



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 310 660**

⑮ Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01) **C12N 15/19** (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) **C12N 15/63** (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01) **C07K 16/24** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) **G01N 33/567** (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **03729693 .6**

⑯ Fecha de presentación : **21.01.2003**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1476541**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2004**

⑭ Título: **Citoquina (ligando Zcytor17).**

⑩ Prioridad: **18.01.2002 US 350325 P**
25.04.2002 US 375323 P
19.12.2002 US 435315 P

⑬ Titular/es: **ZymoGenetics, Inc.**
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102, US

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2009

⑯ Inventor/es: **Sprecher, Cindy A.;**
Kuijper, Joseph, L.;
Dasovich, Maria M.;
Grant, Francis, J.;
Hammond, Angela K.;
Novak, Julia, E.;
Gross, Jane A. y
Dillon, Stacey, R.

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2009

⑯ 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

Citoquina (ligando Zcytor17).

5 **Antecedentes de la invención**

La proliferación y diferenciación de células de organismos multicelulares son controladas por hormonas y factores de crecimiento polipeptídicos. Estas moléculas difundibles permiten que las células se comuniquen entre sí y actúen juntas para formar células, tejidos y órganos, y para reparar tejido dañado. Los ejemplos de hormonas y factores de crecimiento incluyen las hormonas esteroideas (p. ej., estrógeno, testosterona), hormona paratiroides, hormona estimulante de folículos, interleucinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina (EPO) y calcitonina.

15 Las hormonas y los factores de crecimiento influyen en el metabolismo celular, uniéndose a receptores. Los receptores pueden ser proteínas de membranas integrales que se unen a vías de señalización dentro de la célula, tales como sistemas de segundos mensajeros. Otras clases de receptores son moléculas solubles, como los factores de transcripción.

20 Las citocinas en general estimulan la proliferación o diferenciación de células del linaje hematopoyético o participan en los mecanismos de respuestas inmunitarias e inflamatorias del organismo. Los ejemplos de citocinas que afectan la hematopoyesis son la eritropoyetina (EPO), que estimula el desarrollo de glóbulos rojos; la trombopoietina (TPO), que estimula el desarrollo de células del linaje de megacariocitos; y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), que estimula el desarrollo de neutrófilos. Estas citocinas son útiles para restaurar los niveles normales 25 de células sanguíneas en pacientes que sufren de anemia, trombocitopenia y neutropenia, o que reciben quimioterapia para el cáncer.

30 Las interleucinas son una familia de citocinas que median las respuestas inmunológicas, incluyendo la inflamación. Las interleucinas median una diversidad de patologías inflamatorias. Las células T desempeñan una función central para una respuesta inmunitaria y producen muchas citocinas e inmunidad adaptativa a antígenos. Las citocinas producidas por las células T han sido clasificadas como de tipo 1 y de tipo 2 (Kelso, A. *Immun. Cell Biol.* 76:300-317, 1998). Las citocinas de tipo 1 incluyen IL-2, IFN- γ , LT- α , y están implicadas en respuestas inflamatorias, inmunidad vírica, inmunidad parasitaria intracelular y rechazo de aloinjertos. Las citocinas de tipo 2 incluyen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, y están implicadas en respuestas humorales, inmunidad a helmintos y respuesta alérgica. 35 Las citocinas compartidas entre los tipos 1 y 2 incluyen IL-3, GM-CSF y TNF- α . Existen algunos datos que indican que el tipo 1 y el tipo 2 que producen poblaciones de células T preferencialmente migran a diferentes tipos de tejido inflamado.

40 Las células T maduras pueden ser activadas, es decir, por un antígeno u otro estímulo, para producir, por ejemplo, citocinas, moléculas de señalización bioquímica o receptores que influyen también sobre el destino de la población de células T.

45 Las células B pueden activarse mediante receptores en su superficie celular, incluyendo receptores de células B y otras moléculas accesorias para desempeñar funciones celulares accesorias, como la producción de citocinas.

Los monocitos/macrófagos y las células T pueden ser activados por receptores en su superficie celular y desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria, presentando antígeno a los linfocitos, y también actúan como células accesorias para los linfocitos, segregando numerosas citocinas.

50 Los linfocitos citolíticos naturales (NK) tienen una célula progenitora común con las células T y las células B, y desempeñan una función en la vigilancia inmunitaria. Los linfocitos citolíticos naturales, que comprenden hasta 15% de los linfocitos de la sangre, no expresan receptores de antígenos y, por lo tanto, no usan reconocimiento MHC como requerimiento para unirse a una célula diana. Los linfocitos citolíticos naturales están implicados en el reconocimiento y la destrucción de determinadas células tumorales y células infectadas por virus. Se cree que, *in vivo*, los linfocitos citolíticos naturales requieren activación, no obstante, se ha demostrado que, *in vitro*, los linfocitos citolíticos naturales destruyen algunos tipos de células tumorales sin activación.

60 La base de datos EMBL [en Internet] del 16 de abril de 2000, XP002353116, recuperada de EBI Acc. No. EM_HUM:AC048338, provee la secuencia *Homo sapiens* 12 BAC RP11-512M8 completa.

La base de datos EMBL [en Internet] del 8 de febrero de 2001, XP002353117, recuperada de EBI Acc. No. EM_PRO:AK005939, provee el clon de cDNA de testículo masculino adulto *Mus musculus*: 1700013B14.

65 Las actividades demostradas *in vivo* de la familia de citocinas ilustran el enorme potencial clínico y la necesidad de otras citocinas, agonistas de citocinas y antagonistas de citocinas. La presente invención se dirige a estas necesidades, proporcionando una nueva citocina que estimula células del linaje de células hematopoyéticas, como también composiciones y métodos relacionados.

ES 2 310 660 T3

La presente invención provee un polipéptido aislado que comprende una secuencia de residuos aminoácidos que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de residuos aminoácidos seleccionada del grupo de: (a) el polipéptido que se muestra desde los residuos 38 (Val) hasta 152 (Leu), como se muestra en la SEC ID NO: 2; (b) el polipéptido que se muestra desde los residuos 27 (Leu) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2; (c) el polipéptido que se muestra desde los residuos 24 (Ser) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2; y (d) el polipéptido que se muestra desde los residuos 1 (Met) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2

El término Zcytor17lig, cuando se usa en la presente solicitud, se refiere a las secuencias de ácido nucleico y polipéptido, como se define en las reivindicaciones.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración de una alineación múltiple de zcytor17lig humano (SEC ID NO: 2) (mzcytor17lig), zcytor17lig de ratón (SEC ID NO: 11) (mzcytor17lig), IL-3 de ratón (mIL-3) (SEC ID NO: 100) e IL-3 humana (hIL-3) (SEC ID NO: 102).

La Figura 2 es una ilustración de una alineación múltiple de zcytor17lig humano (SEC ID NO: 2) (zcytor17lig), y zcytor17lig de ratón (SEC ID NO: 11) (mzcytor17lig).

20 La Figura 3 es un trazado de hidrofilicidad Hopp/Woods de zcytor17lig humano (SEC ID NO: 2).

Descripción detallada de la invención

Antes de exponer la invención en detalle, tal vez resulte útil para entenderla, definir los siguientes términos y expresiones:

La expresión “marcador de afinidad” se usa en la presente memoria para indicar un segmento de polipéptido que puede estar unido a un segundo polipéptido para proporcionar la purificación o detección del segundo polipéptido o para proveer sitios de unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, como marcador de afinidad, se puede utilizar cualquier péptido o proteína para el o la cual esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico. Los marcadores de afinidad incluyen una extensión de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al.*, *EMBOJ* 4:1075, 1985; Nilsson *et al.*, *Methods Enzymol* 198:3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, *Gene* 67:31, 1998), marcador de afinidad Glu-Glu (Grussemeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7952-4, 1985), sustancia P, péptido FlagTM (Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6:1204-10, 1988), péptido de unión a estreptavidina u otro epítopo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford *et al.*, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107, 1991. Los DNA que codifican marcadores de afinidad se obtienen de proveedores comerciales (p. ej., Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

La expresión “variante alélica” se utiliza en la presente memoria para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede producir un polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante alélica se utiliza también para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

45 Los términos “aminoterminal” y “carboxiterminal” se utilizan en la presente memoria para indicar posiciones dentro de polipéptidos. Si el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia o porción de un polipéptido particular para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una secuencia determinada ubicada carboxiterminal a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está ubicada próxima el término carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el término carboxilo del polipéptido completo.

50 La expresión “par de complemento/anticomplemento” indica restos no idénticos que forman un par estable no covalentemente asociado bajo condiciones apropiadas. Por ejemplo, biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par de complemento/anticomplemento. Otros pares ilustrativos de complementos/anticomplementos incluyen pares receptor/ligando, pares anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítopo), pares de polinucleótidos sentido/antisentido y similares. Cuando se deseé la disociación posterior del par de complemento/anticomplemento, el par de complemento/anticomplemento preferiblemente tendrá una afinidad de unión de $<10^9 M^{-1}$.

60 La expresión “complementos de una molécula de polinucleótidos” indica una molécula de polinucleótidos que tiene una secuencia base complementaria y orientación inversa según lo comparado con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria a 5' CCCGTGCAT 3'.

65 El término “cóntigo” indica un polinucleótido que tiene una extensión contigua de secuencia idéntica o complementaria a otro polinucleótido. Se dice que las secuencias contiguas se “superponen” a una extensión determinada de secuencia de polinucleótidos o bien en su totalidad o a lo largo de una extensión parcial del polinucleótido. Por ejemplo, los cóntigos representativos para la secuencia de polinucleótidos 5'-ATGGCTTAGCTT-3' son 5'-TAGCTTgagtct-3' y 3'-gtcgactACCGA-5'

ES 2 310 660 T3

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

5 La expresión “vector de expresión” se emplea para indicar una molécula de DNA, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés operativamente unido a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Dichos segmentos adicionales incluyen secuencias promotoras y terminadoras, y pueden también incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, 10 etc. Los vectores de expresión en general derivan de DNA plasmídico o vírico, o pueden contener elementos de ambos.

15 El término “aislado”, cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido ha sido eliminado de su entorno genético natural y está entonces libre de otras secuencias codificantes extrañas o indeseadas, y está en una forma adecuada para uso dentro de sistemas de producción de proteínas genotecnológicas. Dichas moléculas aisladas son aquellas que se separan de su entorno natural e incluyen clones genómicos y cDNA. Las moléculas de DNA aisladas de la presente invención están exentas de otros genes con los que se asocian comúnmente, pero pueden incluir regiones 5' y 3' naturales sin traducir, como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será obvia para el experto en la técnica (véase, por ejemplo, Dynan y Tijan, *Nature* 316:774-78, 1985).

20 Una proteína o polipéptido “aislado” es una proteína o un polipéptido que se encuentra en una condición distinta de su entorno natural, por ejemplo separado de sangre y tejido animal. En una forma preferida, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal. Se prefiere proveer los polipéptidos en forma altamente purificada, es decir, pureza superior a 95%, más preferiblemente pureza superior a 99%. Cuando se utiliza en este contexto, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas 25 físicas alternativas, como dímeros o formas alternativamente glucosiladas o derivatizadas.

30 El término “neoplásico”, cuando se refiere a células, indica células que sufren proliferación nueva y anormal, particularmente en un tejido en el que la proliferación es descontrolada y progresiva, provocando una neoplasia. Las células neoplásicas pueden ser malignas, es decir, invasivas, y metastásicas, o benignas.

35 La expresión “operativamente unido”, cuando se refiere a segmentos de DNA, indica que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan juntos para sus fines pretendidos, p. ej., la transcripción se inicia en el promotor y continúa a través del segmento codificante hacia el terminador.

40 El término “ortólogo” indica un polipéptido o una proteína obtenida de una especie que es la contrapartida funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencias entre ortólogos son el resultado de la especiación.

45 “Parálogos” son proteínas distintas pero estructuralmente relacionadas elaboradas por un organismo. Se cree que 40 los parálogos surgen a través de la duplicación de genes. Por ejemplo, α -globina, α -globina y mioglobina son parálogos entre sí.

50 Un “polinucleótido” es un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídas desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen RNA y DNA, y pueden aislarse de 55 fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviados “bp”), nucleótidos (“nt”), o kilobases (“kb”). Si el contexto lo permite, los últimos dos términos pueden describir polinucleótidos que son monocatenarios o bicatenarios. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, se usa para indicar longitud total y se entenderá que es equivalente a la expresión “pares de bases”. Los expertos en la técnica reconocerán que dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir levemente en longitud y que sus extremos pueden escalonarse como resultado de la escisión enzimática; por lo tanto, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótidos bicatenaria pueden no estar apareados.

55 Un “polipéptido” es un polímero de residuos aminoácido unidos por enlaces peptídicos, naturales o sintéticos. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos aminoácido comúnmente se denominan “péptidos”.

60 El término “promotor” se usa en la presente memoria por su significado reconocido en la técnica para indicar una porción de un gen que contiene secuencias de DNA que proporcionan la unión de RNA polimerasa y la iniciación de la transcripción. Las secuencias promotoras comúnmente, pero no siempre, se encuentran en las regiones no codificantes 5' de los genes.

65 Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptidos. Una proteína puede también comprender componentes no peptídicos, como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser añadidos a una proteína por la célula en la que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente memoria en términos de sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; los sustituyentes tales como los grupos carbohidrato en general no se especifican, pero pueden estar presentes de todos modos.

ES 2 310 660 T3

El término “receptor” indica una proteína asociada a una célula que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores unidos a membranas se caracterizan por una estructura de múltiples péptidos que comprende un dominio de unión a un ligando extracelular y un dominio efector intracelular que está típicamente implicado en la transducción de señales. La unión del ligando al receptor proporciona

- 5 un cambio conformacional en el receptor, que causa una interacción entre el dominio efector y otra molécula(s) en la célula. Esta interacción, a su vez, conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los eventos metabólicos que están asociados a interacciones receptor-ligando incluyen la transcripción de genes, fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP cíclico, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. En general, los receptores pueden estar 10 unidos a membranas, ser cistólicos o nucleares; monoméricos (p. ej., receptor de la hormona estimulante de la tiroides, receptor beta-adrenérgico) o multiméricos (p. ej., receptor de PDGF, receptor de la hormona del crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6).

- 15 La expresión “secuencia de señal secretora” indica una secuencia de DNA que codifica un polipéptido (un “péptido secretor”) que, como componente de un péptido más grande, dirige el polipéptido más grande a través de una vía secretora de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido más grande comúnmente es escindido para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la vía secretora.

- 20 La expresión “variante de empalme” se utiliza en la presente memoria para indicar formas alternativas de RNA transcritas de un gen. La variación de empalmes surge naturalmente a través del uso de sitios de empalme alternativos dentro de una molécula de RNA transcrita, o menos normalmente entre moléculas de RNA transcritas separadamente, y puede proporcionar varios mRNA transcritos del mismo gen. Las variantes de empalme pueden codificar polipéptidos que tengan la secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante de empalme se utiliza también aquí para indicar una proteína codificada por una variante de empalme de un mRNA transcrit de un gen.

- 25 Se entenderá que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros determinados por métodos analíticos imprecisos (p. ej., electroforesis en gel) serán valores aproximados. Cuando se expresen dichos valores como “alrededor de” X o “aproximadamente” X, se entenderá que el valor establecido de X será $\pm 10\%$ preciso.

- 30 Todas las referencias citadas en esta memoria se incorporan por referencia en su totalidad.

- La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de una nueva secuencia de DNA que codifica una proteína que tiene la estructura de una citocina de cuatro hélices. A través de procedimientos de clonación y de ensayos de proliferación descritos en detalle en la presente memoria, se ha identificado una secuencia de polinucleótidos que 35 codifica un nuevo polipéptido ligando que es un ligando con alta especificidad hacia el receptor zcytor17 (SEC ID NO: 5) y por lo menos una subunidad adicional que comprende el receptor OncostatinM beta (OSMRbeta) (SEC ID NO: 7) y WSX-1 (SEC ID NO: 9). Este ligando de polipéptidos, designado zcytor17lig, se aisló de una genoteca de cDNA generada a partir de células de sangre periférica humana activadas (hPBC), que se seleccionaron para CD3. CD3 es un marcador de la superficie celular único para las células de origen linfoide, particularmente las células T.

- 40 En los ejemplos que siguen, se usó una línea celular que depende de la vía unida a los receptores OSMRbeta y zcytor17, o que depende de la vía unida a los receptores OSMRbeta y WSX-1, y zcytor17 para supervivencia y multiplicación en ausencia de otros factores de crecimiento, para seleccionar una fuente del cDNA que codifica zcytor17lig. La línea celular dependiente del factor de crecimiento preferida que se usó para transfección y expresión 45 del receptor zcytor17 fue BaF3 (Palacios y Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 6: 4133-4135, 1986). No obstante, son adecuadas para este propósito, otras líneas celulares dependientes del factor de crecimiento, por ejemplo FDC-P1 (Hapel *et al.*, *Blood* 64: 786-790, 1984) y MO7e (Kiss *et al.*, *Leukemia* 7: 235-240, 1993).

- 50 La secuencia de aminoácidos para los receptores de OSMR, WSX-1 y zcytor17 indicó que los receptores codificados pertenecían a la subfamilia de receptores de citocina de Clase I que incluye, pero sin limitarse a ellos, los receptores de IL-2, IL-4, IL-7, Lif, IL-12, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF y G-CSF (para revisión, véase Cosman, “The Hematopoietin Receptor Superfamily” en *Cytokine* 5(2): 95-106, 1993). El receptor zcytor17 se describe en detalle en la solicitud de patente de propiedad común PCT No. US01/20484 (publicación WIPO No. WO 02/00721), y WSX- 55 1 se describe en detalle en la patente estadounidense No. 5.925.735. El análisis de distribución de tejido del mRNA del receptor zcytor17 reveló expresión en subconjuntos de células T CD4+ y CD8+ activadas, monocitos CD14+, y expresión más débil en células B CD19+. Asimismo, el mRNA estuvo presente en ambas líneas celulares monocíticas, en reposo o activadas, THP-1 (ATCC No. TIB-202), U937 (ATCC No. CRL-1593.2) y HL60 (ATCC No. CCL-240).

- 60 La expresión de WSX-1 es la más fuerte en timo, bazo, leucocitos de sangre periférica y ganglio linfático, y también se observa una mayor expresión de células T activadas. La distribución de tejido para OSMRbeta se describe como muy amplia. La distribución de tejido de estos tres receptores indica que una diana para el Zcytor17lig pronosticado consiste en células de linaje hematopoyético, en particular células T, monocitos/macrófagos y células progenitoras linfoideas y células linfoideas. Otras citocinas de cuatro hélices conocidas que actúan sobre las células linfoideas incluyen 65 IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15. Para una revisión de las citocinas de cuatro hélices, véanse, Nicola *et al.*, *Advances in Protein Chemistry* 52:1-65, 1999 y Kelso, A., *Immunol. Cell Biol.* 76:300-317, 1998.

ES 2 310 660 T3

Los medios condicionados (CM) de células de sangre periférica humana estimuladas con PMA/Ionomicina seleccionadas para CD3+ soportaron el crecimiento de células BaF3 que expresaron el receptor zcyt17, el receptor OSMRbeta y WSX-1, y fueron dependientes de IL-3. El medio condicionado de células que no fueron: 1) estimuladas con PMA/Ionomicina; o que no fueron; 2) seleccionadas para CD3 (con o sin estimulación de PMA/Ionomicina) no soportaron el crecimiento de células BaF3 que expresan células que expresan los receptores zcyt17, OSMRbeta y WSX-1 (BaF3/zcyt17/WSX-1/OSMRbeta). Los experimentos de control demostraron que esta actividad proliferativa no fue atribuible a otros factores de crecimiento conocidos, y que la capacidad de dichos medios condicionados de estimular la proliferación de células que expresan los receptores zcyt17/WSX-1/OSMRbeta podría neutralizarse por una forma soluble del receptor zcyt17.

10 Los medios condicionados de células seleccionadas para CD3+ activadas con PMA/Ionomicina también soportaron el crecimiento de células BaF3 que expresaron el receptor zcyt17 y el receptor OSMRbeta (zcyt17/OSMRbeta), mientras que las células BaF3 que expresan solamente el receptor zcyt17 y el receptor WSX-1 (zcyt17/WSX-1), o que contienen solamente el receptor OSMRbeta, no fueron estimuladas por estos medios condicionados.

15 La proliferación de células BaF3 que expresan los receptores zcyt17/WSX-1/OSMRbeta expuestas a CM de células de sangre periférica humana estimuladas con PMA/Ionomicina seleccionadas para CD3+ se identificaron por inspección visual de los cultivos y/o por ensayo de proliferación. Se conocen en la técnica muchos ensayos de proliferación adecuados que incluyen ensayos para reducción de un tinte como AlamarBlue™ (AccuMed International, Inc. 20 Westlake, Ohio), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Mosman, *J. Immunol. Meth.* **65**: 55-63, 1983); 3,(4,5-dimetil tiazol-2-il)-5-3-carboximetoxifenil-2H-tetrazolio; hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio; y cloruro de cianoditolil-tetrazolio (comercializados por Polysciences, Inc., Warrington, PA); ensayos de mitogénesis, por ejemplo medición de la incorporación de ³H-timidina; ensayos de exclusión de tinte, que usan, por ejemplo, negro de naftaleno o azul de tripano; absorción de tinte usando diacetil fluoresceína; y liberación de cromo. Véase, en general, Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 25 3era ed., Wiley-Liss, 1994, que se incorpora a la presente memoria por referencia.

30 Se preparó una genoteca de cDNA a partir de células de sangre periférica humana primarias estimuladas con PMA y Ionomicina, seleccionadas para CD3+. La genoteca de cDNA de células de sangre periférica humana estimuladas con PMA y Ionomicina, seleccionadas para CD3+ se dividió en grupos que contenían múltiples moléculas de cDNA, y se transfeció a una línea celular hospedante, por ejemplo, células BHK 570 (No. de acceso ATCC 10314). Las células hospedantes transfectadas se cultivaron en un medio que no contenía factores de crecimiento exógenos (p. ej., FBS al 5%) y se recogió medio condicionado. Se ensayó la capacidad de los medios condicionados de estimular la proliferación de células BaF3 transfectadas con los receptores zcyt17, WSX-1 y OSMRbeta. Se identificaron grupos 35 de cDNA que producían medio condicionado que estimulaba los receptores BaF3/zcyt17/WSX-1/OSMRbeta. Este cDNA plasmídico combinado se electroporó en *E. coli*. Se aisló cDNA de colonias sencillas y se transfeció individualmente a células BHK 570. Se identificaron clones positivos mediante un resultado positivo del ensayo de proliferación de los receptores BaF3/zcyt17/WSX-1/OSMRbeta, y la actividad se confirmó por neutralización de la proliferación, usando el receptor soluble zcyt17.

