264, 95-98).

Fosforilación de las quinasas JAK

La actividad también puede determinarse examinando la capacidad de IL-11 de inducir la fosforilación de tirosinas de las quinasas JAK en células transfectadas con una secuencia que codifica la proteína IL-11R humana (como la del IL-11R humano completo o una forma soluble del mismo) (Yin *et al.*, (1993) J. Immunol. 151:2555-61).

Todas las referencias a patentes y literatura citadas aquí se incorporan como referencia como si se expusieran completas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 275 268 T3

REIVINDICACIONES

5 1. La utilización de una proteína que consiste en una secuencia aminoacídica seleccionada de entre el grupo que consiste en:

(a) la secuencia aminoacídica del ID de SEC N°:2;

(b) la secuencia aminoacídica del ID de SEC N°:2 de los aminoácidos 24 a 422;

10 o producida por una célula huésped transformada con una secuencia nucleotídica que codifica dicha proteína, y un transportador farmacéuticamente aceptable, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir la pérdida de masa ósea en un sujeto mamífero.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

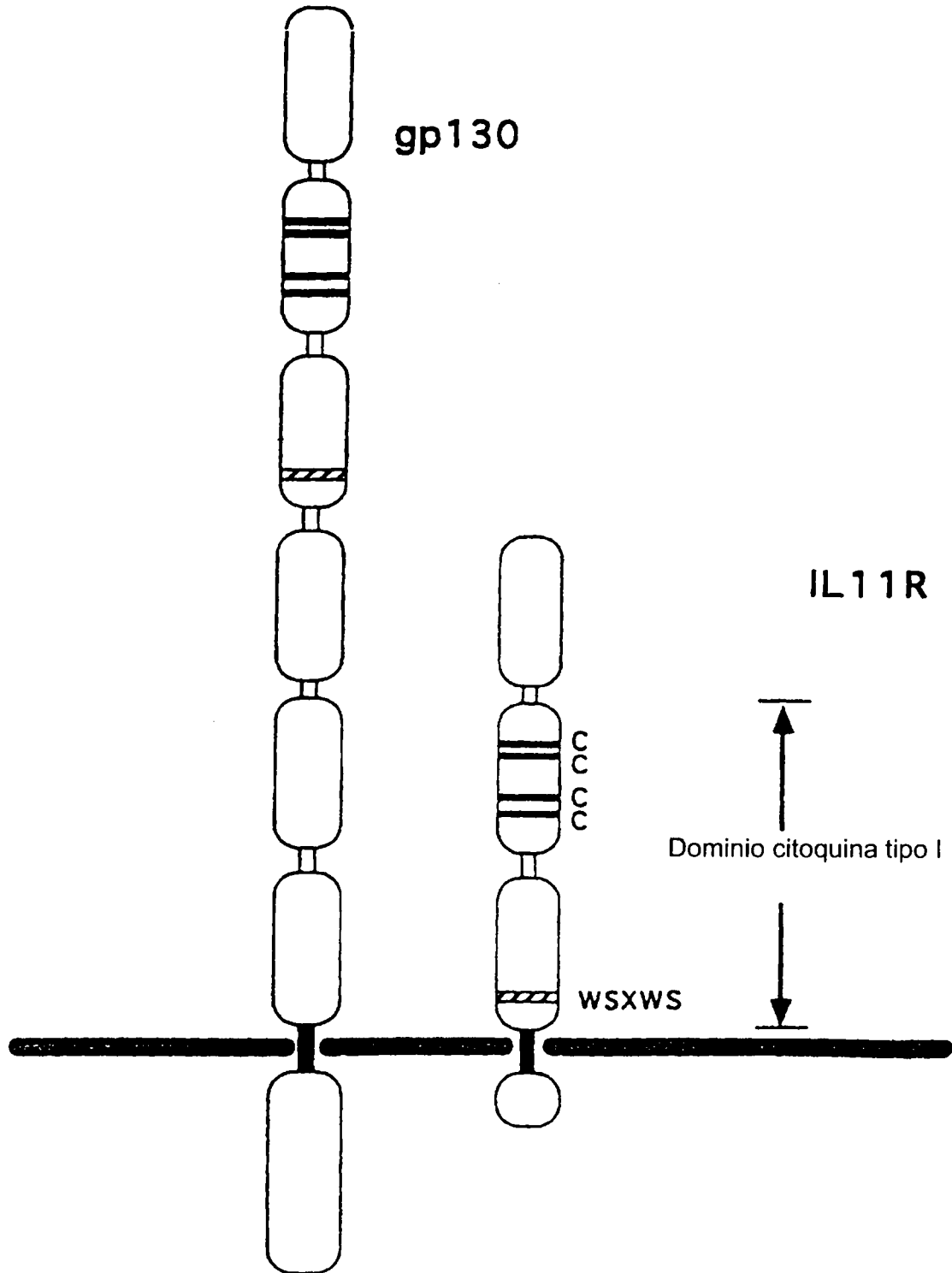
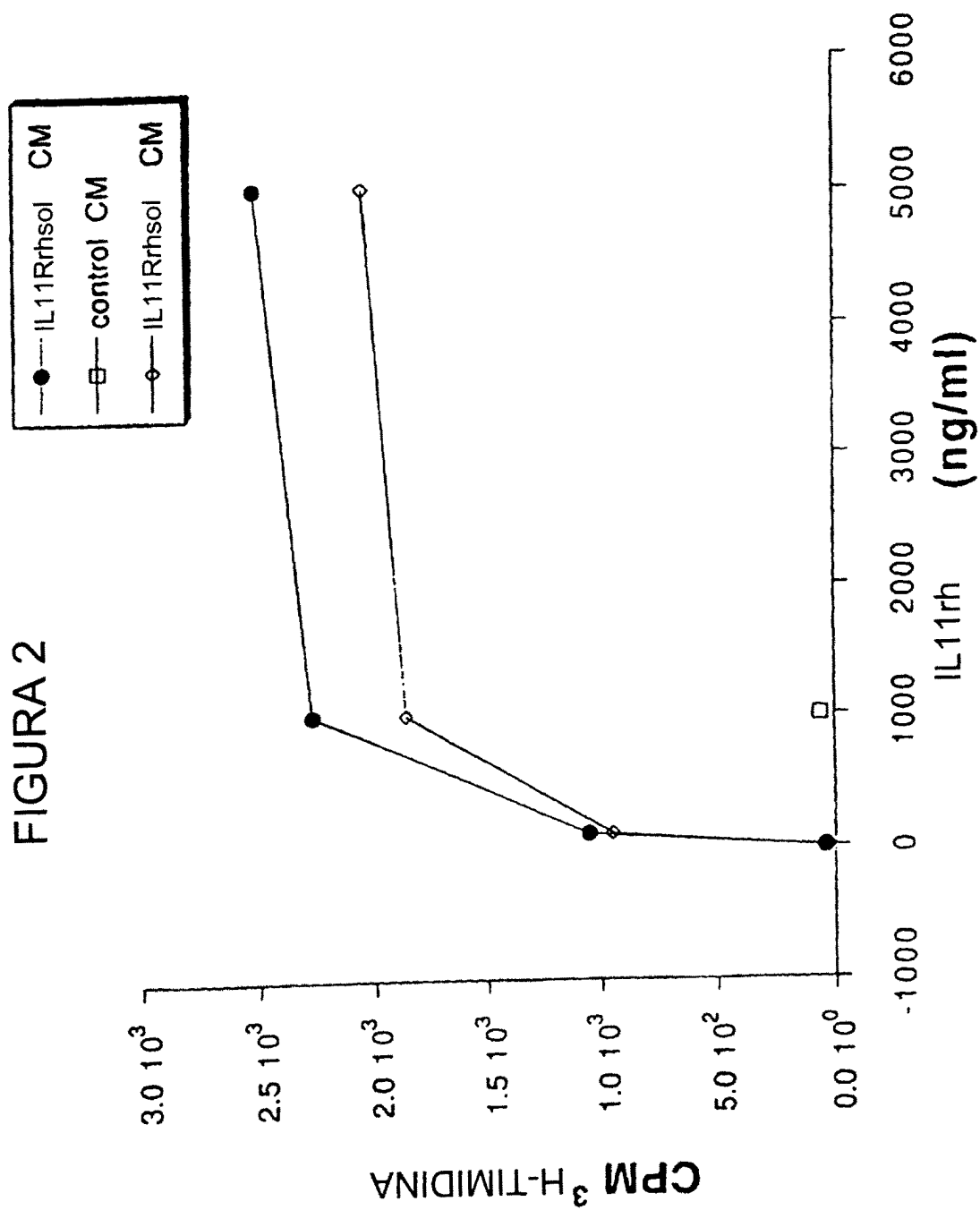