40 Se aisló un clon positivo, y el análisis de secuencia reveló que la secuencia de polinucleótidos contenida dentro del DNA plasmídico era nueva. La secuencia de señal secretora está comprendida por los residuos aminoácido 1 (Met) a 23 (Ala), y el polipéptido maduro está comprendido por los residuos aminoácido 24 (Ser) a 164 (Thr) (como se muestra en la SEC ID NO: 2). Otros análisis de secuenciación N-terminal de zcyt17lig purificado de células 293T 45 demostró un término N en el residuo 27 (Leu), como se muestra en la SEC ID NO: 2, con el polipéptido maduro comprendido por los residuos aminoácido 27 (Leu) a 164 (Thr) (como se muestra en la SEC ID NO: 2).

50 En general, se pronostica que las citocina tienen una estructura de cuatro hélices, en la que las hélices A, C y D son las más importantes en las interacciones ligando-receptor, y están más altamente conservadas entre los miembros de la familia. Haciendo referencia a la secuencia de aminoácidos zcyt17lig humana que se muestra en la SEC ID NO: 2, la alineación de las secuencias de aminoácidos zcyt17lig humana, IL-3 humana y citocina humana, se pronostica que la hélice A de zcyt17lig está definida por los residuos aminoácido 38-52; la hélice B por los residuos aminoácido 83-98; la hélice C por los residuos aminoácido 104-117; y la hélice D por los residuos aminoácido 137-152; como se muestra en la SEC ID NO: 2. El análisis estructural indica que el bucle A/B es largo, el bucle B/C es corto y el bucle C/D es largo. Esta estructura de bucles produce una organización helicoidal ascendente-ascendente-descendente-descendente. En base a la estructura de cuatro hélices, los residuos cisteína dentro de zcyt17lig que se conservan corresponden a los residuos aminoácido 72, 133 y 147 de la SEC ID NO: 2; y 74, 137 y 151 de la SEC ID NO: 11 que se describen en la presente memoria. Coherente con la ubicación de la cisteína se confirma también la estructura de cuatro hélices. El residuo Glu también se encuentra altamente conservado en el zcyt17lig, como se muestra en la SEC ID NO: 2 en el residuo 43.

60 Además, la secuencia de aminoácidos pronosticada de zcyt17lig murino muestra 31% identidad con la proteína humana pronosticada en toda la longitud de las secuencias (SEC ID NO: 2 y SEC ID NO: 11). En base a la comparación entre secuencias de zcyt17lig humano y murino, se hallaron residuos conservados en las regiones pronosticadas por codificar las hélices alfa C y D. Los correspondientes polinucleótidos que codifican las regiones, dominios, motivos, residuos y secuencias de polipéptidos de zcyt17lig humanos que se describen en la presente memoria, se muestran en la SEC ID NO: 1.

ES 2 310 660 T3

Si bien la hélice D está relativamente conservada entre zcytor17lig humano y murino, la hélice C es la más conservada. Aunque ambas especies tienen aminoácidos ácidos predominantes en esta región, las diferencias pueden dar cuenta de la especificidad de las especies en la interacción entre zcytor17lig y su receptor, comprendiendo zcytor17 receptores monoméricos, heterodiméricos (p. ej., zcytor17/OSMRbeta, WSX-1/OSMRbeta, zcytor17/WSX-1) o multímericos (p. ej., zcytor17/OSMRbeta/WSX-1). El bucle A/B y la hélice B de zcytor17lig se conservan marginalmente, y la hélice C a través del bucle C/D en la hélice D es la más conservada entre las especies; la conservación a través de esta región indica que es funcionalmente significativa. Las hélices D de zcytor17lig murino y humano también están conservadas. Los antagonistas de los receptores Zcytor17 pueden diseñarse a través de mutaciones dentro de la hélice D de zcytor17lig. Éstas pueden incluir truncación de la proteína del residuo Thr156 (SEC ID NO: 2), o la conservación de residuos que confieren unión del ligando al receptor, pero que disminuyen la actividad de señalización.

Las citocinas de cuatro hélices también se agrupan por longitud de las hélices que las componen. Las citocinas de “hélice larga” en general consisten en hélices de 24-30 residuos que incluyen IL-6, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibidor de leucemia (UP) y hormona del crecimiento humana (hGH). Las citocinas de “hélice corta” en general consisten en hélices de 18-21 residuos e incluyen IL-2, IL-4 y GM-CSF. Se cree que Zcytor17lig es un nuevo miembro del grupo de citocinas de hélice corta. Los estudios que usan CNTF e IL-6 demostraron que una hélice CNTF puede intercambiarse por la hélice equivalente en IL-6, confiriendo propiedades de unión a CTNF a la quimera. Por ende, parece ser que los dominios funcionales de citocinas de cuatro hélices se determinan en base a la homología estructural, independientemente de la identidad de secuencia, y pueden mantener la integridad funcional en una quimera (Kallen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 11859-11867, 1999). En consecuencia, los dominios helicoidales de zcytor17lig serán útiles para preparar moléculas de fusión quimérica, particularmente con otras citocinas de hélice corta para determinar y modular la especificidad de unión al receptor. Son de particular interés las proteínas de fusión obtenidas mediante ingeniería genética con hélice A y/o hélice D, y las proteínas de fusión que combinan dominios helicoidales y de bucle de otras citocinas de forma corta, como IL-2, IL-4, IL-15, Lif, IL-12, IL-3 y GM-CSF.

La secuencia de polinucleótidos para IL-2 humana se muestra en la SEC ID NO: 161, y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID NO: 162. La secuencia de señal secretora está comprendida por los residuos aminoácido 1 (Met) a 20 (Ser) de la SEC ID NO: 162; los nucleótidos 48 a 107 de la SEC ID NO: 161. El polipéptido maduro está comprendido por los residuos aminoácido 21 (Ala) a 156 (Thr) de la SEC ID NO: 162; los nucleótidos 108 a 515 de la SEC ID NO: 161. La hélice A de IL-2 humana está comprendida por los residuos aminoácido 27 (Thr) a 48 (Leu) de la SEC ID NO: 162; los nucleótidos 126 a 191 de la SEC ID NO: 161. La hélice B de IL-2 humana comprende la hélice B1 y la hélice B2. La hélice B1 de IL-2 humana está comprendida por los residuos aminoácido 73 (Ala) a 80 (Gin) de la SEC ID NO: 162; los nucleótidos 264 a 287 de la SEC ID NO: 161. La hélice B2 de IL-2 humana está comprendida por los residuos aminoácido 83 (Glu) a 92 (Val) de la SEC ID NO: 162; los nucleótidos 294 a 323 de la SEC ID NO: 161. Por lo tanto, la hélice B (que comprende las hélices B1 y B2) de IL-2 está representada por la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 168 (secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 167) en donde los residuos aminoácido 9 y 10 pueden ser cualquier aminoácido. La SEC ID NO: 168 es idéntica a los aminoácidos 73 (Ala) a 92 (Val) de la SEC NO: 162, en donde los aminoácidos 81 y 82 son cualquier aminoácido. En una forma preferida, la hélice B de IL-2 comprende los aminoácidos 73 (Ala) a 92 (Val) de la SEC ID NO: 162; los nucleótidos 264 a 323 de la SEC ID NO: 161. La hélice C de IL-2 humana está comprendida por los residuos aminoácido 102 (His) a 116 (Val) de la SEC ID NO: 162; los nucleótidos 351 a 395 de la SEC ID NO: 161. La hélice D de IL-2 humana está comprendida por los residuos aminoácido 134 (Thr) a 149 (Gin) de la SEC ID NO: 162; los nucleótidos 447 a 494 de la SEC ID NO: 161.

La secuencia de polinucleótidos para IL-4 humana se muestra en la SEC ID NO: 163, y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID NO: 164. La secuencia de señal secretora está comprendida por los residuos aminoácido 1 (Met) a 24 (Gly) de la SEC ID NO: 164; los nucleótidos 64 a 135 de la SEC ID NO: 163. El polipéptido maduro está comprendido por los residuos aminoácido 25 (His) a 153 (Ser) de la SEC ID NO: 164; los nucleótidos 136 a 522 de la SEC ID NO: 163. La hélice A de IL-4 humana está comprendida por los residuos aminoácido 30 (Thr) a 42 (Thr) de la SEC ID NO: 164; los nucleótidos 151 a 189 de la SEC ID NO: 163. La hélice B de IL-4 humana está comprendida por los residuos aminoácido 65 (Glu) a 83 (His) de la SEC ID NO: 164; los nucleótidos 256 a 312 de la SEC ID NO: 163. La hélice C de IL-4 humana está comprendida por los residuos aminoácido 94 (Ala) a 118 (Ala) de la SEC ID NO: 164; los nucleótidos 343 a 417 de la SEC ID NO: 163. La hélice D de IL-4 humana está comprendida por los residuos aminoácidos 133 (Leu) a 151 (Cys) de la SEC ID NO: 164; los nucleótidos 460 a 516 de la SEC ID NO: 163.

La secuencia de polinucleótidos para GM-CSF humano se muestra en la SEC ID NO: 165 y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID NO: 166. La secuencia de la señal secretora está comprendida por los residuos aminoácido 1 (Met) a 17 (Ser) de la SEC ID NO: 166; los nucleótidos 9 a 59 de la SEC ID NO: 165. El polipéptido maduro está comprendido por los residuos aminoácido 18 (Ala) a 144 (Glu) de la SEC ID NO: 166; los nucleótidos 60 a 440 de la SEC ID NO: 165. La hélice A de GM-CSF humano está comprendida por los residuos aminoácido 30 (Trp) a 44 (Asn) de la SEC ID NO: 166; los nucleótidos 96 a 140 de la SEC ID NO: 165. La hélice B de GM-CSF humano está comprendida por los residuos aminoácido 72 (Leu) a 81 (Gln) de la SEC ID NO: 166; los nucleótidos 222 a 251 de la SEC ID NO: 165. La hélice C de GM-CSF humano está comprendida por los residuos aminoácido 85 (Gly) a 103 (Gln) de la SEC ID NO: 166; los nucleótidos 261 a 317 de la SEC ID NO: 165. La hélice D de GM-CSF humano está comprendida por los residuos aminoácido 120 (Phe) a 131 (Leu) de la SEC ID NO: 166; los nucleótidos 366 a 401 de la SEC ID NO: 165.

ES 2 310 660 T3

Los residuos aminoácido que comprenden las hélices A, B, C y D, para zcytor17lig, IL-3, IL-2, IL-4 y GM-CSF humanos se exponen en la Tabla 1.

5

TABLA 1

	Hélice A	Hélice B	Hélice C	Hélice D	
zcytor17lig	38-52	83-98	104-117	137-152	de SEC ID NO:2
IL-3	35-45	73-86	91-103	123-141	de SEC ID NO: 102
IL-2	27-48	73-92	102-116	134-149	de SEC ID NO:162; o hélice B como se describe en SEC ID NO: 168
IL-4	30-42	65-83	94-118	133-151	de SEC ID NO: 164
GM-CSF	30-44	72-81	85-103	120-131	de SEC ID NO: 166

25 La presente invención provee moléculas de polinucleótidos, incluyendo moléculas de DNA y RNA, que codifican los polipéptidos zcytor17lig descritos en la presente memoria. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que, en vista de la degeneración del código genético, es posible una variación de secuencia considerable entre estas moléculas de polinucleótidos. La SEC ID NO: 3 es una secuencia de DNA degenerada que abarca todos los DNA que codifican el polipéptido zcytor17lig, y sus fragmentos, de la SEC ID NO: 2. Los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia degenerada de la SEC ID NO: 3 también proporciona todas las secuencias de RNA que codifican la SEC ID NO: 2 sustituyendo T por U. Por lo tanto, los polinucleótidos que codifican el polipéptido zcytor17lig, que comprenden el nucleótido 1 ó 70 al nucleótido 492 de la SEC ID NO: 3, y sus equivalentes de RNA, se contemplan en la presente invención. La Tabla 2 expone los códigos de una letra utilizados dentro de la SEC ID NO: 3 para indicar posiciones de nucleótidos degenerados. "Resoluciones" son los nucleótidos indicados por un código en letra. 30 "Complemento" indica el código para el nucleótido(s) complementario. Por ejemplo, el código Y indica C o T, y su complemento R indica A o G, en donde A es complementaria a T, y G es complementaria a C. 35

40

TABLA 2

	Nucleótido	Resolución	Complemento	Resolución
	A	A	T	T
45	C	C	G	G
	G	G	C	C
	T	T	A	A
50	R	A G	Y	C T
	Y	C T	R	A G
	M	A C	K	G T
55	K	G T	M	A C
	S	C G	S	C G
	W	A T	W	A T
60	H	A C T	D	A G T
	B	C G T	V	A C G
	V	A C G	B	C G T
65	D	A G T	H	A C T
	N	A C G T	N	A C G T

ES 2 310 660 T3

Los codones degenerados utilizados en la SEC ID NO: 3, que abarca todos los codones posibles para un aminoácido determinado, se exponen en la Tabla 3.

5

TABLA 3

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

La persona con experiencia ordinaria en la técnica apreciará que se introduce cierta ambigüedad para determinar un codón degenerado, representativo de todos los codones posibles que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar arginina (AGR), y el codón degenerado para arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre los codones que codifican fenilalanina y leucina. Por ende, algunos polinucleótidos abarcados por la secuencia degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, pero el experto en la técnica puede identificar fácilmente dichas secuencias variantes por referencia a la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2. Se puede ensayar fácilmente la funcionalidad de las secuencias variantes, como se describe en el presente documento.

ES 2 310 660 T3

La persona con experiencia ordinaria en la técnica apreciará que diferentes especies pueden exhibir “uso de codón preferencial”. En general, véanse, 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; Ikemura, *J. Mol. Biol.* 158:573-97, 1982. Tal como se emplea en esta memoria, la expresión 5 “uso de codón preferencial” o “codones preferenciales” es una expresión de la técnica que se refiere a codones de traducción de proteínas que se utilizan más frecuentemente en células de una especie determinada, favoreciendo así uno o algunos representantes de los posibles codones que codifican cada aminoácido (véase Tabla 3). Por ejemplo, el aminoácido Treonina (Thr) puede estar codificado por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en células mamíferas, ACC 10 es el codón más comúnmente utilizado; en otras especies, por ejemplo, en células de levadura, virus o bacterias de insectos pueden ser preferenciales diferentes codones Thr. Los codones preferenciales para una especie particular pueden introducirse en los polinucleótidos de la presente invención mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codones preferenciales a DNA recombinante puede, por ejemplo, potenciar la producción de la proteína, haciendo que la traducción de la proteína sea más eficaz dentro de un tipo o especie de célula particular. Por lo tanto, la secuencia del codón degenerado descrita en la SEC ID NO: 3 sirve como molde para 15 optimizar la expresión de polinucleótidos en diversos tipos y especies de células comúnmente utilizados en la técnica y descritos en esta memoria. Las secuencias que contienen codones preferenciales se pueden ensayar y optimizar para expresión en diversas especies, y también se pueden ensayar para funcionalidad, como se describe en este documento.

Como se observó previamente, los polinucleótidos aislados de la presente invención incluyen DNA y RNA. Los 20 métodos para preparar DNA y RNA se conocen en la técnica. En general, el RNA se aísla de un tejido o célula que produce grandes cantidades de RNA de zcytor17lig. Dichos tejidos y células se identifican por el método Northern (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5201, 1980), o estudiando un medio condicionado de diversos tipos de células para actividad en las células o tejidos diana. Una vez que se identifica la actividad o la célula o el tejido que produce 25 RNA, se puede preparar un RNA total usando extracción de isotiocianato de guanidino, seguida de aislamiento por centrifugación en un gradiente CsCl (Chirgwin *et al.*, *Biochemistry* 18:52-94, 1979). Poly (A)⁺ El RNA se prepara a partir de RNA total, usando el método de Aviv y Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-12, 1972). El ARN 30 complementario (cDNA) se prepara a partir de poly(A)+ RNA, usando métodos conocidos. Alternativamente, se puede aislar DNA genómico. Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos zcytor17lig se identifican luego y se aíslan, por ejemplo, por hibridación o PCR.

Se puede obtener un clon de longitud total que codifica zcytor17lig por procedimientos de clonación convencionales. Se prefieren los clones de DNA complementario (cDNA), aunque para algunas aplicaciones (p. ej., expresión de 35 animales transgénicos no humanos), puede ser preferible usar un clon genómico, o modificar un clon de cDNA para incluir por lo menos un intrón genómico. Los métodos para preparar cDNA y clones genómicos se conocen bien y están dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica, e incluyen el uso de la secuencia descrita en el presente documento, o partes de ésta, para sondear o cebar una colección. Las colecciones de expresión se pueden sondear con anticuerpos para fragmentos de zcytor17lig, receptores solubles que comprenden zcytor17 u otras parejas de unión específicas.

Las secuencias de polinucleótidos Zcytor17lig descritas en la presente memoria pueden también emplearse como 40 sondas o cebadores para clonar regiones no codificantes 5' de un gen zcytor17lig. En función de la expresión específica de tejido observada para zcytor17lig, se espera que esta región del gen proporcione expresión específica linfoides y hematopoyética. Los elementos promotores de un gen zcytor17lig podrían así usarse para dirigir la expresión específica de tejido de genes heterólogos, por ejemplo, en animales transgénicos no humanos o en pacientes tratados con genoterapia. La clonación de secuencias flanco 5' también facilita la producción de proteínas zcytor17lig por “activación de 45 genes”, como se describe en la patente estadounidense No. 5.641.670. En síntesis, la expresión de un gen zcytor17lig endógeno en una célula se altera introduciendo en el locus de zcytor17lig, un constructo de DNA que comprende por lo menos una secuencia diana, una secuencia reguladora, un exón y un sitio donante de empalme no apareado. La secuencia diana es una secuencia no codificante 5' de zcytor17lig que permite la recombinación homóloga del constructo 50 con el locus de zcytor17lig endógeno, mediante lo cual las secuencias dentro del constructo se tornan operativamente unidas a la secuencia codificante de zcytor17lig endógeno. De esta manera, un promotor de zcytor17lig endógeno se puede reemplazar o complementar con otras secuencias reguladoras para proporcionar expresión específica de tejido potenciada o, de otro modo, regulada.

La presente invención proporciona además polipéptidos y polinucleótidos de contrapartida a partir de otras especies 55 (ortólogos). Estas especies incluyen, aunque sin limitarse a ello, mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y otros vertebrados e invertebrados. Son de particular interés los polipéptidos zcytor17lig de especies mamíferas, por ejemplo, polipéptidos de murinos, porcinos, ovinos, bovinos, caninos, felinos, equinos y otros primates. Los ortólogos de zcytor17lig humano se pueden clonar usando la información y composiciones provistas por la presente invención 60 en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, se puede clonar un cDNA usando mRNA obtenido de un tipo de tejido o célula que exprese zcytor17lig, como se describe en esta memoria. Las fuentes de mRNA adecuadas se pueden identificar sondeando transferencias Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias descritas en este documento. Se prepara entonces una colección a partir de mRNA de un tejido o una línea celular positiva. Se puede aislar luego un cDNA que codifica zcytor17lig mediante una diversidad de métodos, como 65 sondeando con un cDNA humano completo o parcial, o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas en base a las secuencias descritas. También se puede clonar un cDNA usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis, patente estadounidense No. 4.683.202), usando cebadores diseñados a partir de la secuencia de zcytor17lig humana representativa descrita en esta memoria. Dentro de un método adicional, la genoteca de cDNA se puede usar para

ES 2 310 660 T3

transformar o transfectar células hospedantes, y la expresión del cDNA de interés se puede detectar con un anticuerpo para el polipéptido zcytor17lig, estudios de unión o ensayos de actividad. También pueden aplicarse técnicas similares para el aislamiento de clones genómicos.

- 5 La secuencia de polinucleótidos para el ortólogo de ratón de zcytor17lig ha sido identificada y se muestra en la SEC ID NO: 10 y en la SEC ID NO: 90, y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID NO: 11 y en la SEC ID NO: 91. La secuencia de polinucleótidos degenerados que codifica el polipéptido de la SEC ID NO: 11 se muestra en la SEC ID NO: 12. Para la secuencia de aminoácidos de citocina de ratón de zcytor17lig, se predice que la hélice A está definida por los residuos aminoácido 38-52; la hélice B por los residuos aminoácido 85-98; la hélice C por los residuos aminoácido 104-118; y la hélice D por los residuos aminoácido 141-157; como se muestra en la SEC ID NO: 11 y en la SEC ID NO: 91. Hay 31% identidad entre las secuencias de ratón y ser humano en toda la longitud de las secuencias de aminoácidos (SEC ID NO: 2 y SEC ID NO: 11) de zcytor17lig. La secuencia madura para el zcytor17lig de ratón comienza putativamente en Met₁, como se muestra en la SEC ID NO: 11, que corresponde a Met₁, como se muestra en la SEC NO: 2, en la secuencia humana. Los análisis de tejido revelaron que la expresión de zcytor17lig de ratón se halla en testículo, cerebro, células CD90+, células de próstata, glándulas salivales y piel. Otros análisis de secuenciación N-terminal de zcytor17lig purificado de células 293T mostró un término N en el residuo 31 (Ala), como se muestra en la SEC ID NO: 11 y en la SEC ID NO: 91, con el polipéptido maduro comprendido por los residuos aminoácido 31 (Ala) a 163 (Cys) (como se muestra en la SEC ID NO: 11 y en la SEC ID NO: 91).
- 10 20 Las personas con experiencia en la técnica reconocerán que la secuencia descrita en la SEC ID NO: 1 representa un alelo sencillo de zcytor17lig humano y que se espera que ocurran la variación alélica y el empalme alternativo. Las variantes alélicas de esta secuencia se pueden clonar sondando cDNA o genotecas genómicas de diferentes individuos según procedimientos convencionales. Las variantes alélicas de la secuencia de DNA que se muestran en la SEC ID NO: 1, incluyendo aquellas que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones provocan 25 cambios en la secuencia de aminoácidos, están dentro del alcance de la presente invención, ya que son proteínas que son variantes alélicas de la SEC ID NO: 2. Los cDNA generados a partir de mRNA alternativamente empalmados, que retienen las propiedades del polipéptido zcytor17lig, se incluyen dentro del alcance de la presente invención, ya que son polipéptidos codificados por dichos cDNA y mRNA. Las variantes alélicas y las variantes de empalme de 30 estas secuencias se pueden clonar sondando cDNA o genotecas genómicas de diferentes individuos o tejidos según procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

La presente invención también proporciona reactivos útiles en aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo, el gen zcytor17lig, una sonda que comprende DNA o RNA de zcytor17lig o una de sus secuencias, se puede utilizar para determinar si el gen zcytor17lig está presente en un cromosoma humano, como el cromosoma 12, o si ha tenido lugar 35 una mutación. Zcytor17lig está ubicado en la región 12q24.31 del cromosoma 12 (Ejemplo 13). Las aberraciones cromosómicas detectables en el locus del gen zcytor17lig incluyen, aunque sin limitarse a ello, aneuploidía, cambios en el número de copias del gen, pérdida de heterocigosisidad (LOH), translocaciones, inserciones, delecciones, cambios y 40 reordenaciones en el sitio de restricción. Dichas aberraciones pueden detectarse usando los polinucleótidos de la presente invención, empleando técnicas de genética molecular, como análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), análisis de repeticiones cortas en tandem (STR) empleando técnicas PCR, y otras técnicas de análisis de enlazadores genéticos conocidas en el campo (Sambrook *et al*, *ibid*; Ausubel *et. al.*, *ibid*; Marian, *Chest* 108:255-65.1995).

45 El conocimiento preciso de la posición de un gen puede ser útil para una serie de propósitos, que incluyen: 1) determinar si una secuencia es parte de un cónigo existente y obtener secuencias genéticas circundantes adicionales en diversas formas, como clones de cDNA, YAC o BAC; 2) proporcionar un posible gen candidato para una enfermedad hereditaria que muestre un enlazador a la misma región cromosómica; y 3) hacer referencia cruzada a organismos modelo, como el ratón, lo cual puede ayudar a determinar la función que podría tener un gen particular.

50 55 60 65 El experto en la técnica reconocería que la región 12q24 está frecuentemente implicada en enormes reordenaciones genómicas, a saber translocaciones, delecciones, inversiones y duplicaciones, que se asocian a diversos tipos de cáncer. La Base de Datos de Mitelman sobre Aberraciones Cromosómicas de Cáncer, en el Cancer Genome Anatomy Project, National Institutes of Health, Bethesda, Md, publicada en Internet, enumera 199 casos de cáncer con reordenaciones genómicas que implican la región 12q24. De éstos, la mayoría son parte de cariotipos complejos con otras reordenaciones; no obstante, en algunos casos, la reordenación que implica la región 12q24 es la única alteración genómica. Dada la expresión del receptor de zcytor17lig en células de linajes linfoides y mieloides, es particularmente importante destacar que existen por lo menos 4 casos de leucemia mieloide publicados en la bibliografía, en los que o bien la translocación (2 casos: Yamagata *et al*, *Cancer Genet Cytogenet* 97:90-93, 1997; Dunphy y Batanian, *Cancer Genet Cytogenet* 114:51-57, 1999) o la duplicación (2 casos: Bonomi *et al*, *Cancer Genet Cytogenet* 108:75-78, 1999) son la única alteración genómica. Esto indica que un gen o genes que residen dentro de 12q24 podrían estar directamente implicados en la transformación maligna de las células de estos pacientes. La sobreexpresión de zcytor17lig podría contribuir a la transformación maligna, promoviendo la proliferación aberrante de células que portan el receptor, a través de mecanismos autocrinos o paracrinos. La inhibición de la actividad del zcytor17lig podría así inhibir el crecimiento de dichas células. Alternativamente, una reordenación genómica, que provoca la inactivación del gen zcytor17lig, podría promover la transformación maligna y/o la metástasis, eliminando las funciones inmunorreguladoras del zcytor17lig. De hecho, se ha elaborado un mapa de un gen que suprime la metástasis en el cáncer de próstata a 12q24-qter (Ichikawa *et al*, *Asian J Androl* 2:167-171, 2000). Si zcytor17lig es el gen dentro de esta región responsable de la supresión de la metástasis, entonces el zcytor17lig en sí mismo puede tener valor terapéutico en el tratamiento del cáncer.

Un diagnóstico podría ayudar a los médicos a determinar el tipo de enfermedad y la terapia adecuada asociada, o la asistencia en el asesoramiento genético. Como tales, los anticuerpos, polinucleótidos y polipéptidos anti-zcyt17lig de la invención se pueden usar para la detección del polipéptido zcyt17lig, mRNA o anticuerpos anti-zcyt17lig, sirviendo así como marcadores, y usarse directamente para detectar enfermedades genéticas o cáncer, como se describe en la presente memoria, usando métodos conocidos en la técnica y descritos en este documento. Además, las sondas polinucleotídicas de zcyt17lig se pueden usar para detectar anomalías o genotipos asociados con delecciones y translocaciones del cromosoma 12q24.3 asociadas a enfermedades humanas, u otras translocaciones implicadas en la progresión de tumores malignos u otras mutaciones de 12q24.3, que se espera estén involucradas en las reordenaciones cromosómicas de la malignidad; o en otros tipos de cáncer. De modo similar, las del polinucleótido zcyt17lig se pueden usar para detectar anomalías o genotipos asociados a la trisomía del cromosoma 12, y pérdida cromosómica asociada a enfermedades humanas o aborto espontáneo. Por ende, las sondas polinucleotídicas de zcyt17lig se pueden usar para detectar anomalías o genotipos asociados con estos defectos.

El experto en la técnica reconocería que las sondas polinucleotídicas de zcyt17lig son particularmente útiles para el diagnóstico de anomalías cromosómicas importantes asociadas a pérdida de heterogeneidad (LOH), aumento de cromosomas (p. ej., trisomía), translocación, ampliación de DNA y similares. Se sabe que las translocaciones dentro del locus cromosómico 12q24.3, en el que está ubicado el gen zcyt17lig, se asocian a enfermedades humanas. Por ejemplo, las delecciones, translocaciones, duplicaciones y trisomía de 12q24 se asocian al cáncer, como se mencionó precedentemente. En consecuencia, ya que el gen zcyt17lig se mapea hacia esta región crítica, las sondas polinucleotídicas de zcyt17lig de la presente invención se pueden usar para detectar anomalías o genotipos asociados a la translocación, delección, trisomía y similares de 12q24, como se describió anteriormente.

Como se analizó precedentemente, los defectos en el gen zcyt17lig propiamente dicho pueden provocar una patología humana hereditaria. Las moléculas de la presente invención, como los polipéptidos, antagonistas, agonistas, polinucleótidos y anticuerpos de la presente invención ayudarían en la detección, diagnóstico, prevención y tratamiento asociados al defecto genético de zcyt17lig. Asimismo, las sondas polinucleotídicas de zcyt17lig se pueden usar para detectar diferencias alélicas entre individuos enfermos y no enfermos en el locus del cromosoma zcyt17lig. Como tales, las secuencias de zcyt17lig se pueden usar como diagnósticas en la formación de la huella genética forense.

En general, los métodos diagnósticos utilizados en el análisis de conexión genética para detectar una anomalía o aberración genética en un paciente, se conocen en la técnica. Las sondas analíticas tendrán en general por lo menos 20 nt de longitud, aunque se pueden usar sondas un poco más cortas (p. ej., 14-17 nt). Los cebadores de PCR tiene por lo menos 5 nt de longitud, preferiblemente 15 o más, más preferiblemente 20-30 nt. Para el análisis macroscópico de genes, o DNA cromosómico, una sonda polinucleotídica de zcyt17lig puede comprender un exón entero o más. El experto en la técnica determina fácilmente los exones, comparando las secuencias de zcyt17lig (SEC ID NO: 1) con el DNA genómico de zcyt17lig de ratón (SEC ID NO: 76). En general, los métodos de diagnóstico utilizados en el análisis de conexión genética, para detectar una anomalía o aberración genética en un paciente, se conocen en la técnica. La mayoría de los métodos de diagnóstico comprenden las etapas de (a) obtener una muestra genética de un paciente posiblemente enfermo, un paciente enfermo o un portador posiblemente no enfermo de un alelo enfermo recesivo; (b) producir un primer producto de reacción, incubando la muestra genética con una sonda polinucleotídica de zcyt17lig, en la que el polinucleótido se hibridará a la secuencia polinucleotídica complementaria, como en el análisis RFLP, o incubando la muestra genética con cebadores sentido y antisentido en una reacción PCR bajo condiciones de reacción PCR adecuadas; (iii) visualizar el primer producto de reacción por electroforesis en gel y/u otros métodos conocidos, tales como visualizar el primer producto de reacción con una sonda polinucleotídica de zcyt17lig, en la que el polinucleótido se hibridará a la secuencia polinucleotídica complementaria de la primera reacción; y (iv) comparar el primer producto de reacción visualizado con un segundo producto de reacción de control de una muestra genética de tipo salvaje de un paciente, o de un individuo normal o control. Una diferencia entre el primer producto de reacción y el producto de reacción de control es indicativa de una anomalía genética en el paciente enfermo o posiblemente enfermo, o la presencia de un fenotipo portador recesivo heterocigótico para 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 embrión pre-implantación. Por ejemplo, una diferencia en el patrón del fragmento de restricción, la longitud de los productos PCR, la longitud de secuencias repetitivas en el locus genético de zcyt17lig y similares, son indicativas de una anomalía genética, aberración genética o diferencia alélica en comparación con el control de tipo salvaje normal. Los controles pueden ser de miembros de la familia no afectados, o individuos no relacionados, dependiendo del ensayo y la disponibilidad de las muestras. Las muestras genéticas para uso dentro de la presente invención incluyen DNA, mRNA y cDNA genómicos aislados de cualquier tejido u otra muestra biológica de un paciente, lo que incluye, aunque sin limitarse a ello, sangre, saliva, semen, células embrionarias, líquido amniótico y similares. La sonda polinucleotídica o el cebador pueden ser RNA o DNA, y comprenderán una porción de la SEC ID NO: 1, el complemento de la SEC ID NO: 1, o su equivalente de RNA. Dichos métodos para mostrar el análisis de conexión genética a fenotipos de enfermedad humana se conocen en la técnica. Para referencia a los métodos basados en PCR en el diagnóstico, véanse, en general, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), White (ed.), *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (Humana Press, Inc. 1993), Cotter (ed.), *Molecular Diagnosis of Cancer* (Humana Press, Inc. 1996), Hanausek y Walaszek (eds.), *Tumor Marker Protocols* (Humana Press, Inc. 1998), Lo (ed.), *Clinical Applications of PCR* (Humana Press, Inc. 1998) y Meitzer (ed.), *PCR in Bioanalysis* (Humana Press, Inc. 1998).

ES 2 310 660 T3

Las mutaciones asociadas al locus de zcytor17lig se pueden detectar usando las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, empleando métodos convencionales para análisis de mutación directa, como análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, análisis de repeticiones cortas en tandem empleando técnicas PCR, análisis de sistemas de ampliación-mutación refractaria, detección de polimorfismos de conformación monocatenaria, 5 métodos de escisión de RNase, electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, análisis de emparejamiento incorrecto asistido por fluorescencia y otras técnicas de análisis genéticas conocidas en el campo (véanse, por ejemplo, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), Marian, *Chest* 108:255 (1995), Coleman y Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Human Press, Inc. 1996), Elles (ed.) *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), *Laboratory Protocols for Mutation Detection* (Oxford University Press 1996), Birren *et al* (eds.), *Genome Analysis, Vol. 2: Detecting Genes* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998), Dracopoli *et al* (eds.), *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 zcytor17lig para una mutación se puede realizar utilizando el DNA genómico de un sujeto. 10 El experto en la técnica conoce los métodos para ampliar DNA genómico obtenido, por ejemplo, de linfocitos de sangre periférica (véase, por ejemplo, Dracopoli *et al*. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, páginas 7.1.6 a 15 7.1.7 (John Wiley & Sons 1998)).

Las posiciones de los intrones en el gen zcytor17lig de ratón se determinaron por identificación de clones genómicos y posterior análisis de las uniones intrón/exón. El DNA genómico de ratón se muestra en la SEC ID NO: 76. 20 Con referencia a la SEC ID NO: 76, son manifiestos tres exones codificantes separados por intrones: el primero exón codificante se encuentra entre los números de ácido nucleico 1104-1119 de la SEC ID NO: 76, el segundo exón entre los números de ácido nucleico 1300-1451 de la SEC ID NO: 76 y el tercer exón entre los números de ácido nucleico 2411-2998 de la SEC ID NO: 76.

25 Dentro de las realizaciones de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican zcytor17lig aislado se pueden hibridar bajo condiciones rigurosas a las moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1, a las moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de nucleótidos de la 28 a 519 de la SEC ID NO: 1, o a las moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos complementaria a la SEC ID NO: 1. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan en aproximadamente 5°C menos que el punto de fusión 30 térmico (T_m) de la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. El T_m es la temperatura (bajo la fuerza iónica y el pH definidos) a la cual se hibrida 50% de la secuencia diana a una sonda perfectamente emparejada.

Un par de moléculas de ácido nucleico, como DNA-DNA, RNA-RNA y DNA-RNA, puede hibridarse si las secuencias de nucleótidos tienen el mismo grado de complementaridad. Los híbridos pueden tolerar pares de bases emparejados incorrectamente en la doble hélice, pero la estabilidad del híbrido es influenciada por el grado de emparejamiento incorrecto. El T_m del híbrido incorrectamente emparejado disminuye 1°C por cada 1-1,5% de emparejamiento incorrecto del par de bases. Variando la rigurosidad de las condiciones de hibridación es posible controlar el grado de emparejamiento incorrecto que estará presente en el híbrido. El grado de rigurosidad aumenta a medida que aumenta la temperatura de hibridación y que disminuye la fuerza iónica del tampón de hibridación.

40 El experto en la técnica tendrá la capacidad de adaptar estas condiciones para uso con un híbrido polinucleotídico particular. El T_m de una secuencia diana específica es la temperatura (bajo condiciones definidas) a la cual se hibridará 50% de la secuencia diana a una sonda perfectamente emparejada. Esas condiciones, que influyen sobre el T_m , incluyen el tamaño y el contenido de los pares de bases de la sonda polinucleotídica, la fuerza iónica de la solución 45 de hibridación y la presencia de agentes desestabilizantes en la solución de hibridación. Se conocen en la técnica numerosas ecuaciones para calcular el T_m , y son específicas de híbridos de DNA, RNA y DNA-RNA y de 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.*, (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* ("John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger y Kimmel (eds.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, (Academic Press, Inc. 1987); y Wetmur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:227 (1990)). Los programas para análisis de secuencias, tales como OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) y Primer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), como también los sitios de Internet, son herramientas disponibles para analizar una secuencia determinada y calcular el T_m en base a criterios definidos por el usuario. Dichos programas también pueden analizar una secuencia determinada bajo condiciones definidas e identificar secuencias de sondas adecuadas. Típicamente, la hibridación de 55 secuencias de polinucleótidos más largas, >50 pares de bases, se realiza a temperaturas que oscilan entre aproximadamente 20-25°C debajo del T_m calculado. Para sondas más pequeñas, <50 pares de bases, la hibridación típicamente se lleva a cabo a T_m o 5-10°C debajo del T_m calculado. Esto permite el índice máximo de hibridación de híbridos DNA-DNA y DNA-RNA.

60 Después de la hibridación, las moléculas de ácido nucleico se pueden lavar para eliminar las moléculas de ácido nucleico no hibridadas bajo condiciones rigurosas, o bajo condiciones altamente rigurosas. Las condiciones de lavado rigurosas típicas incluyen el lavado en una solución de 0,5x-2x SSC con dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1% a 55-65°C. Es decir, las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido zcytor17lig variante se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 (o su complemento) bajo 65 condiciones de lavado rigurosas, en las que la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5x-2x SSC con SDS al 0,1% a 55-65°C, incluyendo 0,5x SSC con SDS al 0,1% a 55°C, o 2x SSC con SDS al 0,1% a 65°C. El experto en la técnica puede planificar fácilmente las condiciones equivalentes, por ejemplo, sustituyendo SSC por SSPE en la solución de lavado.

ES 2 310 660 T3

Las condiciones típicas de lavado altamente rigurosas incluyen lavado en una solución de 0,1x-0,2x SSC con dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1% a 50-65°C. En otros términos, las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido zcytor17lig variante se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 (o su complemento) bajo condiciones altamente rigurosas, en las que la rigurosidad del lavado es 5 equivalente a 0,1x-0,2x SSC con SDS al 0,1% a 50-65°C, incluyendo 0,1x SSC con SDS al 0,1% a 50°C, o 0,2x SSC con SDS al 0,1% a 65°C.

La presente invención también provee polipéptidos zcytor17lig aislados que tienen una identidad de secuencia sustancialmente similar a los polipéptidos de la SEC ID NO: 2, o sus ortólogos. La expresión “identidad de secuencia 10 sustancialmente similar” se emplea en la presente memoria para indicar polipéptidos que comprenden por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% o más de 99% identidad de secuencia con las secuencias que se muestran en la SEC 15 ID NO: 2, o sus ortólogos. La presente invención incluye además polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% o más de 99% identidad de secuencia con los residuos aminoácido 1 a 162, o 33 a 162 de la SEC ID NO: 2. La presente invención incluye además moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos. Los métodos para determinar el porcentaje de identidad se describen a continuación.

20 La presente invención contempla también moléculas de ácido nucleico de zcytor17lig variante que pueden identificarse usando dos criterios: una determinación de la similitud entre el polipéptido codificado y la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2, y/o un ensayo de hibridación, como se describió anteriormente. Dichas variantes de zcytor17lig incluyen moléculas de ácido nucleico: (i) que se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 (o su complemento) bajo condiciones de lavado rigurosas, en las que la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5x-2x SSC con SDS al 0,1% a 55-65°C; o (2) que codifican un polipéptido 25 que tiene por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% o más de 99% identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2. Alternativamente, las variantes de zcytor17lig se pueden caracterizar como moléculas de ácido nucleico: (1) que se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 (o 30 su complemento) bajo condiciones altamente rigurosas, en las que la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,1x-0,2x SSC con SDS al 0,1% a 50-65°C; y (2) que codifican un polipéptido que tiene por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% o más de 99% identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2.

35 El porcentaje de identidad de secuencia se determina por métodos convencionales. Véanse, por ejemplo, Altschul *et al.*, *Bull. Math. Bio.* 48:603 (1986), y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1992). En síntesis, se alinean dos secuencias de aminoácidos para optimizar los puntajes de alineación usando una penalidad de apertura del espacio de 10, una penalidad de extensión del espacio de 1 y la matriz de puntaje “BLOSUM62” de Henikoff y Henikoff (*ibid.*) como se muestra en la Tabla 4 (los aminoácidos se indican con códigos convencionales de una sola letra).

Número total de emparejamientos idénticos

45 -----x 100

[longitud de la secuencia más larga más el
número de espacios introducidos a la secuencia más larga
50 para alinear las dos secuencias]

55

60

65

ES 2 310 660 T3

TABLA 4

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

Los expertos en la técnica apreciarán que hay disponibles muchos algoritmos establecidos para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un método de alineación de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartida por una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria y la secuencia de aminoácidos de un zcytor17lig variante putativo. El algoritmo FASTA es descrito por Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), y por Pearson, *Meth. Enzymol.*, 183:63 (1990).

En síntesis, FASTA caracteriza primero la similitud de secuencias identificando regiones compartidas por la secuencia interrogante (p. ej., SEC ID NO: 2) y una secuencia de prueba que tiene o bien la densidad de identidades más alta (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup=2), sin considerar sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácidos conservadoras. A las diez regiones con la densidad más alta de identidades se les vuelve a asignar luego un puntaje comparando la similitud de todos los aminoácidos apareados, usando una matriz de sustitución de aminoácidos, y los extremos de las regiones se "recortan" para incluir solamente aquellos residuos que contribuyen al puntaje más alto. Si hay varias regiones con puntajes superiores al "valor de corte" (calculado por una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor ktup), entonces se examinan las regiones iniciales recortadas para determinar si las regiones pueden unirse para formar una alineación aproximada con espacios. Finalmente, las regiones de puntaje más alto de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444 (1970); Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26:787 (1974)), que permite inserciones y delecciones de aminoácidos. Los parámetros preferidos para los analistas de FASTA son: ktup=i, penalidad de abertura de espacio =10, penalidad de extensión de espacio =1, y matriz de sustitución=BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA, modificando el fichero de la matriz de puntaje ("SMATRIX"), como se explica en el Anexo 2 de Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63 (1990).

FASTA se puede emplear también para determinar la identidad de secuencia de las moléculas de ácido nucleico, usando una relación, como se describió precedentemente. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor ktup puede oscilar entre uno y seis, preferiblemente entre tres y seis, lo más preferiblemente tres, con otros parámetros establecidos por defecto.

ES 2 310 660 T3

Los polipéptidos zcytor17lig variantes o polipéptidos con identidad de secuencia sustancialmente similar se caracterizan por tener una o más sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferiblemente de naturaleza menor, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras (como se expone en la Tabla 5 a continuación) y otras sustituciones que no afectan en forma significativa el pliegue o la actividad del polipéptido; delecciones 5 pequeñas, típicamente entre uno y aproximadamente 30 aminoácidos; y extensiones amino o carboxiterminales, como un residuo metionina amino-terminal, un péptido enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o un marcador de afinidad. La presente invención incluye, por lo tanto, polipéptidos de aproximadamente 108 a 216 residuos aminoácido que comprenden una secuencia que es por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% o más de 99% idéntica 10 a la región correspondiente de la SEC ID NO: 2. Los polipéptidos que comprenden marcadores de afinidad pueden también comprender un sitio de escisión proteolítica entre el polipéptido zcytor17lig y el marcador de afinidad. Dichos sitios preferidos incluyen sitios de escisión de trombina y sitios de escisión de factor Xa.

15

TABLA 5

Sustituciones de aminoácidos conservadoras

20	Básica:	arginina lisina histidina
25	Ácida:	ácido glutámico ácido aspártico
30	Polar:	glutamina asparagina
35	Hidrófoba:	leucina isoleucina valina
40	Aromática:	fenilalanina triptófano tirosina
45	Pequeña:	glicina alanina serina treonina
50		metionina

La determinación de residuos aminoácido que comprenden regiones o dominios críticos para mantener la integridad estructural se puede determinar. Dentro de estas regiones, uno puede determinar residuos específicos que serán más o menos tolerantes al cambio y mantendrán la estructura terciaria general de la molécula. Los métodos para analizar la estructura de la secuencia incluyen, aunque sin limitarse a ellos, alineación de secuencias múltiples con alta identidad de nucleótidos o aminoácidos, propensiones de estructuras secundarias, patrones binarios, aglomeración complementaria e 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 a moléculas o se identifican fragmentos específicos, la determinación de la estructura estará acompañada de actividad evaluadora de las moléculas modificadas.

Los cambios en las secuencias de aminoácidos se realizan en los polipéptidos zcytor17lig como para minimizar la ruptura de la estructura de orden superior esencial para la actividad biológica. Por ejemplo, si el polipéptido zcytor17lig 65 comprende una o más hélices, los cambios en los residuos aminoácido se realizarán como para no romper la geometría de la hélice y otros componentes de la molécula, si los cambios de conformación impiden alguna función crítica, por ejemplo, la unión de la molécula a sus parejas de unión, p. ej., las hélices A y D, los residuos 43 (Glu), 44 (Glu) y 136

ES 2 310 660 T3

(Phe) de la SEC ID NO: 2. Los efectos de los cambios en las secuencias de aminoácidos se pueden pronosticar, por ejemplo, con un modelo de ordenador como se describió antes, o se pueden determinar por análisis de la estructura cristalina (véase, p. ej., Laphorn *et al.*, *Nat. Struct- Biol.* 2:266-268, 1995). Otras técnicas conocidas en el campo comparan los pliegues de una proteína variante con una molécula estándar (p. ej., la proteína natural). Por ejemplo, se 5 puede realizar la comparación del patrón de cisteína en moléculas estándar y variantes. La espectrometría de masas y la modificación química, usando reducción y alquilación, proporcionan métodos para determinar residuos cisteína que están asociados a enlaces disulfuro o exentos 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). En general, se cree que si una molécula modificada no tiene el mismo patrón cisteína que la molécula estándar, el pliegue se vería 10 afectado. Otro método muy conocido y aceptado para medir el pliegue es el dicroismo circular (CD). La medición y comparación de los espectros CD generados por una molécula modificada y una molécula estándar son una práctica de rutina (Johnson, *Proteins* 7:205-214, 1990). La cristalografía es otro método conocido para analizar el plegado y la estructura. La resonancia magnética nuclear (RMN), el mapeo peptídico digestivo y el mapeo de epítopos son también 15 métodos conocidos para analizar el plegado y las similitudes estructurales entre proteínas y polipéptidos (Schaanan *et al.*, *Science* 257:961-964, 1992).