FIGURA 2



ES 2 275 268 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Tobin, James
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: RECEPTOR DE LA INTERLEUQUINA-11 HUMANA
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Genetics Institute, inC.
 - (B) CALLE: 87, CambridgePark Drive
 - 15 (C) CIUDAD: Cambridge
 - (D) ESTADO: MA
 - (E) PAÍS: EEUU
 - (F) CP: 02140
- (v) FORMA DE LECTURA DEL COMPUTADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
 - (B) COMPUTADOR: IBM PC compatible
 - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (O) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versión 1.25
- (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - (B) FECHA DE DEPÓSITO:
 - (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Brown, Scott A.
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 32.724
 - 40 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/SUMARIO: GI5252
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- 45 (A) TELÉFONO: (617) 498-8224
 - (B) TELEFAX: (617) 876-5851

(2) INFORMACIÓN PARA ID de SEC N°:1

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 2456 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: doble
 - 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- 60 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - (B) LOCALIZACIÓN: 734 .. 1999
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID de SEC N°:1:

ES 2 275 268 T3

	TCGCCCACCC CCAGCCTCTG GCAGCAGCCA GGGCATCTGG ATCTGCTTAA CTACACAGCC	60
5	CCAGCCTGCA CCCTAGCCCC ATCCAGCTTC ACAAACTGGA GACCAACGAA GTGTCAAGAG	120
	CCAGGCCCAG CTGAGTGGCC CAAGTAGCCA GACCAAGGAG CCAGGTTTCAG GCGAGAAGCC	180
	TGGCAGCCAG GGCAGGGGTG GGCCTCAGGG TGGGAGTGCA GGATGGGCTC AGATCCATGA	240
10	TGACACCCTT CCCCAGGGT GATAAGGTCT GCCTAGGTTA ATCAGAGGCA GTGATAAGCC	300
	CTGGACCAGG TGGGGTAAA TACCAGAATT CCCAACAGCT GGACTGGAGG GGTTAATGGG	360
	AGTGGCTGAG CTGGTGCCAG TGCTTGGTGC CAGGGGTGGG CGCCAAGGGC AGTGGAGGGG	420
15	GAGTTGCTGG CACAGTCTGT TGCCTCCGGC TTTTGTCTG GGCCCTAAGC CCAGGACTGA	480
	GATGGAGGGT GTGAGGGGCT GTGTGTGTCC GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGCGCGCGC	540
20	ACGCACATGC AAAGCACTGG GTATACAGTG GGAAAGGGGA CCTCAGGTCA GTTCCCGCAG	600
	TGATTTCTAA CAGCCTTACC CCACTTGGTG CATCAATTTT TCTCCTAGGA AGCCTCAGTT	660
25	TTGGAGAGGA AGAGCCAGGC TTTAGCCTCC CATCTCAGGG GTCGGGGATT TTTGACTCTA	720
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 275 268 T3