Se puede generar un perfil de hidrofilicidad Hopp/Woods de la secuencia de proteínas zcytor17lig, como se muestra en la SEC ID NO: 2 (Hopp *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:3824-3828. 1981; Hopp, *J. Immun. Meth.* 88:1-18, 1986 y Triquier *et al.*, *Protein Engineering* 11:153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana de seis residuos desplazable. 20 Los residuos enterrados G, S y T, y los residuos expuestos H, Y y W se ignoraron. Por ejemplo, en el zcytor17lig humano, las regiones hidrófilas incluyen los residuos aminoácido 54-59 de la SEC ID NO: 2, los residuos aminoácido 129-134 de la SEC ID NO: 2, los residuos aminoácido 53-58 de la SEC ID NO: 2, los residuos aminoácido 35-40 de la SEC ID NO: 2 y los residuos aminoácido 33-38 de la SEC ID NO: 2. Por ejemplo, en zcytor17lig de ratón, las 25 regiones hidrófilas incluyen los residuos aminoácido 34-39 de la SEC ID NO: 11, los residuos aminoácido 46-51 de la SEC ID NO: 11, los residuos aminoácido 131-136 de la SEC ID NO: 11, los residuos aminoácido 158-163 de la SEC ID NO: 11 y los residuos aminoácido 157-162 de la SEC ID NO: 11.

Los expertos en la técnica reconocerán que la hidrofilicidad o hidrofobicidad se tomará en cuenta al diseñar modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido zcytor17lig, como para no perturbar el perfil estructural 30 y biológico general. Son de particular interés para el reemplazo, los residuos hidrófobos seleccionados del grupo que consiste en Val, Leu y Ile, o del grupo que consiste en Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp. Por ejemplo, los residuos que toleran la sustitución podrían incluir Val, Leu y He, o el grupo que consiste en los residuos Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp, como se muestra en la SEC ID NO: 2. Los residuos cisteína conservados en posiciones dentro de la SEC ID NO: 2 y la SEC ID NO: 11 serán relativamente intolerantes a la sustitución. 35

Las identidades de los aminoácidos esenciales también se pueden inferir a partir del análisis de similitud de secuencia entre IL-3, Lif, IL12, IL-15, IL-2, IL-4 y GM-CSF con zcytor17lig. Usando métodos tales como el análisis “FASTA” previamente descrito, se identifican regiones de gran similitud dentro de una familia de proteínas, y se usan para analizar la secuencia de aminoácidos para regiones conservadas. Un planteamiento alternativo para identificar un 40 polinucleótido zcytor17lig variante en base a la estructura consiste en determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un gen zcytor17lig variante potencial puede hibridarse a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1, como se analizó anteriormente.

Otros métodos para identificar aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención son procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido de alanina 45 (Cunningham y Wells, *Science* 244:1081 (1989), Bass *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88:4498 (1991), Coombs y Corey, “Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering”, en *Proteins: Analysis and Design*, Angeletti (ed.), páginas 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)). En esta última técnica, se introducen mutaciones sencillas de alanina en cada residuo de la molécula, y se ensaya la actividad biológica o bioquímica de las moléculas mutantes resultantes, como 50 se describió antes para identificar residuos aminoácido críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:4699 (1996).

La presente invención incluye también fragmentos funcionales de los polipéptidos zcytor17lig y las moléculas 55 de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales. Un zcytor17lig “funcional” o su fragmento, según lo definido en esta memoria, se caracteriza por su actividad proliferativa o de diferenciación, por su capacidad de inducir o inhibir funciones celulares especializadas o por su capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-zcytor17lig o anticuerpo del receptor zcytor17 o zcytor17, WSX-1, o el receptor OSMRbeta o heterodímeros (p. ej., zcytor17/WSX-1 o zcytor17/OSMRbeta) o multímeros (p. ej., zcytor17/WSX-1/OSMRbeta) de estos receptores (o bien solubles o inmovilizados). Como se describió previamente en este documento, el zcytor17lig se caracteriza 60 por una estructura de cuatro hélice que comprende la hélice A (residuos aminoácido 38-52), la hélice B (residuos aminoácido 83-98), la hélice C (residuos aminoácido 104-117) y la hélice D (residuos aminoácido 137-152), como se muestra en la SEC ID NO: 2. Por lo tanto, la presente invención proporciona además proteínas de fusión que abarcan: (a) moléculas de polipéptidos que comprenden una o más de las hélices ya descritas; y (b) fragmentos funcionales que comprenden una o más de estas hélices. La otra porción del polipéptido de la proteína de fusión puede ser aportada 65 por otra citocina de cuatro hélices, como por ejemplo IL-15, IL-2, IL-4 y GM-CSF, o por un péptido sintético y/o de señal secretora no relacionado que facilite la secreción de la proteína de fusión.

Por consiguiente, la presente invención provee proteínas de fusión que comprenden por lo menos cuatro polipéptidos, en donde el orden de los polipéptidos del término N al término C es: un primer polipéptido comprende aminoácidos seleccionados de un grupo que consiste en: (a) los residuos aminoácido 27-48 de hélice A de IL-2 de SEC ID NO: 162; (b) los residuos aminoácido 35-45 de hélice A de IL-3 de SEC ID NO: 102; (c) los residuos aminoácido 30-42 de hélice A de IL-4 de SEC ID NO: 164; (d) los residuos aminoácido 30-44 de hélice A de GM-CSF de SEC ID NO: 166; y (e) los residuos aminoácido 38 a 52 de la SEC ID NO: 2; un primer espaciador de 6-27 aminoácidos; y un segundo polipéptido que comprende residuos aminoácido seleccionados del grupo que consiste en: (a) los residuos aminoácido de hélice B de IL-2 de la SEC ID NO: 168; (b) los residuos aminoácido 65-83 de hélice B de IL-4 de la SEC ID NO: 164; (c) los residuos aminoácido 73-86 de hélice B de IL-3 de la SEC ID NO: 102; (d) los residuos aminoácido 72-81 de hélice B de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y (e) los residuos aminoácido 83-98 de la SEC ID NO: 2; un espaciador de 5-11 residuos aminoácido; un tercer polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: (a) residuos 102-116 de hélice C de IL-2 de la SEC ID NO: 162; (b) residuos 94-118 de hélice C de IL-4 de la SEC ID NO: 164; (c) residuos 91-103 de hélice C de IL-3 de la SEC ID NO: 102; (d) residuos 85-103 de hélice C de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y (e) residuos aminoácido 104-117 de la SEC ID NO: 2; un tercer espaciador de 3-29 residuos aminoácido; y un cuarto polipéptido que comprende residuos aminoácido seleccionados del grupo que consiste en: (a) residuos aminoácido 134-149 de hélice D de IL-2 de la SEC ID NO: 162; (b) residuos aminoácido 123-141 de hélice D de IL-3 de la SEC ID NO: 102; (c) residuos aminoácido 133-151 de hélice D de IL-4 de la SEC ID NO: 164; (d) residuos aminoácido 120-131 de hélice D de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y (e) residuos aminoácido 137-152 de la SEC ID NO: 2, en donde por lo menos uno de los cuatro polipéptidos está entre zcytor17lig. En otras realizaciones en las que se seleccionarán los péptidos espaciadores entre los bucles A/B, B/C y C/D de zcytor17lig, y IL-3, como se muestra en la Tabla 1.

Se pueden efectuar análisis de delección de rutina de moléculas de ácido nucleico para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido zcytor17lig. Como ilustración, las moléculas de DNA que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o sus fragmentos, se pueden digerir con *Bal31* nuclease para obtener una serie de delecciones anidadas. Estos fragmentos de DNA se insertan luego en vectores de expresión en el marco de lectura apropiado, y los polipéptidos expresados se aíslan y ensayan para actividad del zcytor17lig, o para la capacidad de unirse a anticuerpos de anti-zcytor17lig o al receptor zcytor17. Una alternativa a la digestión de exonucleasa consiste en usar mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para introducir las delecciones o codones de terminación para especificar la producción de un fragmento de zcytor17lig deseado. Alternativamente, se pueden sintetizar fragmentos particulares de un gen zcytor17lig, usando la reacción en cadena de la polimerasa.

Los métodos convencionales para identificar dominios funcionales se conocen en la técnica. Por ejemplo, los estudios sobre la truncación en alguno o ambos términos de los interferones han sido resumidos por Horisberger y Di Marco, *Pharmac. Ther.* 66:507 (1995). Asimismo, las técnicas convencionales para análisis funcionales de proteínas son descritas, por ejemplo, por 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 (ed.), páginas 65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, "The EGF Receptor", en *Control of Animal Cell Proliferation 1*, Boynton *et al.*, (eds.) páginas 169-199 (Academic Press 1985); Cournallieau *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:29270 (1995); Fukunaga *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:25291 (1995); Yamaguchi *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 50:1295 (1995); y Meisel *et al.*, *Plant Molec. Biol.* 30:1 (1996).

Se pueden realizar y ensayar sustituciones de aminoácidos múltiples, usando métodos conocidos de mutagénesis y selección, como aquellos descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241:53 (1988)) o por Bowie y Sauer (*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:2152 (1989)). En resumen, estos autores describen métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar un polipéptido funcional y luego secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros métodos que se pueden emplear incluyen visualización de fagos (p. ej., Lowman *et al.*, *Biochem.* 30:10832 (1991), Ladner *et al.*, patente estadounidense No. 5.223.409, Huse, publicación internacional No. WO 92/06204), y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire *et al.*, *Gene* 46:145 (1986), y Ner *et al.*, *DNA* 7:127. (1988)).

Las variantes de las secuencias de nucleótidos y polipéptidos zcytor17lig descritos también se pueden generar entremezclando DNA, como lo describen Stemmer, *Nature* 370:389 (1994), Stemmer, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91:10747 (1994), y la publicación internacional No. WO 97/20078. En síntesis, las moléculas de DNA variantes se generan por recombinación homóloga *in vitro*, por fragmentación aleatoria de un DNA progenitor, seguida de reensamblaje usando PCR, lo que proporciona mutaciones de punto introducidas aleatoriamente. Esta técnica se puede modificar usando una familia de moléculas de DNA progenitor, como variantes alélicas o moléculas de DNA de distintas especies, para introducir variabilidad adicional al proceso. La selección o detección de la actividad deseada, seguida de iteraciones adicionales de mutagénesis y ensayos, proporciona una rápida "evolución" de las secuencias, seleccionando las mutaciones deseables, a la vez que se seleccionan simultáneamente contra cambios perjudiciales.

Los métodos de mutagénesis descritos en este documento se pueden combinar con métodos de selección automáticos de alto rendimiento, a fin de detectar la actividad de los polipéptidos clonados, mutagenizados en las células hospedantes. Las moléculas de DNA mutagenizadas que codifican polipéptidos biológicamente activos, o polipéptidos que se unen con anticuerpos anti-zcytor17lig o el receptor de zcytor17 soluble, o WSX-1 soluble o OSMR soluble o heterodímeros o multímeros de estos receptores solubles, como se describe en el presente documento, se pueden recuperar de las células hospedantes y secuenciarse rápidamente, usando equipos modernos. Estos métodos permiten

la determinación rápida de la importancia de residuos aminoácido individuales en un polipéptido de interés, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

Además, las proteínas de la presente invención (o sus fragmentos de polipéptidos) se pueden unir a otras moléculas bioactivas, particularmente otras citocinas, para proporcionar moléculas multifuncionales. Por ejemplo, una o más hélices de zcytor17lig pueden unirse a otras citocinas para potenciar sus propiedades biológicas o la eficacia de producción.

La presente invención provee, por lo tanto, una serie de nuevas moléculas híbridas, en las que un segmento que comprende una o más hélices de zcytor17lig se condensa a otro polipéptido. La fusión se realiza preferiblemente empalmando al nivel del DNA para permitir la expresión de moléculas químéricas en sistemas de producción recombinantes. Las moléculas resultantes se ensayan luego para estudiar propiedades tales como mejor solubilidad, mejor estabilidad, semivida de aclaramiento prolongada, mejores niveles de expresión y secreción, y farmacodinámica. Dichas moléculas híbridas pueden además comprender residuos aminoácido adicionales (p. ej., un enlazador de polipéptidos) entre las proteínas o polipéptidos componentes.

Los aminoácidos no naturales incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxiprolina, *trans*-4-hidroxiprolina, *N*-metilglicina, alo-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipecólico, ácido tiazolidinacarboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *terc*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen en la técnica diversos métodos para incorporar residuos aminoácido no naturales a las proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema *in vitro* en el que se suprime las mutaciones no sentido, usando tRNA supresores químicamente aminoacilados. Los métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar tRNA se conocen en la técnica. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones no sentido típicamente se llevan a cabo en un sistema exento de células, que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas obtenibles en el mercado, y otros reactivos. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722 (1991), Ellman *et al.*, *Methods Enzymol.* 202:301 (1991), Chung *et al.*, *Science* 259:806 (1993), y Chung *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:10145 (1993).

En un segundo método, la traducción se lleva a cabo en *Xenopus* oocytes por microinyección de mRNA mutado y tRNA supresores químicamente aminoacilados (Turcatti *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:19991 (1996)). Dentro de un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que se ha de reemplazar (p. ej., fenilalanina) y en presencia del aminoácido(s) no natural deseado (p. ej., 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido no natural se incorpora a la proteína, en lugar de su contrapartida natural. Véase, por ejemplo, Koide *et al.*, *Biochem.* 33:7470 (1994). Los residuos aminoácido naturales pueden convertirse en especies no naturales por modificación química *in vitro*. La modificación química se puede combinar con mutagénesis dirigida al sitio para expandir más el intervalo de sustituciones (Wynn y Richards, *Protein Sci.* 2:395 (1993)). Puede ser ventajoso estabilizar el zcytor17lig para extender la semivida de la molécula, particularmente para extender la persistencia metabólica en un estado activo. Para lograr la extensión de la semivida, las moléculas de zcytor17lig pueden modificarse químicamente, usando los métodos aquí descritos. La PEGilación es un método comúnmente utilizado que ha demostrado aumentar la semivida en plasma y la solubilidad, y disminuir la antigenicidad y la inmunogenicidad (Nucci *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 6:133-155, 1991 y Lu *et al.*, *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:127-138, 1994).

Los residuos aminoácido zcytor17lig pueden sustituirse por un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no están codificados por el código genético, aminoácidos no naturales y aminoácidos sintéticos.

La presente invención proporciona también fragmentos de polipéptidos o péptidos que comprenden una porción que porta un epítopo de un polipéptido zcytor17lig descrito en este documento. Dichos fragmentos o péptidos pueden comprender un “epítopo inmunogénico”, que es parte de una proteína que desencadena la respuesta de un anticuerpo cuando toda la proteína se usa como inmunógeno. Los péptidos que portan un epítopo inmunogénico se pueden identificar usando métodos convencionales (véase, por ejemplo, Geysen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81:3998 (1983)).

En contraste, los fragmentos de polipéptidos o los péptidos pueden comprender un “epítopo antigenético”, que es una región de una molécula de proteína a la cual puede unirse específicamente un anticuerpo. Determinados epítopos consisten en una extensión lineal o contigua de aminoácidos, y la antigenicidad de dicho epítopo no es perturbada por agentes desnaturalizantes. Se conoce en la técnica que los péptidos sintéticos cortos que pueden imitar epítopos de una proteína pueden usarse para estimular la producción de anticuerpos contra la proteína (véase, por ejemplo, Sutcliffe *et al.*, *Science* 219:660 (1983)). Por consiguiente, los polipéptidos y péptidos que portan epítopos de la presente invención son útiles para promover anticuerpos (p. ej., anticuerpos neutralizadores) que se unen con los polipéptidos descritos en la presente memoria. Los perfiles de hidrofilicidad de Hopp/Woods se pueden usar para determinar regiones que tengan el potencial más antigenético (Hopp *et al.*, 1981, *ibid*, y Hopp, 1986, *ibid*.). Por ejemplo, en el zcytor17lig humano, las regiones hidrófilas incluyen los residuos aminoácido 54-59 de la SEC ID NO: 2, los residuos aminoácido 129-134 de la SEC ID NO: 2, los residuos aminoácido 53-58 de la SEC ID NO: 2, los residuos aminoácido 35-40 de la SEC ID NO: 2 y los residuos aminoácido 33-38 de la SEC ID NO: 2. Por ejemplo, en zcytor17lig de ratón, las regiones hidrófilas incluyen los residuos aminoácido 34-39 de la SEC ID NO: 11, los residuos aminoácido 46-51 de la SEC ID NO: 11, los residuos aminoácido 131-136 de la SEC ID NO: 11, los residuos aminoácido 158-163 de la SEC ID NO: 11 y los residuos aminoácido 157-162 de la SEC ID NO: 11.

ES 2 310 660 T3

Los polipéptidos y péptidos que portan epítopos antigenicos preferiblemente contienen por lo menos cuatro a diez aminoácidos, por lo menos diez a catorce aminoácidos o aproximadamente catorce a aproximadamente treinta aminoácidos de la SEC ID NO: 2 o de la SEC ID NO: 11. Dicgis polipéptidos y péptidos que portan epítopos pueden producirse fragmentando un polipéptido zcytor17lig o por síntesis peptídica química, como se describe en este documento. A su vez, los epítopos pueden seleccionarse por visualización de fagos de colecciones de péptidos aleatorias (véanse, por ejemplo, Lane y Stephen, *Curr. Opin. Immunol.* 5:268 (1993); y Cortese *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:616 (1996)). Los métodos convencionales para identificar epítopos y producir anticuerpos a partir de péptidos pequeños que comprenden un epítopo son descritos, por ejemplo, por Mole, "Epitope Mapping", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, Manson (ed.), páginas 105-116 (The Humana Press, Inc. 1992); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application*. Ritter y Ladyman (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995), y Coligan *et al.* (eds.), *Current Protocols in Immunology*, páginas 9.3.1-9.3.5 y páginas 9.4.1-9.4.11 (John Wiley & Sons 1997).

Independientemente de la secuencia de nucleótidos particular de un polinucleótido zcytor17lig variante, el polinucleótido codifica un polipéptido que se caracteriza por su actividad proliferativa o diferenciadora, su capacidad de inducir o inhibir las funciones celulares, o por la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-zcytor17lig o receptor de zcytor17. Más específicamente, los polinucleótidos zcytor17lig variantes codificarán polipéptidos que exhiben por lo menos 50% y preferiblemente por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% o más de 99%, de la actividad del polipéptido, como se muestra en la SEC ID NO: 2.

Para cualquier polipéptido zcytor17lig, incluyendo variantes y proteínas de fusión, la persona con experiencia ordinaria en la técnica puede generar fácilmente una secuencia de polinucleótidos totalmente degenerada que codifique esa variante, usando la información expuesta en las Tablas 1 y 2 exhibidas anteriormente.

La presente invención provee además una diversidad de otras fusiones de polipéptidos (y proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones de polipéptidos). Por ejemplo, se puede preparar un polipéptido zcytor17lig como una fusión a una proteína dimerizante, como se describe en las patentes estadounidenses No. 5.155.027 y 5.567.584. Las proteínas dimerizantes preferidas en este sentido incluyen dominios de regiones constantes de inmunoglobulina. Las fusiones de inmunoglobulina-polipéptido zcytor17lig se pueden expresar en células genéticamente manipuladas (para producir una diversidad de análogos de zcytor17lig multiméricos). Los dominios auxiliares se pueden condensar a polipéptidos zcytor17lig para dirigirlos hacia células, tejidos o macromoléculas específicos. Por ejemplo, una proteína o un polipéptido zcytor17lig podría dirigirse hacia un tipo de célula predeterminado, condensando un polipéptido zcytor17lig a un ligando que se une específicamente a un receptor en la superficie de esa célula diana. De este modo, los polipéptidos y proteínas se pueden dirigir para propósitos terapéuticos o diagnósticos. Un polipéptido zcytor17lig se puede condensar a dos o más restos, como un marcador de afinidad para purificación y un dominio diana. Las fusiones de polipéptidos también pueden comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase, Tuan *et al.*, *Connective Tissue Research* 34:1-9, 1996.

Usando los métodos analizados en esta memoria, la persona con experiencia ordinaria en la técnica puede identificar y/o preparar una diversidad de polipéptidos que tienen identidad de secuencia sustancialmente similar a los residuos 1-164 ó 24-164 de la SEC ID NO: 2, o fragmentos funcionales y sus fusiones, como las hélices A-D (residuos 38-152 de la SEC ID NO: 2), en donde dichos polipéptidos o fragmentos o fusiones retienen las propiedades de la proteína de tipo salvaje, por ejemplo, la capacidad de estimular la proliferación, diferenciación, inducir la función celular o unirse al receptor zcytor17 o a los anticuerpos de zcytor17lig.

Los polipéptidos zcytor17lig de la presente invención, incluyendo polipéptidos de longitud total, fragmentos funcionales y polipéptidos de fusión, se pueden producir en células hospedantes genomanipuladas de acuerdo con técnicas convencionales. Las células hospedantes adecuadas son aquellos tipos de células que pueden transformarse o transfectarse con DNA exógeno y desarrollarse en cultivo, e incluyen bacterias, células fúngicas y células eucarióticas superiores cultivadas. Se prefieren las células eucarióticas, particularmente las células cultivadas de organismos multicelulares. Las técnicas para manipular moléculas de DNA clonadas e introducir DNA exógeno a una diversidad de células hospedantes se describen en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y en Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987.

En general, una secuencia de DNA que codifica un polipéptido zcytor17lig puede unirse operativamente a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, incluyendo generalmente un promotor y terminador de transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá normalmente uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque las personas experimentadas en la técnica reconocerán que dentro de ciertos sistemas, los marcadores seleccionables pueden ser provistos en vectores separados, y la replicación del DNA exógeno puede ser provista por la integración en el genoma celular hospedante. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es una cuestión de diseño de rutina dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica. Muchos de dichos elementos se describen en la bibliografía y se obtienen en el mercado.

Para dirigir un polipéptido zcytor17lig hacia la vía secretora de una célula hospedante, se provee una secuencia de señal secretora (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector de expresión.

La secuencia de la señal secretora puede ser aquella de zcytor17lig, o puede derivar de otra proteína secretada (p. ej., t-PA) o sintetizarse *de novo*. La secuencia de la señal secretora está operativamente unida a la secuencia del DNA de zcytor17lig, es decir, las dos secuencias se unen en el marco de lectura correcto y se posicionan para dirigir el polipéptido recién sintetizado hacia la vía secretora de la célula hospedante. Las secuencias de las señales secretoras 5 comúnmente se posicionan en 5' hacia la secuencia de DNA que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias de señales secretoras pueden posicionarse en otros sitios de la secuencia del DNA de interés (véanse, p. ej., Welch *et al.*, patente estadounidense 5.037.743; Holland *et al.*, patente estadounidense No. 5.143.830).