	CTTCTCTCCA CAG ATG AGC AGC AGC TGC TCA GGG CTG AGC AGG GTC CTG	769
	Met Ser Ser Ser Cys Ser Gly Leu Ser Arg Val Leu	
	1 5 10	
5	GTG GCC GTG GCT ACA GCC CTG GTG TCT GCC TCC TCC CCC TGC CCC CAG	817
	Val Ala Val Ala Thr Ala Leu Val Ser Ala Ser Ser Pro Cys Pro Gln	
	15 20 25	
10	GCC TGG GGC CCC CCA GGG GTC CAG TAT GGG CAG CCA GGC AGG TCC GTG	865
	Ala Trp Gly Pro Pro Gly Val Gln Tyr Gly Gln Pro Gly Arg Ser Val	
	30 35 40	
15	AAG CTG TGT TGT CCT GGA GTG ACT GCC GGG GAC CCA GTG TCC TGG TTT	913
	Lys Leu Cys Cys Pro Gly Val Thr Ala Gly Asp Pro Val Ser Trp Phe	
	45 50 55 60	
20	CGG GAT GGG GAG CCA AAG CTG CTC CAG GGA CCT GAC TCT GGG CTA GGG	961
	Arg Asp Gly Glu Pro Lys Leu Leu Gln Gly Pro Asp Ser Gly Leu Gly	
	65 70 75	
25	CAT GAA CTG GTC CTG GCC CAG GCA GAC AGC ACT GAT GAG GGC ACC TAC	1009
	His Glu Leu Val Leu Ala Gln Ala Asp Ser Thr Asp Glu Gly Thr Tyr	
	80 85 90	
30	ATC TGC CAG ACC CTG GAT GGT GCA CTT GGG GGC ACA GTG ACC CTG CAG	1057
	Ile Cys Gln Thr Leu Asp Gly Ala Leu Gly Gly Thr Val Thr Leu Gln	
	95 100 105	
35	CTG GGC TAC CCT CCA GCC CGC CCT GTT GTC TCC TGC CAA GCA GCC GAC	1105
	Leu Gly Tyr Pro Pro Ala Arg Pro Val Val Ser Cys Gln Ala Ala Asp	
	110 115 120	
40	TAT GAG AAC TTC TCT TGC ACT TGG AGT CCC AGC CAG ATC AGC GGT TTA	1153
	Tyr Glu Asn Phe Ser Cys Thr Trp Ser Pro Ser Gln Ile Ser Gly Leu	
	125 130 135 140	
45	CCC ACC CGC TAC CTC ACC TCC TAC AGG AAG AAG ACA GTC CTA GGA GCT	1201
	Pro Thr Arg Tyr Leu Thr Ser Tyr Arg Lys Lys Thr Val Leu Gly Ala	
	145 150 155	
50	GAT AGC CAG AGG AGG AGT CCA TCC ACA GGG CCC TGG CCA TGC CCA CAG	1249
	Asp Ser Gln Arg Arg Ser Pro Ser Thr Gly Pro Trp Pro Cys Pro Gln	
	160 165 170	
55	GAT CCC CTA GGG GCT GCC CGC TGT GTT GTC CAC GGG GCT GAG TTC TGG	1297
	Asp Pro Leu Gly Ala Ala Arg Cys Val Val His Gly Ala Glu Phe Trp	
	175 180 185	
60	AGC CAG TAC CGG ATT AAT GTG ACT GAG GTG AAC CCA CTG GGT GCC AGC	1345
	Ser Gln Tyr Arg Ile Asn Val Thr Glu Val Asn Pro Leu Gly Ala Ser	
	190 195 200	
65	ACA CGC CTG CTG GAT GTG AGC TTG CAG AGC ATC TTG CGC CCT GAC CCA	1393
	Thr Arg Leu Leu Asp Val Ser Leu Gln Ser Ile Leu Arg Pro Asp Pro	
	205 210 215 220	
70	CCC CAG GGC CTG CGG GTA GAG TCA GTA CCA GGT TAC CCC CGA CGC CTG	1441
	Pro Gln Gly Leu Arg Val Glu Ser Val Pro Gly Tyr Pro Arg Arg Leu	
	225 230 235	
75	CGA GCC AGC TGG ACA TAC CCT GCC TCC TGG CCG TGC CAG CCC CAC TTC	1489
	Arg Ala Ser Trp Thr Tyr Pro Ala Ser Trp Pro Cys Gln Pro His Phe	
	240 245 250	

ES 2 275 268 T3

5 CTG CTC AAG TTC CGT TTG CAG TAC CGT CCG GCG CAG CAT CCA GCC TGG 1537
 Leu Leu Lys Phe Arg Leu Gln Tyr Arg Pro Ala Gln His Pro Ala Trp
 255 260 265

10 TCC ACG GTG GAG CCA GCT GGA CTG GAG GAG GTG ATC ACA GAT GCT GTG 1585
 Ser Thr Val Glu Pro Ala Gly Leu Glu Glu Val Ile Thr Asp Ala Val
 270 275 280

15 GCT GGG CTG CCC CAT GCT GTA CGA GTC AGT GCC CCG GAC TTT CTA GAT 1633
 Ala Gly Leu Pro His Ala Val Arg Val Ser Ala Arg Asp Phe Leu Asp
 285 290 295 300

20 GCT GGC ACC TGG AGC ACC TGG AGC CCG GAG GCC TGG GGA ACT CCG AGC 1681
 Ala Gly Thr Trp Ser Thr Trp Ser Pro Glu Ala Trp Gly Thr Pro Ser
 305 310 315

25 ACT GGG ACC ATA CCA AAG GAG ATA CCA GCA TGG GGC CAG CTA CAC ACG 1729
 Thr Gly Thr Ile Pro Lys Glu Ile Pro Ala Trp Gly Gln Leu His Thr
 320 325 330

30 CAG CCA GAG GTG GAG CCT CAG GTG GAC AGC CCT GCT CCT CCA AGG CCC 1777
 Gln Pro Glu Val Glu Pro Gln Val Asp Ser Pro Ala Pro Pro Arg Pro
 335 340 345

35 TCC CTC CAA CCA CAC CCT CGG CTA CTT GAT CAC AGG GAC TCT GTG GAG 1825
 Ser Leu Gln Pro His Pro Arg Leu Leu Asp His Arg Asp Ser Val Glu
 350 355 360

40 CAG GTA GCT GTG CTG GCG TCT TTG GGA ATC CTT TCT TTC CTG GGA CTG 1873
 Gln Val Ala Val Leu Ala Ser Leu Gly Ile Leu Ser Phe Leu Gly Leu
 365 370 375 380

45 GTG GCT GGG GCC CTG GCA CTG GGG CTC TGG CTG AGG CTG AGA CGG GGT 1921
 Val Ala Gly Ala Leu Ala Leu Gly Leu Trp Leu Arg Leu Arg Arg Gly
 385 390 395

50 GGG AAG GAT GGA TCC CCA AAG CCT GGG TTC TTG GCC TCA GTG ATT CCA 1969
 Gly Lys Asp Gly Ser Pro Lys Pro Gly Phe Leu Ala Ser Val Ile Pro
 400 405 410

55 GTG GAC AGG CGT CCA GGA GCT CCA AAC CTG TAGAGGACCC AGGAGGGCTT 2019
 Val Asp Arg Arg Pro Gly Ala Pro Asn Leu
 415 420

60 CGGCAGATTC CACCTATAAT TCTGTCTTGC TGGTGTGGAT GGATGGACAG ATAGAAACCA 2079

GGCAGGACAG TAGATCCCTA TGTTGGATC TCAGCTGGAA GTTCTGTTTG GAGCCCATTT 2139

CTGTGAGACC CTGTATTTCA AATTTGCAGC TGAAAGGTGC TTGTACCTCT GATTTCACCC 2199

55 CAGAGTTGGA GTTCTGCTCA AGGAACGTGT GTAATGTGTA CATCTGTGTC CATGTGTGAC 2259

CATGTGTCTG TGAGGCAGGG AACATGTATT CTCTGCATGC ATGTATGTAG GTGCCTGGGG 2319

AGTGTGTGTG GGTCCCTTGGC TCTTGGCCTT TCCCCTTGCA GGGTTGTGC AGGTGTGAAT 2379

60 AAAGAGAATA AGGAAGTTCT TGGAGATTAT ACTCAGAAAA AAAAAAAAAA AGTCGACGCG 2439

GCCGCGAATT CCTGCAG 2456

ES 2 275 268 T3

(2) INFORMACIÓN PARA ID de SEC N°:2

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 422 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID de SEC N°:2:

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

60

65

ES 2 275 268 T3

Arg Val Glu Ser Val Pro Gly Tyr Pro Arg Arg Leu Arg Ala Ser Trp
 225 230 235 240

5 Thr Tyr Pro Ala Ser Trp Pro Cys Gln Pro His Phe Leu Leu Lys Phe
 245 250 255

Arg Leu Gln Tyr Arg Pro Ala Gln His Pro Ala Trp Ser Thr Val Glu
 260 265 270

10 Pro Ala Gly Leu Glu Glu Val Ile Thr Asp Ala Val Ala Gly Leu Pro
 275 280 285

15 His Ala Val Arg Val Ser Ala Arg Asp Phe Leu Asp Ala Gly Thr Trp
 290 295 300

Ser Thr Trp Ser Pro Glu Ala Trp Gly Thr Pro Ser Thr Gly Thr Ile
 305 310 315 320

20 Pro Lys Glu Ile Pro Ala Trp Gly Gln Leu His Thr Gln Pro Glu Val
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Asp Ser Pro Ala Pro Pro Arg Pro Ser Leu Gln Pro
 340 345 350

25 His Pro Arg Leu Leu Asp His Arg Asp Ser Val Glu Gln Val Ala Val
 355 360 365

Leu Ala Ser Leu Gly Ile Leu Ser Phe Leu Gly Leu Val Ala Gly Ala
 370 375 380

Leu Ala Leu Gly Leu Trp Leu Arg Leu Arg Arg Gly Gly Lys Asp Gly
 385 390 395 400

35 Ser Pro Lys Pro Gly Phe Leu Ala Ser Val Ile Pro Val Asp Arg Arg
 405 410 415

Pro Gly Ala Pro Asn Leu
 420

40

(2) INFORMACIÓN PARA ID de SEC N°:3

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1714 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: doble
 - 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- 55 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - (B) LOCALIZACIÓN: 34 .. 1359
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID de SEC N°:3:
- 65