10 Alternativamente, la secuencia de la señal secretora contenida en los polipéptidos de la presente invención se usa para dirigir otros polipéptidos hacia la vía secretora. La presente invención provee dichos polipéptidos de fusión. Se puede elaborar un polipéptido de fusión de señal, en el que una secuencia de señal secretora derivada de los residuos aminoácido 1-23 de la SEC ID NO: 2 o de los residuos 1-23 de la SEC ID NO: 11 está operativamente unida a una secuencia del DNA que codifica otro polipéptido, usando los métodos conocidos en la técnica y descritos en la 15 presente memoria. La secuencia de la señal secretora contenida en los polipéptidos de fusión de la presente invención está preferiblemente condensada en forma aminoterminal a un péptido adicional para dirigir el péptido adicional hacia la vía secretora. Dichos constructos tienen numerosas aplicaciones conocidas en la técnica. Por ejemplo, estos nuevos constructos de fusión de secuencias de señales secretoras pueden dirigir la secreción de un componente activo de una proteína normalmente no segregada. Dichas fusiones se pueden utilizar *in vivo* o *in vitro* para dirigir péptidos a través 20 de la vía secretora.

20 Las células mamíferas cultivadas son hospedantes adecuados dentro de la presente invención. Los métodos para introducir DNA exógeno a células hospedantes de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato de calcio (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.* 1:841-5, 1982), transfección mediada por dextrano-DEAE 25 (Ausubel *et al.*, *ibid.*) y transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson *et al.*, *Focus* 15:73, 1993; Ciccarone *et al.*, *Focus* 15:80, 1993, y vectores víricos (Miller y Rosman, *BioTechniques* 7:980-90, 1989; Wang y Finer, *Nature Med.* 2:714-6, 1996). La producción de polipéptidos recombinantes en células mamíferas es descrita, por ejemplo, por Levinson *et al.*, patente estadounidense No. 4.713.339; Hagen *et al.*, patente estadounidense No. 4.784.950; Palmiter *et al.*, patente estadounidense No. 4.579.821; y Ringold, patente estadounidense No. 4.656.134. Las células mamíferas 30 cultivadas adecuadas incluyen las líneas celulares COS-1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC No. CRL 1651), BHK (ATCC No. CRL 1632), BHK 570 (ATCC No. CRL 10314), 293 (ATCC No. CRL 1573; Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977) y las líneas celulares de ovario de hámster chino (p. ej., CHO-K1; ATCC No. CCL 61). Las líneas celulares adecuadas adicionales se conocen en la técnica y se obtienen de bancos públicos, como The American 35 Type Culture Collection, Manassas, VA. En general, se prefieren los promotores de transcripción fuertes, como los promotores de SV-40 o citomegalovirus. Véase, p. ej., la patente estadounidense No. 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen aquellos de genes de metalotioneína (patentes estadounidenses No. 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor principal tardío de adenovirus.

40 En general se utiliza la selección de fármacos para seleccionar células mamíferas cultivadas en las que se ha insertado DNA exógeno. Dichas células normalmente se denominan "transfectantes". Las células que han sido cultivadas en presencia del agente selectivo y son capaces de pasar el gen de interés a su descendencia se denominan "transfectantes estables". Un marcador seleccionable preferido es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección se realiza en presencia de un fármaco de tipo neomicina, por ejemplo G-418 o similar. Los sistemas de selección también se pueden utilizar para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un procedimiento denominado "ampliación". La ampliación se lleva a cabo cultivando transfectantes en presencia de un nivel bajo de agente 45 selectivo y luego aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar células que produzcan altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable ampliable preferido es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato. También se pueden emplear otros genes de resistencia a fármacos (p. ej., resistencia a higromicina, resistencia a múltiples fármacos, puromicinacetyl transferasa). Se pueden utilizar marcadores 50 alternativos que introducen un fenotipo alterado, como proteína fluorescente verde, o proteínas de la superficie celular, como CD4, CD8, MHC de Clase I, para clasificar células transfectadas entre células no transfectadas, mediante clasificación FACS o tecnología de separación de esferas magnéticas.

55 También pueden utilizarse otras células eucarióticas superiores como hospedantes, incluyendo células vegetales, células de insectos y células aviares. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como 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 insectos y producción de polipéptidos exógenos allí se describe por Guarino *et al.*, patente estadounidense No. 5.162.222 y publicación WIPO No. WO 94/06463. Las células de insectos se pueden infectar con baculovirus recombinante, comúnmente derivado de *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV). Véanse, King, L.A. y Possee, R.D., *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Londres, Chapman & Hall; O'Reilly, D.R. *et al.*, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. New York, Oxford University Press., 1994; y, Richardson, C. D., Ed., *Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology*, Totowa, NJ, Humana Press, 1995. El segundo método para elaborar baculovirus recombinante emplea un sistema basado en transposón descrito por Luckow (Luckow, V.A., *et al.*, *J Virol* 67:4566-79, 1993). Este sistema se vende en el kit Bac-to-Bac (Life Technologies, 60 Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, pFastBacTM (Life Technologies) que contiene un transposón Tn7 para mover el DNA que codifica el polipéptido zcytor17lig hacia un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande llamado "bácmido". El vector de transferencia pFastBac1TM utiliza el promotor de polihedrina AcNPV para impulsar la expresión del gen de interés, en este caso zcytor17lig. No obstante, 65

pFastBacTM puede modificarse hasta un grado considerable. El promotor de polihedrina puede eliminarse y sustituirse con el promotor de la proteína básica de baculovirus (se conoce también como Pcor, p6.9 o promotor MP), que se expresa antes en la infección por baculovirus, y se ha demostrado que es ventajoso para expresar proteínas segregadas. Véanse, Hill-Perkins, M.S. y Possee, R.D., *J. Gen. Virol.* 71:971-6, 1990; Bonning, B.C. et al., *J. Gen. Virol.* 75:1551-6, 1994; y, Chazenbalk, G.D., y Rapoport, B., *J. Biol. Chem.* 270:1543-9, 1995. En dichos constructos de vectores de transferencia, se puede usar una versión corta o larga del promotor de la proteína básica. Además, pueden construirse vectores de transferencia que reemplacen las secuencias de la señal secretora de zcytor17lig natural con secuencias de señales secretoras derivadas de proteínas de insectos. Por ejemplo, se puede usar una secuencia de señal secretora de Ecdisteroide Glucosiltransferasa (EGT), miel de abeja Melittin (Invitrogen, Carlsbad, CA) o baculovirus gp67 (PharMingen, San Diego, GA) en constructos para reemplazar la secuencia de la señal secretora de zcytor17lig natural. Asimismo, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión dentro del marco con DNA que codifica un marcador de epítopo en el término C o N del polipéptido zcytor17lig expresado, por ejemplo, un marcador de epítopo Glu-Glu (Grussenmeyer, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:7952-4, 1985). Usando las técnicas conocidas en el campo, un vector de transferencia que contiene zcytor17lig se transforma en *E. Coli*, y se seleccionan los bácmidos que contienen un gen lacZ interrumpido indicativo de baculovirus recombinante. El DNA bacmídico que contiene el genoma del baculovirus recombinante se aísla, usando técnicas comunes, y se usa para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, p. ej., células Sf9. El virus recombinante que expresa zcytor17lig se produce posteriormente. Los stocks víricos recombinantes se elaboran por métodos comúnmente utilizados en la técnica.

El virus recombinante se utiliza para infectar células hospedantes, típicamente una línea celular derivada de la oruga militar tardía, *Spodoptera frugiperda*. Véase, en general, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. ASM Press, Washington, D.C., 1994. Otra línea celular adecuada es la línea celular High FiveOTM (Invitrogen) derivada de *Trichoplusia ni* (patente estadounidense No. 5.300.435).

Las células fúngicas, incluyendo las células de levadura, también se pueden utilizar dentro de la presente invención. Las especies de levadura de particular interés en este sentido incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Los métodos para transformar células de *S. cerevisiae* con DNA exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de allí son descritos, por ejemplo, por Kawasaki, patente estadounidense No. 4.599.311; Kawasaki et al., patente estadounidense No. 4.931.373; Brake, patente estadounidense No. 4.870.008; Welch et al., patente estadounidense No. 5.037.743; y Murray et al., patente estadounidense No. 4.845.075. Las células transformadas son seleccionadas por el fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente resistencia al fármaco o capacidad de desarrollarse en ausencia de un nutriente particular (p. ej., leucina). Un sistema vector preferido para uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema vector POTI descrito por Kawasaki et al. (patente estadounidense No. 4.931.373), que posibilita que las células transformadas se seleccionen por desarrollo en medio que contiene glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para uso en levadura incluyen aquellos de genes de enzimas glucolíticas (véanse, p. ej., Kawasaki, patente estadounidense No. 4.599.311; Kingsman et al., patente estadounidense No. 4.615.974; y Bitter, patente estadounidense No. 4.977.092), y genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse también las patentes estadounidenses No. 4.990.446; 5.063.154; 5.139.936 y 4.661.454. Los sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guillermorandi* y *Candida maltosa*, se conocen en la técnica, véanse, por ejemplo, Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* 132:3459-65, 1986 y Cregg, patente estadounidense No. 4.882.279. Se pueden utilizar células de *Aspergillus* de acuerdo con los métodos de McKnight et al., patente estadounidense No. 4.935.349. Los métodos para transformar *Acremonium chrysogenum* son descritos por Sumino et al., patente estadounidense No. 5.162.228. Los métodos para transformar *Neurospora* son descritos por Lambowitz, patente estadounidense No. 4.486.533.

El uso de *Pichia methanolica* como hospedante para la producción de proteínas recombinantes se describe en las publicaciones WEPO No. 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* normalmente se preparan como plásmidos circulares bicatenarios, que preferiblemente se linealizan antes de la transformación. Para la producción de polipéptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y el terminador en el plásmido sean aquellos de un gen de *P. methanolica*, como un gen de utilización de alcohol de *P. methanolica* (AUG1 o AUG2). Otros promotores útiles incluyen aquellos de los genes de dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD) y catalasa (CAT). Para facilitar la integración del DNA al cromosoma hospedante, se prefiere tener todo el segmento de expresión del plásmido flanqueado en ambos extremos por las secuencias de DNA hospedantes. Un marcador seleccionable preferido para uso en *Pichia methanolica* es un gen de *P. methanolica* ADE2, que codifica fosforribosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), el cual permite que las células hospedantes ade2 se desarrollen en ausencia de adenina. Para procedimientos industriales a gran escala, en los que se deseé minimizar el uso de metanol, se prefiere usar las células hospedantes en las que ambos genes de utilización de metanol (AUG1 y AUG2) estén eliminados. Para la producción de proteínas segregadas, se prefieren las células hospedantes deficientes de genes de proteasas vacuolares (PEP4 y PRB1). La electroporación se usa para facilitar la introducción de un plásmido que contiene DNA que codifica un polipéptido de interés a células de *P. methanolica*. Se prefiere transformar las células de *P. methanolica* por electroporación, usando un campo eléctrico pulsado exponencialmente decreciente, que tenga una intensidad de campo en el intervalo de 2,5 y 4,5 kV/cm, preferiblemente aproximadamente 3,75 kV/cm, y una constante de tiempo (Ω) de 1 a 40 milisegundos, lo más preferiblemente aproximadamente 20 milisegundos.

Las células hospedantes procarióticas, incluyendo las cepas de las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus* y otros géneros, son también células hospedantes útiles dentro de la presente invención. Las técnicas para transformar estos

hospedantes y expresar secuencias de DNA exógeno clonadas allí se conocen en la técnica (véase, p. ej., Sambrook *et al.*, *ibid.*). Cuando se expresa un polipéptido zcytor17lig en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede estar retenido en el citoplasma, típicamente como gránulos insolubles, y puede ser dirigido al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se lisan, y los gránulos se recuperan y 5 desnaturalizan usando, por ejemplo, isocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado se puede volver a plegar y dimerizar diluyendo el desnaturalizante, como por diálisis contra una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguida de diálisis contra una solución salina tamponada. En el segundo caso, el polipéptido se puede recuperar del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional, perturbando las células 10 (por ejemplo, por sonicación o choque osmótico) para liberar los contenidos del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando así la necesidad de desnaturalización y repliegue.

Las células hospedantes transformadas o transfectadas se cultivan de acuerdo con procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el desarrollo de las células hospedantes elegidas. Se conoce en la técnica una diversidad de medios adecuados, que incluyen medios definidos 15 y medios complejos y, en general, incluyen 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 sea necesario. El medio de desarrollo en general seleccionará células que contienen el DNA exógenamente añadido, por ejemplo, por selección de fármacos o deficiencia de un nutriente esencial que es complementado por el marcador seleccionable que porta el vector de expresión o contrransfectado a la célula hospedante. Las células de *P. 20 methanolica* se cultivan en un medio que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y oligonutrientes adecuados, a una temperatura de aproximadamente 25°C a 35°C. Los cultivos líquidos se proveen de aireación suficiente por medios convencionales, como agitación de pequeños matraces o salpicadura de fermentadores. Un medio de cultivo preferido para *P. methanolica* es YEPD (D-glucosa al 2%, Peptona Bacto™ al 2% (Difco Laboratories, Detroit, MI), extracto de levadura Bacto™ al 1% (Difco Laboratories), adenina al 0,004% y L-leucina al 0,006%).

25 Se prefiere purificar los polipéptidos de la presente invención hasta > 80% pureza, más preferiblemente hasta >90% pureza, incluso más preferiblemente >95% pureza y, se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro, superior a 99,9% puro con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y libre de agentes infecciosos y pirogénicos. Preferiblemente, un polipéptido purificado está sustancialmente 30 libre de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal.

Los polipéptidos zcytor17lig recombinantes expresados (o los polipéptidos zcytor17lig químéricos) pueden purificarse usando métodos y medios de fraccionamiento y/o purificación convencionales. Se puede usar precipitación con sulfato de amonio y extracción de ácido o caotropo para fraccionar las muestras. Las etapas de purificación ilustrativas 35 pueden incluir hidroxiapatita, exclusión de tamaño, FPLC y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa. Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextrans derivatizados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices especiales y similares. Se prefieren los derivados de PEI, DEAE, QAE y Q. Los medios cromatográficos ilustrativos incluyen aquellos medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, como Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), 40 butilo Toyopearl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) y similares; o resinas poliacrílicas, como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen esferas de vidrio, resinas a base de sílice, resinas celulosicas, esferas de agarosa, esferas de agarosa reticuladas, esferas de poliestireno, 45 resinas de poliacrilamida reticuladas y similares, que son insolubles bajo las condiciones en las que se utilizarán. Estos soportes pueden modificarse con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos carbohidrato. Los ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación de bromuro de cianógeno, activación de N-hidroxisuccinimida, activación de epóxido, activación de sulfhidrilo, activación de hidrazida y derivados de carboxilo y amino para químicas de acoplamiento de carbodiimida. Éstos y otros medios sólidos se conocen y utilizan ampliamente en la técnica, y están disponibles de proveedores comerciales. Los métodos para unir polipéptidos receptores a los medios de soporte se conocen en la técnica. La selección de 50 un método particular es una cuestión de diseño de rutina y se determina, en parte, por las propiedades del soporte escogido. Véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden aislar por explotación de sus propiedades físicas o bioquímicas. Por ejemplo, se puede usar cromatografía de adsorción de iones metálicos inmovilizados (MAC) para purificar 55 proteínas ricas en histidina, incluyendo aquellas que comprenden marcadores de polihistidina. En síntesis, 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 se adsorberán en esta matriz con afinidades diferentes, dependiendo del ión metálico utilizado, y se eluirán por elución competitiva, disminuyendo el pH, o el uso de fuertes agentes quelantes. Otros métodos de purificación incluyen purificación de proteínas glucosiladas por cromatografía de afinidad de lectina y 60 cromatografía de intercambio iónico (*Methods in Enzymol.*, Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp. 529-39) y uso del receptor de zcytor17 soluble. Dentro de las realizaciones adicionales de la invención, se puede construir una fusión del polipéptido de interés y un marcador de afinidad (p. ej., proteína de unión a maltosa, un dominio de inmunoglobulina) para facilitar la purificación.

65 Además, usando los métodos descritos en la técnica, se construyen las fusiones de polipéptidos o las proteínas de zcytor17lig híbrido, usando regiones o dominios del zcytor17lig inventivo en combinación con aquellos de otras proteínas de la familia de citocinas humanas (p. ej., interleucinas o GM-CSF), o proteínas heterólogas (Sambrook *et al.*, *ibid.*, Altschul *et al.*, *ibid.*, Picard, *Cur. Opin. Biology*, 5:511-5, 1994, y referencias allí citadas). Estos métodos per-

miten 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, unir, estrechar o expandir la especificidad de sustrato, o alterar la localización de células y tejido de un polipéptido, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

5 Las proteínas de fusión se pueden preparar por métodos conocidos por el experto en la técnica, preparando cada componente de la proteína de fusión, y conjugándolos químicamente. Alternativamente, se puede generar un polinucleótido que codifica ambos componentes de la proteína de fusión en el marco de lectura correcto, usando técnicas conocidas, y se puede expresar a través de los métodos de la presente memoria. Por ejemplo, puede intercambiarse todo o parte de una hélice que confiere una función biológica entre zcytor17lig de la presente invención con hélices 10 funcionales equivalentes de otro miembro de la familia, como IL-15, IL-2, IL-4 o GM-CSF. Dichos componentes incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la secuencia de la señal secretora; las hélices A, B, C, D; los bucles A/B, B/C, C/D; de las citocinas de cuatro hélices. Sería esperable que dichas proteínas de fusión tengan un perfil de la función biológica igual o similar a los polipéptidos de la presente invención u otras proteínas de la familia de citocinas de cuatro hélices conocida, dependiendo de la fusión construida. Asimismo, dichas proteínas de fusión pueden exhibir 15 otras propiedades, como se describe en la presente memoria.

Se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular y clonación para intercambiar los dominios equivalentes entre el polipéptido zcytor17lig y aquellos polipéptidos a los cuales se condensan. En general, un segmento de DNA que codifica un dominio de interés, p. ej., las hélices A a D de zcytor17lig, u otro dominio descrito 20 en esta memoria, está operativamente unido dentro del marco a por lo menos otro segmento de DNA que codifica un polipéptido adicional (por ejemplo, un dominio o región de otra citocina, como IL-2 o similar), e insertado en un vector de expresión adecuado, como se describe aquí. En general, los constructos de DNA se elaboran de modo tal que diversos segmentos de DNA que codifican las correspondientes regiones de un polipéptido están operativamente unidos dentro del marco para elaborar un solo constructo que codifique toda la proteína de fusión, o su parte funcional. 25 Por ejemplo, un constructo de DNA codificaría, desde el término N al término C, una proteína de fusión que comprende un polipéptido de señal seguido de una proteína de fusión de citocinas de cuatro hélices madura que contiene la hélice A, seguida de la hélice B, seguida de la hélice C, seguida de la hélice D. Se puede expresar, aislar y ensayar la actividad de dichas proteínas de fusión, como se describe en la presente memoria.

30 Los polipéptidos Zcytor17lig o sus fragmentos también se pueden preparar por síntesis química. Los polipéptidos zcytor17lig pueden ser monómeros o multímeros; glucosilados o no glucosilados; pegilados o no pegilados; y pueden o no incluir un residuo aminoácido de metionina inicial. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden preparar por síntesis peptídica de fase sólida, por ejemplo, como lo describe Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149, 1963.

35 La actividad de las moléculas de la presente invención se puede medir utilizando una diversidad de ensayos que miden la proliferación y/o la unión a las células que expresan el receptor de zcytor17. Son de particular interés los cambios en las células dependientes de zcytor17lig. Las líneas celulares adecuadas para ser genomanipuladas para depender de zcytor17lig incluyen la línea celular BaF3 dependiente de IL-3 (Palacios y Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 6: 4133-4135, 1986), FDC-P1 (Hapel *et al.*, *Blood* 64: 786-790, 1984) y 40 MO7e (Kiss *et al.*, *Leukemia* 7: 235-240, 1993). Las líneas celulares dependientes del factor de crecimiento se pueden establecer de acuerdo con métodos publicados (p. ej., Greenberger *et al.*, *Leukemia Res.* 8: 363-375, 1984; Dexter *et al.*, en Baum *et al.* Eds., *Experimental Hematology Today*, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980).

45 Las proteínas de la presente invención son útiles para estimular la proliferación, activación, diferenciación y/o inducción de la función celular especializada de células de la homeostasis implicada en la hematopoyesis y la función inmunitaria. En particular, los polipéptidos zcytor17lig son útiles para estimular la proliferación, activación, diferenciación, inducción o inhibición de funciones celulares especializadas de los linajes hematopoyéticos, incluyendo, aunque sin limitarse a ello, células T, células B, monocitos/macrófagos, linfocitos citolíticos naturales, neutrófilos, 50 células endoteliales, fibroblastos, eosinófilos, condrocitos, mastocitos, células de Langerhan, monocitos y macrófagos, como también células epiteliales. Las células epiteliales incluyen, por ejemplo, ameloblastos, células principales, cromatóforos, células enterocromafines, células de tipo enterocromafines, células caliciformes, células granulosas, queratinocitos, células dendríticas, células laberínticas de soporte, melanocitos, células de Merkel, células de Paneth, células parietales, células de Sertoli y similares. La proliferación y/o diferenciación de células hematopoyéticas se 55 puede medir *in vitro*, usando células cultivadas, o *in vivo*, y administrando las moléculas de la presente invención al modelo animal adecuado. Los ensayos que miden la proliferación o diferenciación celular se conocen en la técnica. Por ejemplo, los ensayos que miden la proliferación incluyen ensayos tales como quimiosensibilidad al tinte rojo neutro (Cavanaugh *et al.*, *Investigational New Drugs* 8:347-354, 1990, incorporada a la presente memoria por referencia), incorporación de nucleótidos radiomarcados (Cook *et al.*, *Analytical Biochem.*, 179:1-7, 1989, incorporada a la presente memoria por referencia), incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el DNA de células proliferantes (Porstmann *et al.*, *J. Immunol. Methods* 82:169-179, 1985, incorporada a la presente memoria por referencia), y uso de sales de tetrazolio (Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65:55-63, 1983; Alley *et al.*, *Cancer Res.* 48:589-601, 1988; Marshall *et al.*, *Growth Reg.* 5:69-84, 1995; y Scudiero *et al.*, *Cancer Res.* 48:4827-4833, 1988; todas incorporadas a la 60 presente memoria por referencia). Los ensayos que miden la proliferación incluyen, por ejemplo, medir los marcadores de la superficie celular asociados a la expresión específica de una etapa 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; todas incorporadas a la presente memoria por referencia).

ES 2 310 660 T3

Las moléculas de la presente invención se pueden ensayar *in vivo*, usando sistemas de administración vírica. Los virus ilustrativos para este propósito incluyen adenovirus, herpesvirus, retrovirus, vaccinia virus y virus adeno-associados (AAV). El adenovirus, un virus de DNA bicanario, es actualmente el vector de transferencia de genes mejor estudiado para administración de ácido nucleico heterólogo (para una revisión, véase 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).

Como ligando, la actividad del polipéptido zcytor17lig se puede medir con un microfisiómetro biosensor a base de silicio, que mide el índice de acidificación extracelular o la excreción de protones asociada a la unión del receptor y las 5 siguientes respuestas celulares fisiológicas. Un dispositivo ilustrativo es el microfisiómetro Cytosensor™ fabricado por Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Se puede medir, con este método, una diversidad de respuestas celulares, por ejemplo proliferación celular, transporte de iones, producción de energía, respuesta inflamatoria, activación reguladora y de receptores, y demás. Véase, por ejemplo, McConnell, H.M. *et al.*, *Science* 257:1906-1912, 1992; Pitchford, S. *et al.*, *Meth. Enzymol.* 228:84-108, 1997; Arimilli, S. *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 212:49-59, 1998; Van Liefde, I. *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 346:87-95, 1998.

10 Además, el zcytor17lig se puede utilizar para identificar células, tejidos o líneas celulares que responden a una vía estimulada por zcytor17lig. El microfisiómetro anteriormente descrito se puede utilizar para identificar rápidamente células sensibles a ligandos, como células sensibles al zcytor17lig de la presente invención. Las células se pueden cultivar en presencia o ausencia del polipéptido zcytor17lig. Aquellas células que provocan un cambio measurable en 15 la acidificación extracelular en presencia de zcytor17lig son sensibles a zcytor17lig. Dichas células o líneas celulares se pueden usar para identificar antagonistas y agonistas del polipéptido zcytor17lig, como se describió anteriormente.

20 En vista de la distribución de tejido observada para el receptor de zcytor17, los agonistas (incluyendo el zcytor17lig natural/sustrato/cofactor/etc.) y/o antagonistas tienen un potencial enorme en ambas aplicaciones, *in vitro* e *in vivo*. Los compuestos identificados como agonistas de zcytor17lig son útiles para expansión, proliferación, activación, diferenciación y/o inducción o inhibición de funciones celulares especializadas de las células implicadas en la homeostasis de hematopoyesis y la función inmunitaria. Por ejemplo, el zcytor17lig y los compuestos agonistas son útiles como componentes de medios de cultivos celulares definidos y se pueden utilizar solos o combinados con otras citocinas y 25 hormonas para reemplazar el suero comúnmente utilizado en el cultivo de células. Los agonistas son, por ende, útiles en promover específicamente el crecimiento y/o desarrollo de células T, células B, monocitos/macrófagos, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos citotóxicos y otras células de los linajes linfoides y mieloides en cultivo.

30 Los antagonistas son también útiles como reactivos de investigación para caracterizar sitios de interacción ligando-receptor. Los antagonistas son útiles para inhibir la expansión, proliferación, activación y/o diferenciación de células implicadas en la regulación de la hematopoyesis. Los inhibidores de la actividad de zcytor17lig (antagonistas de zcytor17lig) incluyen anticuerpos anti-zcytor17lig y receptores de zcytor17lig solubles, como también otros agentes peptídicos y no peptídicos (incluyendo ribozimas).

35 También se puede utilizar Zcytor17lig para identificar inhibidores (antagonistas) de su actividad. Los compuestos de prueba se añaden a los ensayos descritos en la presente memoria para identificar compuestos que inhiben la actividad de zcytor17lig. Además de los ensayos descritos en este documento, se puede ensayar la inhibición de la actividad del zcytor17lig de las muestras dentro de una diversidad de ensayos diseñados para medir la unión al receptor, la estimulación/inhibición de respuestas celulares dependientes de zcytor17lig o la proliferación de células que expresan 40 el receptor de zcytor17.

45 Se puede expresar un polipéptido zcytor17lig como una fusión con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, típicamente un fragmento Fc, que contiene dos dominios de regiones constantes y carece de región variable. Los métodos para preparar dichas fusiones se describen en las patentes estadounidenses No 5.155.027 y 5.567.584. Dichas fusiones se segregan típicamente como moléculas multiméricas en las que las porciones Fc son enlazadas unas con otras por disulfuro y dos polipéptidos no Ig se disponen próximos unos de otros. Las fusiones de este tipo se pueden usar, por ejemplo, para dimerización, aumento de estabilidad y semivida *in vivo*, para purificar el ligando por afinidad, como herramienta de ensayo *in vitro* o antagonista. Para uso en ensayos, las quimeras se unen a un soporte vía la región Fc y se usan en un formato ELISA.

50 55 Se puede usar también un polipéptido de unión a zcytor17lig para purificar el ligando. El polipéptido se inmoviliza en un soporte sólido, como esferas de agarosa, agarosa reticulada, vidrio, resinas celulósicas, resinas a base de sílice, poliestireno, poliacrilamida reticulada o materiales similares que son estables bajo las condiciones de uso. Los métodos para unir polipéptidos a un soporte sólido se conocen en la técnica e incluyen química de amina, activación de bromuro de cianógeno, activación de hidroxisuccinimid, activación de epóxido, activación de sulfhidrilo y activación de hidrazida. El medio resultante en general se configurará en la forma de una columna, y los fluidos que contienen el ligando se pasan a través de la columna una o más veces para permitir que el ligando se una al polipéptido receptor. El ligando se eluye entonces usando cambios en la concentración salina, agentes caotrópicos (guanidina HC1), o pH para alterar la unión ligando-receptor. Ventajosamente, se puede emplear un sistema de ensayo que use un receptor de unión al ligando (o un anticuerpo, un miembro de un par de complemento/anti-complemento) o su fragmento de unión, y un instrumento biosensor obtenible en el mercado (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Dicho receptor, anticuerpo, miembro de un par de complemento/anti-complemento o fragmento se inmoviliza hacia la superficie de un chip receptor. El uso de este instrumento es descrito por Karlsson, *J. Immunol. Methods* 145:229-40, 1991, y Cunningham y Wells, *J. Mol. Biol.* 234:554-63, 1993. Se fija covalentemente un receptor, anticuerpo, miembro o fragmento, 60 65

usando química de amina o sulfhidrilo, a fibras de dextrano que se fijan a una película de oro dentro del flujo celular. Se pasa una muestra de prueba por la célula. Si un ligando, epítopo o miembro opuesto del par de complemento/anti-complemento está presente en la muestra, se unirá al receptor, anticuerpo o miembro inmovilizado, respectivamente, causando un cambio en el índice de refracción del medio, que se detecta como un cambio en la resonancia de plasmón superficial de la película de oro. Este sistema posibilita la determinación de índices a intervalos, desde los cuales se puede calcular la afinidad de unión y evaluar la estequiometría de unión. Alternativamente, la unión ligando/receptor se puede analizar usando tecnología (TM) (Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA).

Los polipéptidos receptores de la unión al ligando se pueden usar también dentro de otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica. Dichos sistemas incluyen el análisis Scatchard para determinación de afinidad de unión (véase, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-72, 1949) y ensayos calorimétricos (Cunningham *et al.*, *Science* 253:545-48, 1991; Cunningham *et al.*, *Science* 245:821-25, 1991).

Los polipéptidos Zcytor17lig también se pueden emplear para preparar anticuerpos que se unen a los epítopos, péptidos o polipéptidos zcytor17lig. El polipéptido zcytor17lig, o su fragmento, sirve como antígeno (inmunógeno) para inocular un animal y provocar una respuesta inmunitaria. Dichos anticuerpos se pueden usar para bloquear la acción biológica de zcytor17lig proinflamatorio y son útiles como terapéuticos antinflamatorios en una diversidad de enfermedades descritas en la presente memoria. Las personas con experiencia en la técnica reconocerían que los polipéptidos antigenicos que portan epítopos contienen una secuencia de por lo menos 6, preferiblemente por lo menos 9 y más preferiblemente por lo menos 15 a aproximadamente 30 residuos aminoácido contiguos de un polipéptido zcytor17lig (p. ej., la SEC ID NO: 2). Se incluyen los polipéptidos que comprenden una porción más grande de un polipéptido zcytor17lig, es decir, entre 30 y 100 residuos hasta la longitud total de la secuencia de aminoácidos. Los antígenos o epítopos inmunogénicos pueden también incluir marcadores adheridos, adyuvantes, vehículos y portadores, como se describe en esta memoria. Los antígenos adecuados incluyen el polipéptido zcytor17lig codificado por la SEC NO: 2 del número de aminoácido 24 al número de aminoácido 164, o su fragmento de aminoácido contiguo 9 a 141. Otros antígenos adecuados incluyen el zcytor17lig maduro y de longitud total, las hélices A-D y las hélices A, B, C y D individuales o múltiples, de estructura de cuatro hélices de zcytor17lig, como se describe aquí. Los péptidos preferidos para uso como antígenos son péptidos hidrófilos tales como aquellos pronosticados por el experto en la técnica a partir de un trazado de hidrofobicidad, como se describe en la presente memoria, por ejemplo, los residuos aminoácido 114-119, 101-105, 126-131, 113-118 y 158-162 de la SEC ID NO: 2; y los residuos aminoácido 34-39, 46-51, 131-136, 158-163 y 157-162 de la SEC ID NO: 11. Además, los epítopos antigenicos zcytor17lig según lo pronosticado por un trazado Jameson-Wolf, p. ej., usando el programa DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI), sirven como antígenos preferidos, y se determinan fácilmente por el experto en la técnica.

Los anticuerpos de una respuesta inmunitaria generada por inoculación de un animal con estos antígenos se pueden aislar y purificar como se describe en el presente documento. Los métodos para preparar y aislar anticuerpos policlonales y monoclonales se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, Cooligan, *et al.* (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición*, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Hurrell, J. G. R., Ed., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982.

Como sería obvio para el experto en la técnica, los anticuerpos policlonales pueden generarse inoculando una diversidad de animales de sangre caliente, tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas, con un polipéptido zcytor17lig o su fragmento. La inmunogenicidad de un polipéptido zcytor17lig se puede aumentar a través del uso de un adyuvante, como alum (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para la inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, como fusiones de zcytor17lig o de su proteína con un polipéptido de inmunoglobulina con proteína de unión a maltosa. El inmunógeno del polipéptido puede ser una molécula de longitud total o una porción de ésta. Si la porción del polipéptido es “de tipo hapteno”, dicha porción puede estar ventajosamente unida o conectada a un vehículo macromolecular (como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o toxoide tetánico) para inmunización.

Como se emplea en esta memoria, el término “anticuerpos” incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígenos, como fragmentos F(ab)₂ y fragmentos Fab proteolíticos. También se incluyen los anticuerpos o fragmentos intactos genomanipulados, como anticuerpos químéricos, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios y similares, como también péptidos y polipéptidos sintéticos de unión a antígenos. Los anticuerpos no humanos se pueden humanizar injertando CDR no humanos en regiones constantes y marco humanas, o incorporando los dominios variables no humanos enteros (opcionalmente “cubriendolos” con una superficie de tipo humana con reemplazo de residuos expuestos, en donde el resultado es un anticuerpo “revestido”). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden retener residuos no humanos dentro de los dominios marco de región variable humanos para potenciar las características de unión apropiadas. Humanizando los anticuerpos, se puede aumentar la semivida biológica, y se reduce el potencial de reacciones inmunitarias adversas tras la administración a seres humanos. Además, los anticuerpos humanos se pueden producir en animales transgénicos no humanos que han sido manipulados para contener genes de inmunoglobulina humana, como se describe en la publicación WIPO No. WO 98/24893. Se prefiere que los genes de inmunoglobulina endógenos en estos animales sean inactivados o eliminados, como por recombinación homóloga.

Se considera que los anticuerpos son específicamente de unión si: 1) exhiben un nivel umbral de actividad de unión, y 2) no reaccionan significativamente en forma cruzada con moléculas de polipéptidos relacionadas. Se determina un

nivel umbral de unión si los anticuerpos anti-zcytor17lig de esta memoria se unen a un polipéptido, péptido o epítopo zcytor17lig con una afinidad por lo menos 10 veces mayor que la afinidad de unión para el polipéptido control (no zcytor17lig). Se prefiere que los anticuerpos exhiban una afinidad de unión (K_a) de 10^6 M^{-1} o más, preferiblemente 10^7 M^{-1} o más, más preferiblemente 10^8 M^{-1} o más y lo más preferiblemente 10^9 M^{-1} o más. La afinidad de unión de un anticuerpo se puede determinar fácilmente por el experto en la técnica, por ejemplo, por análisis Scatchard (Scatchard, G., *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949).

Si los anticuerpos anti-zcytor17lig no reaccionan significativamente en forma cruzada con moléculas de polipéptidos relacionadas, se muestra, por ejemplo, por el anticuerpo que detecta el polipéptido zcytor17lig pero no polipéptidos relacionados conocidos, usando un análisis de transferencia Western convencional (Ausubel *et al.*, *ibid.*). Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos se han descrito en la técnica anterior, por ejemplo ortólogos conocidos, y parálogos, y miembros conocidos similares de una familia de proteínas. La selección también se puede realizar usando zcytor17lig no humano y polipéptidos mutantes de zcytor17lig. Además, los anticuerpos se pueden “cribar contra” polipéptidos relacionados conocidos, para aislar una población que se une específicamente a los polipéptidos zcytor17lig. Por ejemplo, los anticuerpos generados contra zcytor17lig se adsorben en polipéptidos relacionados adheridos a una matriz insoluble; los anticuerpos específicos de zcytor17lig fluirán a través de la matriz bajo condiciones de tamponación adecuadas. El cribado permite el aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales que no reaccionan en forma cruzada a polipéptidos relacionados conocidos (*Antibodies: A Laboratory Manual*. Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; *Current Protocols in Immunology*, Cooligan, *et al.* (eds.). National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995). El cribado y aislamiento de anticuerpos específicos se conocen en la técnica. Véase, *Fundamental Immunology*, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff *et al.*, *Adv. in Immunol.* 43: 1-98, 1988; *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 2: 67-101, 1984. Los anticuerpos anti-zcytor17lig de unión específica se pueden detectar por una diversidad de métodos de la técnica, y se describen a continuación.

El experto en la técnica conoce una diversidad de métodos que se pueden utilizar para detectar anticuerpos que se unen a las proteínas o polipéptidos zcytor17lig. Los ensayos ilustrativos se describen en detalle en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de dichos ensayos incluyen: inmunoelectroforesis concurrente, radioimmunoensayo, radioimmunoprecipitación, enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), transferencia Western, ensayo de inhibición o competición y ensayo sándwich. Además, los anticuerpos se pueden cribar para unión a una proteína o polipéptido zcytor17lig de tipo salvaje frente a uno mutante.

Los anticuerpos para zcytor17lig se pueden usar para marcar células que expresan zcytor17lig; para aislar zcytor17lig por purificación por afinidad; para ensayos diagnósticos a fin de determinar niveles circulantes de polipéptidos zcytor17lig; para detectar o cuantificar zcytor17lig soluble como marcador de una patología o enfermedad subyacente; en métodos analíticos que emplean FACS; para cribar colecciones de expresión; para generar anticuerpos anti-idiotípicos; y como anticuerpos neutralizadores o como antagonistas para bloquear la actividad de zcytor17lig *in vitro* e *in vivo*. Las etiquetas o marcadores directos adecuados incluyen radionúcleos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimiluminiscentes, partículas magnéticas y similares; las etiquetas o marcadores indirectos pueden usar biotina-avidina u otros pares de complemento/anticomplemento como intermedios. Los anticuerpos de la presente memoria pueden también estar directa o indirectamente conjugados a fármacos, toxinas, radionúcleos y similares, y estos conjugados pueden utilizarse para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas *in vivo*. A su vez, los anticuerpos para zcytor17lig o sus fragmentos pueden usarse *in vitro* para detectar zcytor17lig desnaturizado o sus fragmentos en ensayos, por ejemplo transferencias Western u otros ensayos conocidos en la técnica.

Las moléculas detectables adecuadas pueden estar directa o indirectamente fijadas al polipéptido o anticuerpo, e incluyen radionúcleos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimiluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas pueden estar directa o indirectamente fijadas al polipéptido o anticuerpo, e incluyen toxinas bacterianas o vegetales (por ejemplo, difteria, toxina, saponina, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y demás); como también radionúcleos terapéuticos, por ejemplo yodo-131, renio-188 o irtrio-90 (o bien directamente fijados al polipéptido o anticuerpo, o indirectamente fijados a través de un resto quelante, por ejemplo). Los polipéptidos o anticuerpos pueden también conjugarse a fármacos citotóxicos, como adriamicina. Para fijación indirecta de una molécula citotóxica detectable, la molécula detectable o citotóxica puede conjugarse con un miembro de un par complementario/anticomplementario, en el que el otro miembro está unido a la porción del polipéptido o anticuerpo. Para estos propósitos, biotina/estreptavidina es un par complementario/anticomplementario ilustrativo.

Los polipéptidos de unión también pueden actuar como “antagonistas” de zcytor17lig para bloquear la unión y transducción de señales de zcytor17lig *in vitro* e *in vivo*. Estos polipéptidos de unión anti-zcytor17lig serían útiles para inhibir la actividad de zcytor17lig o la unión de la proteína.

Las proteínas de fusión polipéptido-toxina o las proteínas de fusión anticuerpo-toxina se pueden usar para inhibición o ablación de célula o tejido diana (por ejemplo, para tratar células o tejidos cancerosos). Alternativamente, si el polipéptido tiene múltiples dominios funcionales (es decir, un dominio de activación o un dominio de unión al receptor, más un dominio diana), una proteína de fusión que incluya solamente el dominio diana puede ser adecuada para dirigir una molécula detectable, una molécula citotóxica o una molécula complementaria hacia una célula o tejido de

interés. En casos en los que la única proteína de fusión del dominio incluya una molécula complementaria, la molécula anticomplementaria podrá conjugarse a una molécula detectable o citotóxica. Dichas proteínas de fusión dominio-molécula complementaria representan así un vehículo diana genérico para administración específica de células/tejidos de los conjugados genéricos de molécula detectable anticomplementaria/citotóxica.

- 5 En otra realización, las proteínas de fusión de citocinas zcytor17lig o las proteínas de fusión anticuerpo-citocina se pueden usar para destrucción de tejido diana *in vivo* (por ejemplo, leucemia, linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de ovario, piel, cáncer de la sangre y la médula ósea, u otros tipos de cáncer en los que se expresan los receptores zcytor17lig) (Véase, en general, Homick *et al.*, *Blood* 89:4437-47, 1997).
- 10 Las proteínas de fusión descritas permiten dirigir una citocina hacia un sitio deseado de acción, proporcionando así una concentración local elevada de citocina. Los polipéptidos zcytor17lig o anticuerpos anti-zcytor17lig adecuados dirigen una célula o tejido indeseable (es decir, un tumor o una leucemia), y la citocina condensada mediada mejora la lisis de células diana por células efectoras. Las citocinas adecuadas para este propósito incluyen interleucina 2 y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), por ejemplo.

- 15 Incluso en otra realización, si el polipéptido zcytor17lig o el anticuerpo anti-zcytor17lig dirige células o tejidos vasculares, dicho polipéptido o anticuerpo puede conjugarse con un radionúcleo, y particularmente con un radionúcleo beta-emisor, para reducir la restenosis. Dichos planteamientos terapéuticos conllevan menos peligro para los médicos que administran la terapia radiactiva. Por ejemplo, bandas impregnadas con iridio-192 dispuestas en vasos con endoprótesis de pacientes hasta que se suministraba la dosis de radiación requerida demostraron un menor crecimiento del tejido en el vaso y mayor diámetro luminal que el grupo control, que recibió bandas con placebo. A su vez, la revascularización y trombosis por endoprótesis se redujeron significativamente en el grupo de tratamiento. Se pronostican resultados similares por dirigir un conjugado bioactivo que contenga un radionúcleo, como se describe en esta memoria.

- 20 25 Los conjugados de anticuerpo o polipéptido bioactivo descritos en la presente memoria se pueden administrar por vía intravenosa, intrarterial o intraductal, o pueden introducirse localmente en el sitio intencionado de acción.

Además, la inflamación es una respuesta protectora de un organismo para defenderse contra un agente invasor. La inflamación es un evento en cascada que implica muchos mediadores celulares y humorales. Por una parte, la supresión de respuestas inflamatorias puede dejar a un hospedante inmunocomprometido; no obstante, si no se controla, la inflamación puede conducir a complicaciones graves que incluyen enfermedades inflamatorias (p. ej., artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino y similares), choque septicémico y falla orgánica múltiple. Cabe destacar que estos distintos estados de enfermedad comparten mediadores inflamatorios comunes. Las enfermedades colectivas que se caracterizan por inflamación tienen un gran impacto sobre la morbilidad humana. Por lo tanto, está claro que los anticuerpos y polipéptidos de unión antinflamatorios, como los anticuerpos anti-zcytor17lig y los polipéptidos de unión descritos en este documento, podrían tener un potencial terapéutico crucial para una amplia gama de enfermedades humanas y animales, que oscilan entre asma y alergia hasta autoinmunidad y choque septicémico. Como tal, los anticuerpos anti-zcytor17lig y polipéptidos de unión antinflamatorios de la presente invención se pueden usar terapéuticamente como los antagonistas de zcytor17lig descritos en esta memoria, particularmente en enfermedades tales como artritis, endotoxemia, enfermedad inflamatoria de los intestinos, psoriasis, enfermedades asociadas y similares.

1. Artritis

45 La artritis, que incluye la artrosis, artritis reumatoidea, articulaciones artríticas como consecuencia de una lesión y similares, consiste en afecciones inflamatorias comunes que se beneficiarían con el uso de anticuerpos y polipéptidos de unión antinflamatorios, como los anticuerpos anti-zcytor17lig y los polipéptidos de unión de la presente invención. Por ejemplo, la artritis reumatoidea es una enfermedad sistémica que afecta a todo el cuerpo y es una de las formas más comunes de artritis. Se caracteriza por la inflamación de la membrana que reviste la articulación, lo que causa dolor, rigidez, calor, enrojecimiento e hinchazón. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir hueso y cartílago. Como consecuencia de la artritis reumatoidea, el revestimiento de la articulación inflamada, el sinovio, puede invadir y dañar el hueso y el cartílago, lo que conduce a un deterioro de la articulación y dolor intenso, entre otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su forma y alineación, lo cual provoca dolor y pérdida de movimiento.