ES 2 275 268 T3

	TTCTTAGCCT GATAGGAGGA AGTCTTGGAG GCC ATG GCA CTC AGT CAC TGT GAT	54
	Met Ala Leu Ser His Cys Asp	
	1 5	
5	TAT CAA GAT GAG CAG CAG CTG CTC AGG GCT GAC CAG GGT CCT GGT GGC	102
	Tyr Gln Asp Glu Gln Gln Leu Leu Arg Ala Asp Gln Gly Pro Gly Gly	
	10 15 20	
10	CGT GCT ACA GCC CTG GTG TCT TCC TCC TCC CCC TGC CCC CAA GCT TGG	150
	Arg Ala Thr Ala Leu Val Ser Ser Ser Pro Cys Pro Gln Ala Trp	
	25 30 35	
15	GGT CCT CCA GGG GTC CAG TAT GGA CAA CCT GGC AGG CCC GTG ATG CTG	198
	Gly Pro Pro Gly Val Gln Tyr Gly Gln Pro Gly Arg Pro Val Met Leu	
	40 45 50 55	
20	TGC TGC CCC GGA GTG AGT GCT GGG ACT CCA GTG TCC TGG TTT CGG GAT	246
	Cys Cys Pro Gly Val Ser Ala Gly Thr Pro Val Ser Trp Phe Arg Asp	
	60 65 70	
25	GGA GAT TCA AGG CTG CTC CAG GGA CCT GAC TCT GGG TTA GGA CAC AGA	294
	Gly Asp Ser Arg Leu Leu Gln Gly Pro Asp Ser Gly Leu Gly His Arg	
	75 80 85	
30	CTG GTC TTG GCC CAG GTG GAC AGC CCT GAT GAA GGC ACT TAT GTC TGC	342
	Leu Val Leu Ala Gln Val Asp Ser Pro Asp Glu Gly Thr Tyr Val Cys	
	90 95 100	
35	CAG ACC CTG GAT GGT GTA TCA GGG GGC ATG GTG ACC CTG AAG CTG GGC	390
	Gln Thr Leu Asp Gly Val Ser Gly Gly Met Val Thr Leu Lys Leu Gly	
	105 110 115	
40	TTT CCC CCA GCA CGT CCT GAA GTC TCC TGC CAA GCG GTA GAC TAT GAA	438
	Phe Pro Pro Ala Arg Pro Glu Val Ser Cys Gln Ala Val Asp Tyr Glu	
	120 125 130 135	
45	AAC TTC TCC TGT ACT TGG AGT CCA GGC CAG GTC AGC GGT TTG CCC ACC	486
	Asn Phe Ser Cys Thr Trp Ser Pro Gly Gln Val Ser Gly Leu Pro Thr	
	140 145 150	
50	CGC TAC CTT ACT TCC TAC AGG AAG AAG ACG CTG CCA GGA GCT GAG AGT	534
	Arg Tyr Leu Thr Ser Tyr Arg Lys Lys Thr Leu Pro Gly Ala Glu Ser	
	155 160 165	
55	CAG AGG GAA AGT CCA TCC ACC GGG CCT TGG CCG TGT CCA CAG GAC CCT	582
	Gln Arg Glu Ser Pro Ser Thr Gly Pro Trp Pro Cys Pro Gln Asp Pro	
	170 175 180	
60	CTG GAG GCC TCC CGA TGT GTG GTC CAT GGG GCA GAG TTC TGG AGT GAG	630
	Leu Glu Ala Ser Arg Cys Val Val His Gly Ala Glu Phe Trp Ser Glu	
	185 190 195	
65	TAC CGG ATC AAT GTG ACC GAG GTG AAC CCA CTG GGT GCC AGC ACG TGC	678
	Tyr Arg Ile Asn Val Thr Glu Val Asn Pro Leu Gly Ala Ser Thr Cys	
	200 205 210 215	
70	CTA CTG GAT GTG AGA TTA CAG AGC ATC TTG CGT CCT GAT CCA CCC CAA	726
	Leu Leu Asp Val Arg Leu Gln Ser Ile Leu Arg Pro Asp Pro Pro Gln	
	220 225 230	
75	GGA CTG CGG GTG GAA TCC GTA CCT GGT TAC CCG AGA CCG CTG CAT GCC	774
	Gly Leu Arg Val Glu Ser Val Pro Gly Tyr Pro Arg Arg Leu His Ala	
	235 240 245	
80	AGC TGG ACA TAC CCT GCC TCC TGG CGT CGC CAA CCC CAC TTT CTG CTC	822
	Ser Trp Thr Tyr Pro Ala Ser Trp Arg Arg Gln Pro His Phe Leu Leu	
	250 255 260	
85	AAG TTC CGG TTG CAA TAC CGA CCA GCA CAG CAT CCA GCC TGG TCC ACG	870
	Lys Phe Arg Leu Gln Tyr Arg Pro Ala Gln His Pro Ala Trp Ser Thr	
	265 270 275	

ES 2 275 268 T3

5 GTG GAG CCC ATT GGC TTG GAG GAA GTG ATA ACA GAT GCT GTG GCT GGG 918
 Val Glu Pro Ile Gly Leu Glu Glu Val Ile Thr Asp Ala Val Ala Gly
 280 285 290 295
 CTG CCA CAC GCG GTA CGA GTC AGT GCC AGG GAC TTT CTG GAT GCT GGC 966
 Leu Pro His Ala Val Arg Val Ser Ala Arg Asp Phe Leu Asp Ala Gly
 300 305 310
 10 ACC TGG AGC GCC TGG AGC CCA GAG GCC TGG GGT ACT CCT AGC ACT GGT 1014
 Thr Trp Ser Ala Trp Ser Pro Glu Ala Trp Gly Thr Pro Ser Thr Gly
 315 320 325
 CCC CTG CAG GAT GAG ATA CCT GAT TGG AGC CAG GGA CAT GGA CAG CAG 1062
 Pro Leu Gln Asp Glu Ile Pro Asp Trp Ser Gln Gly His Gly Gln Gln
 330 335 340
 CTA GAG GCA GTA GTA GCT CAG GAG GAC AGC CCG GCT CCT GCA AGG CCT 1110
 Leu Glu Ala Val Val Ala Gln Glu Asp Ser Pro Ala Pro Ala Arg Pro
 345 350 355
 TCC TTG CAG CCG GAC CCA AGG CCA CTT GAT CAC AGG GAC CCC TTG GAG 1158
 Ser Leu Gln Pro Asp Pro Arg Pro Leu Asp His Arg Asp Pro Leu Glu
 360 365 370 375
 30 CAA GTA GCT GTG TTA GCG TCT CTG GGA ATC TTC TCT TGC CTT GGC CTG 1206
 Gln Val Ala Val Leu Ala Ser Leu Gly Ile Phe Ser Cys Leu Gly Leu
 380 385 390
 GCT GTT GGA GCT CTG GCA CTG GGG CTC TGG CTG AGG CTG AGA CGG AGT 1254
 Ala Val Gly Ala Leu Ala Leu Gly Leu Trp Leu Arg Leu Arg Arg Ser
 395 400 405
 35 GGG AAG GAT GGA CCG CAA AAA CCT GGG CTC TTG GCA CCC ATG ATC CCG 1302
 Gly Lys Asp Gly Pro Gln Lys Pro Gly Leu Leu Ala Pro Met Ile Pro
 410 415 420
 40 GTG GAA AAG CTT CCA GGA ATT CCA AAC CTG CAG AGG ACC CCA GAG AAC 1350
 Val Glu Lys Leu Pro Gly Ile Pro Asn Leu Gln Arg Thr Pro Glu Asn
 425 430 435
 45 TTC AGC TGATTTTCATC TGTAACCCGG TCAGACTTGG GGTGGTTAAA AGGACAGGCA 1406
 Phe Ser
 440
 GAAAGAGGCG GGGCAGTGGA TCCCTGTGGA TGGAGGTCTC AGCTGAAAGT CTGAGCTCTT 1466
 50 TTCTTTGACA CCTATACTCC AAAGTTGCTG CCGGCTGAAG GCTGTCTGGA CTTCCGATGT 1526
 CCTGAGGTGG AAGTCCACCT GAGGAATGTG TACAGAAGTC TGTGTTCTTG TGATCGTGTG 1586
 TGTATGTGAG ACAGGGAGCA AAAGTTCTCT GCATGTGTGT ACAGATGATT GGAGAGTGTG 1646
 55 TCGGGTCTTG GGCTTGGCCC TTCTGGGAAG TGTGAAGAGT TGAATAAAA GAGACGGAAG 1706
 TTTTGGGA 1714