50 La artritis reumatoidea es una enfermedad inmunitaria particularmente caracterizada por inflamación y subsiguiente daño al tejido hasta discapacidad grave y aumento de la mortalidad. Se produce una diversidad de citocinas localmente en las articulaciones reumatoideas. Varios estudios han demostrado que la IL-1 y el TNF-alfa, dos citocinas proinflamatorias prototípicas, desempeñan una función importante en el mecanismo implicado en la inflamación sinovial y en la destrucción articular progresiva. De hecho, la administración de inhibidores de TNF-alfa y IL-1 en pacientes con artritis reumatoidea condujo a una destacada mejoría de los signos clínicos y biológicos de inflamación, y a una reducción de los signos radiológicos de erosión ósea y destrucción de cartílago. No obstante, a pesar de estos alentadores resultados, un porcentaje significativo de pacientes no responde a estos agentes, lo que indica que otros mediadores también estarían implicados en la patofisiología de la artritis (Gabay, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2(2):135-149, 2002). Uno de esos mediadores podría ser zcytor17lig y, como tal, una molécula que se une o inhibe el zcytor17lig, como las parejas de unión o anticuerpos zcytor17lig, podría servir como terapéutico valioso para reducir la inflamación en la artritis reumatoidea, y en otras enfermedades artríticas.

ES 2 310 660 T3

Se conocen en la técnica varios modelos animales para la artritis reumatoidea. Por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno, los ratones presentan artritis inflamatoria crónica que se asemeja en gran medida a la artritis reumatoidea humana. Ya que la artritis inducida por colágeno comparte características inmunológicas y patológicas similares con la artritis reumatoidea, esto la convierte en un modelo ideal para seleccionar compuestos antinflamatorios humanos. El modelo de artritis inducida por colágeno es un modelo conocido en ratones, que depende para suceder, tanto de una respuesta inmunitaria como de una respuesta inflamatoria. La respuesta inmunitaria comprende la interacción de células B y células T CD4+ en respuesta a colágeno, que se administra como antígeno, y conduce a la producción de anticuerpos anticolágeno. La fase inflamatoria es el resultado de respuestas del tejido de mediadores de inflamación, como consecuencia de la reacción cruzada de algunos de estos anticuerpos con el colágeno natural del ratón, y de la activación de la cascada de complemento. Una ventaja de usar el modelo de artritis inducida por colágeno es que se conocen los mecanismos básicos de la patogenia. Se han identificado los epítotos de células T y células B relevantes en el colágeno de tipo II, y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (p. ej., hipersensibilidad de tipo demorada y anticuerpo anticolágeno) e inflamatorios (p. ej., citocinas, quimiocinas y enzimas degradantes de matriz) relacionados con artritis inmunitaria, y, por ende, se pueden usar para evaluar la eficacia del compuesto de ensayo en el modelo de artritis inducida por colágeno (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407-20, 1999; Williams *et al.*, *Immunol.* 89:9784-788, 1992; Myers *et al.*, *Life Sci.* 61:1861-78, 1997; y Wang *et al.*, *Immunol.* 92:8955-959, 1995).

La administración de zcytor17 soluble, que comprende polipéptidos (incluyendo los receptores heterodiméricos y multiméricos descritos aquí), como zcytor17-Fc4 u otras proteínas de fusión y solubles zcytor17 a estos ratones del modelo de artritis inducida por colágeno, se usó para evaluar el uso de zcytor17 para aliviar los síntomas y alterar el curso de la enfermedad. Como molécula que modula respuestas inmunitarias e inflamatorias, zcytor17lig, puede inducir la producción de SAA, que está implicado en la patogenia de la artritis reumatoidea; los antagonistas de zcytor17lig pueden reducir la actividad de SAA *in vitro* e *in vivo*, la administración sistémica o local de antagonistas de zcytor17lig, como parejas de unión o anticuerpos anti-zcytor17lig, zcytor17 que comprende polipéptidos (incluyendo los receptores heterodiméricos y multiméricos descritos aquí), como zcytor17-Fc4 u otras proteínas de fusión y solubles zcytor17 pueden suprimir potencialmente la respuesta inflamatoria en la artritis reumatoidea. Otros agentes terapéuticos potenciales incluyen los polipéptidos zcytor17, los polipéptidos receptores solubles heterodiméricos y multiméricos, o parejas de unión o anticuerpos anti-zcytor17lig de la presente invención, y similares.

30 2. Endotoxemia

La endotoxemia es una afección grave que comúnmente es consecuencia de agentes infecciosos tales como bacterias y otros agentes de enfermedades infecciosas, septicemia, síndrome de choque tóxico, o en pacientes inmunocomprometidos sujetos a infecciones oportunistas, o similares. Los polipéptidos de unión y anticuerpos antinflamatorios terapéuticamente útiles, como los polipéptidos de unión y anticuerpos anti-zcytor17lig de la presente invención, podrían ayudar en la prevención y el tratamiento de la endotoxemia en seres humanos y animales. Otros agentes terapéuticos potenciales que incluyen los polipéptidos zcytor17, los polipéptidos receptores solubles heterodiméricos y multiméricos o las parejas de unión o anticuerpos anti-zcytor17lig de la presente invención, y similares, podrían servir como terapéuticos valiosos para reducir la inflamación y los efectos patológicos de la endotoxemia.

40 La endotoxemia inducida por lipolisacáridos (LPS) compromete a muchos de los mediadores inflamatorios que producen efectos patológicos en enfermedades infecciosas, y la endotoxemia inducida por LPS en roedores es un modelo ampliamente utilizado y aceptable para estudiar los efectos farmacológicos de agentes proinflamatorios o inmunomoduladores potenciales. El LPS, producido en bacterias gramnegativas, es un agente causal en la patogenia de choque septicémico (Glausner *et al.*, *Lancet* 338:732, 1991). Un estado de tipo choque puede, de hecho, inducirse experimentalmente mediante una sola inyección de LPS a los animales. Las moléculas producidas por células que responden a LPS pueden dirigir los patógenos directa o indirectamente. Si bien estas respuestas biológicas protegen al hospedante contra patógenos invasores, pueden también causar daño. En consecuencia, la estimulación masiva de inmunidad innata, que ocurre como consecuencia de una infección bacteriana gramnegativa grave, conduce a una producción excesiva de citocinas y otras moléculas, y al desarrollo de un síndrome mortal, el síndrome de choque septicémico, que se caracteriza por fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada y falla orgánica múltiple (Durnitru *et al.* *Cell* 103:1071-1083, 2000).

55 Estos efectos citotóxicos de LPS están principalmente relacionados con la activación de macrófagos, que lleva a la liberación de múltiples mediadores inflamatorios. Entre estos mediadores, el TNF parece desempeñar un papel crucial, según lo indicado por la prevención de toxicidad de LPS por la administración de anticuerpos neutralizadores anti-TNF (Beutler *et al.*, *Science* 229:869, 1985). Está bien consolidado que 1 μ g inyección de *E. coli* LPS a ratones C57Bl/6 provocará aumentos significativos de IL-6, TNF-alfa, IL-1 y proteínas de fase aguda (por ejemplo, SAA) circulantes, aproximadamente 2 horas después de la inyección. La toxicidad de LPS, que parece estar mediada por estas citocinas, como inmunización pasiva contra estos mediadores puede reducir la mortalidad (Beutler *et al.*, *Science* 229:869, 1985). Las estrategias potenciales de inmunointervención para la prevención y/o el tratamiento de choque septicémico incluyen anti-TNF mAb, antagonistas del receptor IL-1, LIF, IL-10 y G-CSF. Ya que el LPS induce la producción de factores proinflamatorios que posiblemente contribuyen a la patología de la endotoxemia, la neutralización de la actividad de zcytor17lig, SAA u otros factores proinflamatorios, por el polipéptido zcytor17lig antagónico, puede utilizarse para reducir los síntomas de la endotoxemia, como aquellos observados en el choque endotóxico. Otros agentes terapéuticos potenciales incluyen los polipéptidos zcytor17, polipéptidos receptores solubles heterodiméricos y multiméricos, o las parejas de unión o anticuerpos anti-zcytor17lig de la presente invención, y similares.

3. Enfermedad inflamatoria de los intestinos, IBD

En los Estados Unidos, aproximadamente 500.000 personas padecen enfermedad inflamatoria de los intestinos (IBD), que puede afectar el colon y el recto (colitis ulcerosa) o el intestino delgado y el grueso (enfermedad de

5 Crohn). La patogenia de estas enfermedades no está del todo clara, pero implica la inflamación crónica de los tejidos afectados. Los agentes terapéuticos potenciales, que incluyen los polipéptidos zcytor17, los polipéptidos receptores solubles heterodiméricos y multiméricos, o las parejas de unión o anticuerpos anti-zcytor17lig de la presente invención, y similares, podrían servir como valiosos agentes terapéuticos para reducir la inflamación y los efectos patológicos de la IBD y enfermedades relacionadas con ésta.

10 La colitis ulcerosa (UC) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, comúnmente llamado colon, caracterizada por inflamación y ulceración de la mucosa o del revestimiento más interno del colon. Esta inflamación hace que el colon se evague frecuentemente, provocando diarrea. Los síntomas incluyen ablandamiento de heces y cólicos asociados, fiebre y adelgazamiento. Si bien se desconoce la causa exacta de la colitis ulcerosa, las investigaciones 15 recientes indican que las defensas naturales del organismo funcionan contra proteínas en el organismo, que el organismo piensa que son extrañas (una reacción "autoinmunitaria"). Tal vez porque se asemejan a las proteínas bacterianas del intestino, estas proteínas pueden o bien instigar o estimular el proceso inflamatorio que comienza para destruir el revestimiento del colon. A medida que se destruye el revestimiento del colon, las úlceras producen la liberación de moco, pus y sangre. La enfermedad usualmente comienza en la zona rectal y eventualmente puede extenderse hacia 20 todo el intestino grueso. Los episodios repetidos de inflamación conducen a un engrosamiento de la pared del intestino y el recto con tejido cicatricial. Se puede producir la muerte del tejido del colon o una septicemia, si la enfermedad es grave. Los síntomas de la colitis ulcerosa varían en intensidad, y el inicio puede ser gradual o súbito. Los ataques pueden ser provocados por muchos factores, incluyendo infecciones respiratorias o estrés.

25 Si bien actualmente no existe la cura de la colitis ulcerosa, los tratamientos apuntan a suprimir el proceso inflamatorio anormal en el revestimiento del colon. Los tratamientos que incluyen inmunosupresores corticosteroideos (p. ej., azatioprina, mercaptopurina y metotrexato) y aminosalicilatos están disponibles para tratar la enfermedad. No obstante, el uso a largo plazo de inmunosupresores tales como corticosteroideos y azatioprina puede provocar graves efectos 30 colaterales que incluyen afinamiento óseo, cataratas, infecciones y efectos sobre el hígado y la médula ósea. En los pacientes en quienes las terapias actuales no son exitosas, la cirugía es una opción. La cirugía implica la extirpación de todo el colon y el recto.

35 Existen varios modelos animales que pueden imitar parcialmente la colitis ulcerosa crónica. El modelo más utilizado es el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobenosulfónico/etanol (TNBS), que induce inflamación crónica y ulceración del colon. Cuando se introduce TNBS en el colon de ratones susceptibles vía instilación intrarrectal, el TNBS induce una respuesta inmunitaria mediada por células T en la mucosa del colon, que en este caso conduce a una inflamación mucosa masiva caracterizada por infiltración densa de células T y macrófagos en toda la pared del intestino grueso. Además, este cuadro histopatológico va acompañado por el cuadro clínico de adelgazamiento progresivo (deterioro progresivo), diarrea sanguinolenta, prolaps rectal y engrosamiento de la pared del intestino grueso 40 (Neurath *et al. Intern. Rev. Immunol.* 19:51-62, 2000).

45 Otro modelo de colitis usa sulfato de dextrano sódico (DSS), que induce una colitis aguda manifestada por diarrea sanguinolenta, adelgazamiento, acortamiento del colon y ulceración mucosa con infiltración de neutrófilos. La colitis inducida por DSS se caracteriza histológicamente por infiltración de células inflamatorias en la lámina propia, con hiperplasia linfoide, daño focal de la cripta y ulceración epitelial. Se cree que estos cambios se producen debido a un efecto tóxico del DSS sobre el epitelio, y a la fagocitosis de las células de la lámina propia y la producción de TNF-alga e IFN-gamma. A pesar de su uso común, varias cuestiones asociadas a los mecanismos del DDS con respecto a la relevancia de la enfermedad humana, aún no se han resuelto. El DSS se considera un modelo independiente de las células T porque se observa en animales deficientes de células T, como los ratones SCID.

50 La administración de parejas de unión o anticuerpos anti-zcytor17lig, polipéptidos zcytor17 solubles (incluyendo receptores heterodiméricos y multiméricos), como zcytor17-Fc4 u otras proteínas de fusión y solubles zcytor17 a estos modelos de TNBS o DSS, se puede utilizar para evaluar el uso de antagonistas de zcytor17lig para aliviar los síntomas y alterar el curso de la enfermedad gastrointestinal. Zcytor17lig puede desempeñar una función de la respuesta inflamatoria en colitis, y la neutralización de la actividad de zcytor17lig mediante la administración de antagonistas de zcytor17lig es un planteamiento terapéutico potencial para la IBD. Otros terapéuticos potenciales incluyen los polipéptidos zcytor17, los polipéptidos receptores solubles heterodiméricos y multiméricos, o las parejas de unión o anticuerpos anti-zcytor17lig de la presente invención, y similares.

60 4. Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad crónica de la piel que afecta a más de siete millones de estadounidenses. La psoriasis ocurre cuando las células nuevas de la piel se desarrollan anormalmente, produciendo parches de piel inflamados, hinchados y escamosos, en donde la piel anterior no se ha quitado lo suficientemente rápido. La psoriasis en placas, 65 la forma más común, se caracteriza por parches de piel inflamada ("lesiones") cubiertos con escamas de color blanco a plateado. La psoriasis puede limitarse a algunas placas o implicar áreas moderadas a extensas de piel, que aparecen más comúnmente en el cuero cabelludo, las rodillas, los codos y el tronco. Si bien es muy visible, la psoriasis no es una enfermedad contagiosa. La patogenia de la enfermedad implica la inflamación crónica de los tejidos afectados.

Los polipéptidos zcytor17, los polipéptidos receptores solubles heterodiméricos y multiméricos o las parejas de unión o anticuerpos anti-zcytor17lig de la presente invención, y similares, podrían servir como valiosos agentes terapéuticos para reducir la inflamación y los efectos patológicos de la psoriasis, otras enfermedades inflamatorias de la piel, alergias de la piel y las mucosas, y enfermedades relacionadas.

5 La psoriasis es un trastorno inflamatorio mediado por células T de la piel, que puede causar bastante malestar. Es una enfermedad que no tiene cura y que afecta a personas de todas las edades. La psoriasis afecta a aproximadamente dos por ciento de las poblaciones de Europa y América del Norte. Si bien las personas con psoriasis leve a menudo pueden controlar la enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes de todo el mundo necesitan terapia inmunosupresora sistémica o con rayos ultravioleta. Desafortunadamente, la incomodidad y los riesgos de la radiación ultravioleta, como también la toxicidad de muchas terapias, limitan su uso a largo plazo. Asimismo, la psoriasis por lo general es recurrente y, en algunos casos, tiene un efecto rebote ni bien se suspende la terapia inmunosupresora.

10 15 La diferenciación es un proceso progresivo y dinámico, que comienza con células madre pluripotentes y finaliza con células terminalmente diferenciadas. Las células madre pluripotentes que pueden regenerarse sin comprometer un linaje expresan un conjunto de marcadores de diferenciación que se pierden cuando existe un compromiso con el linaje celular. Las células progenitoras expresan un conjunto de marcadores de diferenciación que pueden o no continuar para expresarse a medida que las células progresan por la vía del linaje celular hacia la maduración. Los marcadores de diferenciación que son expresados exclusivamente por células maduras son por lo general propiedades funcionales,

20 25 por ejemplo productos celulares, enzimas para producir productos celulares y receptores. La etapa de diferenciación de una población celular por identificación es controlada por la identificación de marcadores presentes en la población celular.

Existen datos que indican que los factores que estimulan tipos celulares específicos en una vía hacia la diferenciación o desdiferenciación terminal afectan a toda la población celular, lo que tiene origen en un precursor o una célula madre común. Por lo tanto, la presente invención incluye estimular o inhibir la proliferación de células linfoides, células hematopoyéticas y células epiteliales.

30 35 Se aisló zcytor17lig de tejido conocido por tener una función inmunológica importante, y que contiene células que desempeñan una función en el sistema inmunitario. El zcytor17lig se expresa en células de sangre periférica activadas seleccionadas para CD3+, y se ha demostrado que la expresión de zcytor17lig aumenta después de la activación de las células T. Sin embargo, los resultados de los experimentos descritos en la sección de Ejemplos de esta memoria indican que los polipéptidos de la presente invención pueden tener efecto sobre el desarrollo/expansión de monocitos/macrófagos, células T, células B, linfocitos citolíticos naturales y/o el estado diferenciado de monocitos/macrófagos, células T, células B, linfocitos citolíticos naturales, los progenitores de estas células. En general, se conocen los factores que estimulan la proliferación de progenitores hematopoyéticos y activan células maduras, no obstante, la proliferación y activación también puede requerir factores de crecimiento adicionales. Por ejemplo, se ha demostrado que la IL-7 y el Factor Steel (ligando c-kit) fueron necesarios para la formación de colinas de progenitores de linfocitos citolíticos naturales. IL-15 + IL-2, en combinación con IL-7 y Factor Steel fue más eficaz (Mrózek *et al.*, *Blood* 87:2632-2640, 1996). No obstante, pueden ser necesarias citocinas no identificadas para la proliferación de subconjuntos específicos de linfocitos citolíticos naturales/o progenitores de linfocitos citolíticos naturales (Robertson *et. al.*, *Blood* 76:2451-2438, 1990). De modo similar, el zcytor17lig puede actuar solo o junto con, o en sinergia, con otras citocinas para potenciar el desarrollo, la proliferación, expansión y modificación de la diferenciación de monocitos/macrófagos, células T, células B o linfocitos citolíticos naturales.

40 45 50 Los ensayos que miden la diferenciación incluyen, por ejemplo, medir los marcadores celulares asociados a expresión específica de las etapas 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. Bioprocesses*, 161-171, 1989; todas incorporadas a la presente memoria por referencia). Alternativamente, el polipéptido zcytor17lig por sí mismo puede servir como marcador segregado o superficie celular adicional con expresión específica de las etapas de un tejido. Como tal, la medición directa del polipéptido zcytor17lig, o su pérdida de expresión en un tejido a medida que se diferencia, puede servir como marcador para la diferenciación de tejidos.

55 60 65 De modo similar, la medición directa del polipéptido zcytor17lig, o su pérdida de expresión en un tejido, se pueden determinar en un tejido o en células, a medida que sufren la progresión del tumor. Los aumentos en la invasión y motilidad de las células, o el aumento o la pérdida de expresión de zcytor17lig en un cuadro precanceroso o canceroso, en comparación con tejido normal, pueden servir como diagnóstico para la transformación, invasión y metástasis en la progresión de tumores. Como tal, tener conocimiento de la etapa de progresión en la que se encuentra el tumor o la metástasis ayudará al médico a elegir la terapia más adecuada, o la agresividad del tratamiento, para un paciente con cáncer en particular. Los métodos para medir el aumento o la pérdida de expresión (o bien de mRNA o de proteínas) se conocen en la técnica, se describen aquí y se pueden aplicar a la expresión de zcytor17lig. Por ejemplo, se puede usar la aparición o desaparición de polipéptidos que regulan la motilidad de las células para ayudar en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata (Banyard, J. y Zetter, B.R., *Cancer and Metast. Rev.* 17:449-458, 1999). Como efecto de la motilidad de las células, el aumento o pérdida de expresión de zcytor17lig puede servir como diagnóstico para cáncer linfoide, de células B, epitelial, hematopoyético y otros tipos de cáncer.

Además, la actividad y el efecto de zcytor17lig sobre la progresión tumoral y la metástasis se pueden medir *in vivo*. Se han creado varios modelos de ratones singeneicos para estudiar la influencia de los polipéptidos, compuestos u otros

tratamientos sobre la progresión de tumores. En estos modelos, las células tumorales pasadas por cultivo se implantan en ratones de la misma cepa que el donante del tumor. Las células forman tumores que tienen características similares en el ratón receptor, y también se presenta metástasis en algunos de los modelos. Los modelos de tumores apropiados para nuestros estudios incluyen el carcinoma de pulmón de Lewis (ATCC No. CRL-1642) y el melanoma B16 (ATCC No. CRL-6323), entre otros. Éstas son líneas tumorales muy utilizadas, singeneicas para el ratón C57BL6/J, que se cultivan y manipulan fácilmente *in vitro*. Los tumores que surgen del implante de alguna de estas líneas celulares son capaces de generar metástasis en el pulmón de ratones C57BL6/J. El modelo de carcinoma de pulmón de Lewis se ha utilizado recientemente en ratones para identificar un inhibidor de angiogénesis (O'Reilly MS, *et al. Cell* 79: 315-328, 1994). Los ratones C57BL6/J son tratados con un agente experimental, o bien con inyecciones diarias de proteína recombinante, agonista o antagonista, o con una única inyección de adenovirus recombinante. Tres días después del tratamiento, se implantan 10^5 a 10^6 células bajo la piel dorsal. Alternativamente, las células propiamente dichas pueden infectarse con adenovirus recombinante, por ejemplo, uno que exprese zcytor17lig, antes del implante, de modo que la proteína se sintetice en el sitio del tumor o intracelular, en vez de sistémicamente. Los ratones normalmente presentan tumores visibles al cabo de 5 días. Se dejan que los tumores se desarrollen durante un periodo máximo de 3 semanas, durante las cuales pueden alcanzar un tamaño de 1500-1800 mm³ en el grupo tratado con control. Se controlan cautelosamente el tamaño del tumor y el peso corporal durante todo el experimento. Al momento de sacrificar a los animales, el tumor se extirpa y se pesa junto con los pulmones y el hígado. Se ha demostrado que el peso del pulmón se correlaciona bien con la masa tumoral metastásica. Como una medida adicional, se cuentan las metástasis de la superficie del tumor. El tumor, los pulmones y el hígado resecados se preparan para examen histopatológico, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, usando métodos conocidos en la técnica y ya descritos en este documento. Se puede, por lo tanto, evaluar la influencia del polipéptido en cuestión expresado, p. ej., zcytor17lig, sobre la capacidad del tumor de incorporar vasculatura y sufrir metástasis. Asimismo, además de usar adenovirus, las células implantadas se pueden transfectar transitoriamente con zcytor17lig. El uso de transfectantes estables de zcytor17lig, como también el uso de promotores inducibles para activar la expresión de zcytor17lig *in vivo*, se conocen en la técnica y se pueden usar en este sistema para evaluar la inducción de metástasis de zcytor17lig. Además, se puede inyectar directamente zcytor17lig purificado o medio condicionado con zcytor17lig en este modelo de ratón y, en consecuencia se puede utilizar en este sistema. Para referencia general, véanse O'Reilly MS, *et al. Cell* 79:315-328, 1994; y Rusciano D, *et al. Murine Models of Liver Metastasis. Invasion Metastasis* 14:349-361, 1995.