60 (2) INFORMACIÓN PARA ID de SEC N°:4

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 441 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 275 268 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID de SEC N°:4:

5
 Met Ala Leu Ser His Cys Asp Tyr Gln Asp Glu Gln Gln Leu Leu Arg
 1 5 10 15

10
 Ala Asp Gln Gly Pro Gly Gly Arg Ala Thr Ala Leu Val Ser Ser Ser
 20 25 30

15
 Ser Pro Cys Pro Gln Ala Trp Gly Pro Pro Gly Val Gln Tyr Gly Gln
 35 40 45

20
 Pro Gly Arg Pro Val Met Leu Cys Cys Pro Gly Val Ser Ala Gly Thr
 50 55 60

25
 Pro Val Ser Trp Phe Arg Asp Gly Asp Ser Arg Leu Leu Gln Gly Pro
 65 70 75 80

30
 Asp Ser Gly Leu Gly His Arg Leu Val Leu Ala Gln Val Asp Ser Pro
 85 90 95

35
 Asp Glu Gly Thr Tyr Val Cys Gln Thr Leu Asp Gly Val Ser Gly Gly
 100 105 110

40
 Met Val Thr Leu Lys Leu Gly Phe Pro Pro Ala Arg Pro Glu Val Ser
 115 120 125

45
 Cys Gln Ala Val Asp Tyr Glu Asn Phe Ser Cys Thr Trp Ser Pro Gly
 130 135 140

50
 Gln Val Ser Gly Leu Pro Thr Arg Tyr Leu Thr Ser Tyr Arg Lys Lys
 145 150 155 160

55
 Thr Leu Pro Gly Ala Glu Ser Gln Arg Glu Ser Pro Ser Thr Gly Pro
 165 170 175

60
 Trp Pro Cys Pro Gln Asp Pro Leu Glu Ala Ser Arg Cys Val Val His
 180 185 190

65
 Gly Ala Glu Phe Trp Ser Glu Tyr Arg Ile Asn Val Thr Glu Val Asn
 195 200 205

ES 2 275 268 T3

Pro Leu Gly Ala Ser Thr Cys Leu Leu Asp Val Arg Leu Gln Ser Ile
 210 215 220
 5 Leu Arg Pro Asp Pro Pro Gln Gly Leu Arg Val Glu Ser Val Pro Gly
 225 230 235 240
 Tyr Pro Arg Arg Leu His Ala Ser Trp Thr Tyr Pro Ala Ser Trp Arg
 10 245 250 255
 Arg Gln Pro His Phe Leu Leu Lys Phe Arg Leu Gln Tyr Arg Pro Ala
 15 260 265 270
 Gln His Pro Ala Trp Ser Thr Val Glu Pro Ile Gly Leu Glu Glu Val
 275 280 285
 Ile Thr Asp Ala Val Ala Gly Leu Pro His Ala Val Arg Val Ser Ala
 20 290 295 300
 Arg Asp Phe Leu Asp Ala Gly Thr Trp Ser Ala Trp Ser Pro Glu Ala
 305 310 315 320
 Trp Gly Thr Pro Ser Thr Gly Pro Leu Gln Asp Glu Ile Pro Asp Trp
 25 325 330 335
 Ser Gln Gly His Gly Gln Gln Leu Glu Ala Val Val Ala Gln Glu Asp
 30 340 345 350
 Ser Pro Ala Pro Ala Arg Pro Ser Leu Gln Pro Asp Pro Arg Pro Leu
 355 360 365
 Asp His Arg Asp Pro Leu Glu Gln Val Ala Val Leu Ala Ser Leu Gly
 35 370 375 380
 Ile Phe Ser Cys Leu Gly Leu Ala Val Gly Ala Leu Ala Leu Gly Leu
 385 390 395 400
 40 Trp Leu Arg Leu Arg Arg Ser Gly Lys Asp Gly Pro Gln Lys Pro Gly
 405 410 415
 45 Leu Leu Ala Pro Met Ile Pro Val Glu Lys Leu Pro Gly Ile Pro Asn
 420 425 430
 50
 Leu Gln Arg Thr Pro Glu Asn Phe Ser
 435 440
 55
 60
 65