El zcytor17lig o sus anticuerpos serán útiles para tratar la tumorigénesis y, por ende, serían útiles en el tratamiento del cáncer. El zcytor17lig se expresa en células T, monocitos y macrófagos activados, y está asociado a una región del cromosoma humano en la que son comunes las translocaciones en leucemia. Además, se observa que el zcytor17lig actúa a través de un receptor de citocina, el zcytor17, que también se expresa en células T, monocitos y macrófagos activados. La sobreestimulación de células T, monocitos y macrófagos activados por zcytor17lig podría provocar una patología humana, por ejemplo, cáncer de células inmunitarias u otros tipos de cáncer. Por ello, la identificación de la expresión de polipéptidos zcytor17lig (p. ej., anticuerpos anti-zcytor17lig, receptores solubles zcytor17 (p. ej., el receptor zcytor17, heterodímeros (p. ej., zcytor17/OSMRbeta, zcytor17/WSX-1), multímeros (p. ej., zcytor17/OSMRbeta/WSX-1) u otras parejas de unión de zcytor17lig) puede servir como diagnóstico, y pueden servir como antagonistas de la actividad proliferativa de zcytor17lig. El ligando podría administrarse en combinación con otros agentes ya en uso, que incluyen tanto agentes quimioterapéuticos convencionales como moduladores inmunitarios, tales como el interferón alfa. Se ha demostrado que los interferones alfa/beta son eficaces para tratar algunos tipos de leucemia y modelos de enfermedades animales, y los efectos inhibidores del crecimiento de interferón alfa y zcytor17lig pueden ser aditivos.

Se cree que los linfocitos citolíticos naturales desempeñan una función importante en la eliminación de células tumorales metastásicas, y los pacientes tanto con metástasis como con tumores sólidos tienen menos niveles de actividad de los linfocitos citolíticos naturales (Whiteside *et. al. Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 230:221-244, 1998). Sería útil un agente que estimule los linfocitos citolíticos naturales, en la eliminación de tumores.

La presente invención provee un método para reducir la proliferación de macrófagos/monocitos neoplásicos, que comprende administrar a un mamífero con una neoplasia de monocitos/macrófagos, una cantidad de una composición de zcytor17lig o anti-zcytor17lig suficiente para reducir la proliferación de monocitos/macrófagos neoplásicos. En otras realizaciones, la composición puede comprender por lo menos una otra citocina. Una segunda citocina se puede seleccionar del grupo que consiste en IL-2, IL-3, IL-12, IL-21, IL-22, IL-15, IL-4, GM-CSF, ligando Flt3 o factor de células madre.

La presente invención provee un método para inhibir la activación o diferenciación de monocitos/macrófagos. Los monocitos son células incompletamente diferenciadas que migran a diversos tejidos en los que maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos desempeñan una función central en la respuesta inmunitaria, presentando antígenos a linfocitos, y desempeñan un papel de soporte como células accesorias para los linfocitos, segregando diversas citocinas. Los macrófagos pueden internalizar moléculas extracelulares y, tras la activación, tienen una mayor capacidad de destruir los microorganismos intracelulares y las células tumorales. Los macrófagos activados están también implicados en la estimulación de inflamación aguda o local.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para reducir la proliferación de células B o T neoplásicas, que comprende administrar a un mamífero con neoplasia de células B o T, una cantidad de una composición antagonista de zcytor17lig suficiente para reducir la proliferación de los monocitos/macrófagos neoplásicos. En otras realizaciones, la composición puede comprender por lo menos una otra citocina, en donde la citocina se puede se-

ES 2 310 660 T3

lecciónar del grupo que consiste en IL-2, IL-3, IL-12, IL-21, IL-22, IL-15, IL-4, GM-CSF, ligando Flt3 o factor de células madre. Asimismo, el antagonista de zcytor17lig puede ser una proteína de fusión ligando/toxina.

Se puede emplear una toxina de fusión zcytor17lig-saporina contra un conjunto similar de leucemias y linfomas,

- 5 extendiendo la gama de leucemias que pueden tratarse con zcytor17lig. Por ejemplo, dichas leucemias pueden ser aquellas que sobreexpresan receptores zcytor17 (p. ej., receptor zcytor17, heterodímeros (p. ej., zcytor17/OSMRbeta, zcytor17/WSX-1), multímeros (p. ej., zcytor17/OSMRbeta/WSX)). La activación mediada por la toxina de fusión del receptor zcytor17, heterodímeros o multímeros del receptor zcytor17 (p. ej., zcytor19/OSMRbeta, zcytor17/WSX-1 o zcytor19/WSX-1/OSMR) proporciona dos medios independientes para inhibir el desarrollo de las células diana, donde 10 el primero es idéntico a los efectos observados en el ligando solo, y el segundo debido a la administración de la toxina a través de la internalización del receptor. El patrón de expresión restringido de linfoides y monocitos del receptor zcytor17 indica que el conjugado ligando-saporina puede ser tolerado por los pacientes.

15 Cuando el tratamiento de malignidades incluye el trasplante alogénico de médula ósea o de células madre, el zcytor17lig puede ser valioso para potenciar el efecto injerto versus tumor. El zcytor17lig puede estimular la generación de linfocitos citolíticos naturales líticos de progenitores de médula y puede estimular la proliferación de monocitos tras la activación de los receptores de antígenos. Por lo tanto, cuando los pacientes reciben trasplantes de médula alogénicos, el zcytor17lig potencia la generación de respuestas antitumorales, con o sin infusión de linfocitos donantes.

20 La distribución de tejido de los receptores para una determinada citocina ofrece una fuerte indicación de los sitios potenciales de acción de esa citocina. Se observó la expresión de zcytor17 en monocitos y células B, con un fuerte incremento de expresión tras la activación de células T CD3+, CD4+ y CD8+. A su vez, dos líneas de células monocíticas, THP-1 (Tsuchiya *et al.*, *Int. J. Cancer* 26:171-176, 1980) y U937 (Sundstrom *et al.*, *Int. J. Cancer* 17:565-577, 1976), también fueron positivas para la expresión de zcytor17.

25 El análisis Northern del receptor de WSX-1 reveló transcritos en todos los tejidos examinados, con aumento en los niveles de expresión en bazo, timo, ganglios linfáticos, médula ósea y leucocitos de sangre periférica de seres humanos. Además, los niveles de expresión de WSX-1 aumentaron tras la activación de las células T.

30 Se ha publicado que la expresión de OSMR es muy amplia (Mosley *et al.*, *JBC* 271:32635-32643, 1996). Esta distribución de los receptores zcytor17, WSX-1 y OSM soporta una función del zcytor17lig en respuestas inmunitarias, especialmente expansión de células T tras la activación, o una función en el brazo de monocitos/macrófagos del sistema inmunitario.

35 Por ende, las realizaciones particulares de la presente invención se refieren al uso de zcytor17/WSX-1/OSMR soluble, y heterodímeros de zcytor17/OSMR como antagonistas de enfermedades inflamatorias e inmunitarias o afecciones como la pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria de los intestinos (IBD), enfermedad de Crohn, cáncer de colon e intestino, diverticulosis, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, trasplante de órganos o médula ósea; inflamación debida a traumatismos, cirugías o infecciones; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad injerto contra hospedante; y en donde tiene lugar la inhibición de la inflamación, supresión inmunitaria, reducción de proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, células T (incluyendo células Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), supresión de la respuesta inmunitaria a un patógeno o antígeno. Además, la presencia de expresión de zcytor17 en células inmunitarias activadas, tales como las células CD4+ y CD19+ activadas, demostró que el receptor de zcytor17 podría estar implicado en las reacciones defensivas inmunitarias del organismo contra invasores extraños: como los microorganismos y residuos celulares, y podría desempeñar una función en las respuestas inmunitarias durante la inflamación y la formación de cáncer. Como tales, los anticuerpos y las parejas de unión de la presente invención, que son agonistas o antagonistas de la función del receptor de zcytor17, como zcytor17lig, pueden usarse para modificar la respuesta inmunitaria y la inflamación.

50 La estructura del zcytor17lig y la expresión de tejido indican una función en el desarrollo temprano hematopoyético o de timocitos y en la regulación de la respuesta inmunitaria y la inflamación. Estos procesos implican la estimulación de la proliferación y diferenciación celular en respuesta a la unión de una o más citocinas a sus receptores análogos. En vista de la distribución de tejido observada para este zcytor17lig, los agonistas (incluyendo el receptor o receptores 55 naturales) y los antagonistas tienen un potencial enorme en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Los compuestos identificados como agonistas de zcytor17lig son útiles para estimular la proliferación y el desarrollo de células diana *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los compuestos agonistas, zcytor17lig, o los anticuerpos anti-zcytor17lig, son útiles como componentes de medios de cultivo celular definidos, y se pueden usar solos o en combinación con otras citocinas y hormonas para reemplazar suero que comúnmente se utiliza en cultivo celular. Los agonistas son, por ende, útiles para 60 promover específicamente el crecimiento y/o desarrollo o activación de monocitos, células T, células B y otras células de linajes linfoides y mieloides, y células hematopoyéticas en cultivo.

El zcytor17lig puede ser útil para estimular la inmunidad mediada por células y para estimular la proliferación de linfocitos, como en el tratamiento de infecciones que implican inmunosupresión, incluyendo ciertas infecciones víricas. Otros usos incluyen la supresión de tumores, en donde la transformación maligna produce células tumorales que son antigenicas. El zcytor17lig podría usarse para inducir citotoxicidad, que puede ser mediada a través de la activación de células efectoras, por ejemplo células T, linfocitos citolíticos naturales o linfocitos citolíticos activados por linfoides (LAK), o inducida directamente a través de vías apoptóticas. El zcytor17lig también puede ser útil para

tratar leucopenias, aumentando los niveles del tipo de célula afectada, y para potenciar la regeneración del repertorio de células T después del trasplante de médula ósea; o para potenciar la proliferación o activación de monocitos, y para diagnóstico y otros usos descritos en la presente invención.

5 El zcytor17lig puede encontrar utilidad en la supresión del sistema inmunitario, como en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, enfermedad inflamatoria de los intestinos, enfermedad de Crohn, etc. La supresión inmunitaria también se puede usar para reducir el rechazo de trasplantes e injertos de tejido u órganos y para tratar leucemias o linfomas específicos de células T, células B o monocitos, y otros tipos de cáncer, inhibiendo la proliferación del tipo de célula afectada. Asimismo, el 10 zcytor17lig se puede usar para detectar monocitos, macrófagos y células T activadas, y para ayudar a diagnosticar dicha enfermedad autoinmunitaria, particularmente en las patologías en las que se elevan o activan los monocitos.

15 Los polipéptidos, péptidos o anticuerpos Zcytor17lig, y similares, se pueden usar también dentro de sistemas diagnósticos para la detección de niveles circulantes de zcytor17lig. Dentro de una realización relacionada, los anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente a los polipéptidos zcytor17lig se pueden usar para detectar polipéptidos zcytor17lig circulantes. Los niveles elevados o disminuidos de polipéptidos ligando pueden ser indicativos de afecciones 20 patológicas, incluyendo cáncer. Los polipéptidos zcytor17lig pueden contribuir a procesos patológicos y pueden ser marcadores indirectos de una enfermedad subyacente.

25 20 Además, el zcytor17lig se puede usar para detectar o dirigir sus receptores en ciertas patologías. Por ejemplo, los niveles elevados de IL-2 soluble en suero humano se han asociado a una gran diversidad de afecciones inflamatorias y neoplásicas, como infarto de miocardio, asma, miastenia grave, artritis reumatoidea, leucemia de células T aguda, linfomas de células B, leucemia linfocítica crónica, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de ovario (Heaney *et al*, *Blood* 87:847-857, 1996). De manera similar, el receptor de zcytor17 se eleva en monocitos activados y, en consecuencia, el receptor de zcytor17 y/o sus receptores solubles pueden estar asociados o servir como marcadores de 25 afecciones inflamatorias y neoplásicas relacionadas. El zcytor17lig, incluyendo los conjugados citotóxicos, se puede usar para detectar o dirigir dichos tejidos, y patologías.

30 Las moléculas de la presente invención tienen uso particular en el brazo de monocitos/macrófagos del sistema inmunitario. Se conocen los métodos que pueden evaluar dicha actividad. Por ejemplo, el interferón gamma (IFN γ) es un activador potente de los fagocitos mononucleares. Por ejemplo, un incremento en la expresión de zcytor17, tras la activación de células THP-1 (ATCC No. TIB-202) con interferón gamma, podría indicar que este receptor está implicado en la activación de los monocitos. Los monocitos son células incompletamente diferenciadas que migran hacia diversos tejidos, en los que maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos desempeñan una función 35 central en la respuesta inmunitaria, presentando抗ígenos a los linfocitos, y cumplen un papel de soporte como células accesorias, segregando numerosas citocinas. Los macrófagos pueden internalizar moléculas extracelulares y, tras la activación, tienen mayor capacidad de destruir microorganismos intracelulares y células tumorales. Los macrófagos activados también están implicados en la estimulación de la inflamación aguda o local. Asimismo, se ha demostrado que la función monocito-macrófago es anormal en una diversidad de patologías. Por ejemplo, véase Johnston, RB, 40 *New Eng. J. Med.* 318:747-752, 1998.

45 El experto en la técnica reconocería que los agonistas del receptor zcytor17, como zcytor17lig, son útiles. Por ejemplo, se ha relatado la disminución de la migración de monocitos en poblaciones con una predisposición a infecciones, por ejemplo en neonatos, pacientes que reciben corticosteroides u otras terapias inmunosupresoras, y pacientes con diabetes mellitus, quemaduras o sida. Los agonistas de zcytor17, como zcytor17lig, podrían provocar un aumento en la capacidad de los monocitos de migrar y posiblemente prevenir infecciones en estas poblaciones. Existe también un serio defecto de destrucción fagocítica por parte de fagocitos mononucleares de pacientes que padecen enfermedad granulomatosa crónica. Esto provoca la formación de abscesos subcutáneos, como también abscesos en el hígado, los pulmones, el bazo y los ganglios linfáticos. Un agonista del receptor zcytor17, tal como zcytor17lig, podría corregir 50 y mejorar este defecto fagocítico. A su vez, se ha relatado citotoxicidad de monocitos defectuosos en pacientes con cáncer y síndrome de Wiskott-Aldrich (eczema, trombocitopenia e infecciones recurrentes). La activación de monocitos por agonistas del receptor de zcytor17, como zcytor17lig, podría auxiliar en el tratamiento de estas afecciones. El sistema monocito-macrófago está predominantemente implicado en diversas enfermedades de almacenamiento de 55 lípidos (esfingolipidosis), como la enfermedad de Gaucher. La resistencia a infecciones puede estar afectada debido a un defecto en la función de los macrófagos, lo que podría tratarse con los agonistas del receptor zcytor17, como zcytor17lig.

60 Además, la persona con experiencia en la técnica reconocería que son útiles los antagonistas de zcytor17lig. Por ejemplo, en lesiones ateroscleróticas, una de las primeras anomalías es la localización de monocitos/macrófagos en células endoteliales. Estas lesiones podrían prevenirse con el uso de antagonistas de zcytor17lig. Los anticuerpos anti-zcytor17lig (p. ej., el anticuerpo neutralizador de zcytor17lig), los receptores zcytor17 solubles, los heterodímeros y multímeros, y las parejas de unión de zcytor17lig pueden también emplearse como antagonistas de zcytor17lig. Además, la leucemia monoblástica se asocia a una diversidad de anomalías clínicas que reflejan la liberación de los 65 productos biológicos del macrófago, por ejemplo, altos niveles de lisozima en el suero y la orina, y fiebre alta. Asimismo, dichas leucemias exhiben un incremento anormal de células monocíticas. Estos efectos posiblemente podrían prevenirse con los antagonistas de zcytor17lig, como se describe en la presente memoria. A su vez, el anti-zcytor17lig se puede conjugar a moléculas tales como restos tóxicos y citocinas, como se describe en este documento para dirigir la destrucción de células monocíticas de leucemia.

ES 2 310 660 T3

Usando los métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria, la persona con experiencia en la técnica podría evaluar fácilmente la actividad de los agonistas y antagonistas de zcytor17lig en las patologías aquí descritas, inflamación, enfermedades inmunitarias (p. ej., autoinmunitarias), cáncer o infecciones, como también otras patologías que implican células monocíticas. Además, ya que el zcytor17lig se expresa en un modo específico de 5 células T, macrófagos y monocitos, y dado que estas enfermedades implican anomalías en células monocíticas, como proliferación, función, localización y activación celular, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se pueden usar como diagnósticos para detectar dichas anomalías de las células monocíticas, e indicar la presencia de la enfermedad. Dichos métodos comprenden tomar una muestra biológica de un paciente, como sangre, 10 saliva o una biopsia, y compararla con una muestra control normal. Los métodos histológicos, citológicos, de citometría de flujo, bioquímicos y otros métodos se pueden usar para determinar los niveles relativos o la localización de zcytor17lig, o células que expresan zcytor17lig, es decir, monocitos, en la muestra del paciente comparada con el control normal. Un cambio en el nivel (aumento o disminución) de expresión de zcytor17lig, o un cambio en la cantidad 15 o localización de monocitos (p. ej., aumento o infiltración de células monocíticas en tejidos en los que normalmente no están presentes), en comparación con un control, serían indicativos de enfermedad. Dichos métodos diagnósticos pueden incluir además el uso de marcadores radiométricos, fluorescentes y colorimétricos fijados a los polinucleótidos, polipéptidos o anticuerpos de la presente invención. Dichos métodos se conocen en la técnica y se describen en este documento.

Las secuencias de aminoácidos que tienen actividad de zcytor17lig se pueden usar para modular el sistema inmunitario, uniéndose al receptor de zcytor17 y previniendo así la unión de zcytor17lig al receptor zcytor17lig endógeno. 20 Los antagonistas de zcytor17lig, como los anticuerpos anti-zcytor17lig, también se pueden usar para modular el sistema inmunitario, inhibiendo la unión de zcytor17lig al receptor zcytor17lig endógeno. Por consiguiente, la presente invención incluye el uso de proteínas, polipéptidos y péptidos que tienen actividad de zcytor17lig (por ejemplo, polipéptidos zcytor17lig, análogos de zcytor17lig (p. ej., anticuerpos anti-idiotípico anti-zcytor17lig) y proteínas de fusión a zcytor17lig) en sujetos que carecen de una cantidad adecuada de este polipéptido, o que producen un exceso de receptor o receptores que comprenden zcytor17. Los antagonistas de zcytor17 (p. ej., anticuerpos anti-Zcytor17) pueden 25 también utilizarse para tratar a un sujeto que produce un exceso de zcytor17lig o de receptor o receptores que comprenden zcytor17. Los sujetos adecuados incluyen mamíferos, por ejemplo seres humanos. Se ha demostrado que el zcytor17lig se expresa en células mononucleares activadas, y puede estar implicado en la regulación de la inflamación. 30 Como tales, los polipéptidos de la presente invención se pueden ensayar y usar por su capacidad de modificar la inflamación, o se pueden usar como marcadores de inflamación. Los métodos para determinar cualidades proinflamatorias y antinflamatorias de zcytor17lig se conocen en la técnica y se analizan en este documento. Además, pueden estar implicados en el aumento de la producción de reaccionantes de fase aguda, como amiloide A en suero (SAA), 35 al-antiquimiotripsina y haptoglobina, y la expresión del ligando receptor zcytor17 puede aumentar tras la inyección de lipopolisacáridos (LPS) *in vivo*, que están implicados en la respuesta inflamatoria (Dumontier, L. et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 97:10144-10149, 2000). La producción de proteínas de fase aguda, como SAA, se considera un mecanismo de supervivencia de corto plazo en donde la inflamación es beneficiosa; no obstante, el mantenimiento de proteínas de fase aguda por períodos más largos contribuye a inflamación crónica y puede ser perjudicial para la salud humana. 40 Para una revisión, véanse Uhlar, CM y Whitehead, AS. *Eur. J. Biochem.* 265:501-523, 1999, y Baumann H. y Gauldie, J. *Immunology Today* 15:74-80, 1994. A su vez, la proteína de fase aguda SAA está implicada en la patogenia de varias enfermedades inflamatorias crónicas, en la aterosclerosis y en la artritis reumatoidea, y es la precursora de la proteína amiloide A depositada en amiloidosis (Uhlar, CM y Whitehead, *supra*). Por lo tanto, en un ligando tal como zcytor17lig, que actúa como molécula proinflamatoria e induce la producción de SAA, los antagonistas serían útiles para tratar enfermedades inflamatorias y otras enfermedades asociadas a las proteínas de respuesta de fase aguda 45 inducidas por el ligando. Dichos antagonistas son provistos por la presente invención. Por ejemplo, un método para reducir las respuestas inflamatorias comprende administrar a un mamífero que padece inflamación, una cantidad de una composición de zcytor17lig, o un anticuerpo anti-zcytor17lig (p. ej., anticuerpo neutralizador) suficiente para reducir la inflamación. Además, un método para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero que padece inflamación 50 puede comprender: (1) determinar un nivel de proteína amiloide A en el suero; (2) administrar una composición que comprende un polipéptido zcytor17lig o un anticuerpo anti-zcytor17lig descrito en la presente memoria en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar un nivel pos-administración de la proteína amiloide A en suero; (4) comparar el nivel de proteína amiloide A en el suero de la etapa (1) con el nivel de proteína amiloide A en el suero de la etapa (3), en donde la falta de incremento o disminución del nivel de proteína amiloide A en el suero es indicativo 55 de supresión de respuesta inflamatoria.

Los receptores que se unen a zcytor17lig de la presente invención incluyen por lo menos una subunidad del receptor zcytor17. Un segundo polipéptido receptor incluido en el receptor soluble heterodimérico pertenece a la subfamilia de receptores e incluye subunidades del receptor de citocina de clase 1 y, más específicamente OSMRbeta y WSX-1. 60 Según la presente invención, además de un polipéptido receptor zcytor17 monomérico o heterodimérico, un receptor zcytor17 soluble heterodimérico, como se ejemplifica en la realización que comprende un receptor zcytor17 soluble + componente heterodimérico receptor soluble de Clase 1, como OSMRbeta o WSX-1, puede actuar como antagonista de zcytor17lig. Otras realizaciones incluyen receptores multiméricos solubles que comprenden zcytor17, como el receptor zcytor17 + componente multimérico receptor soluble de Clase I, como OSMRbeta y WSX-1.

Como el zcytor17lig, el análisis de distribución de tejido del mRNA correspondiente a su cDNA del receptor zcytor17 demostró que el nivel de mRNA fue el más alto en monocitos y células de próstata, y se eleva en monocitos activados y células CD4+ activadas, CD84-activadas y CD3+ activadas. En consecuencia, el receptor zcytor17 65 está también implicado en la inducción de respuestas inflamatorias e inmunitarias. Por lo tanto, las realizaciones

particulares de la presente invención se refieren al uso de anticuerpos zcytor17lig, y zcytor17lig, como también a heterodímeros del receptor soluble zcytor17, como antagonistas en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunitarias, por ejemplo pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), cáncer de páncreas, pancreatitis, enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria de los intestinos (IBD), enfermedad de Crohn, cáncer de colon e intestino, diverticulosis, 5 enfermedades autoinmunitarias, septicemia, trasplante de órganos o médula ósea; inflamación debida a traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad injerto contra hospedante; y en aquellas enfermedades o afecciones en las que tiene lugar la inhibición de inflamación, supresión inmunitaria, reducción de proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, células T (incluyendo células Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), supresión de respuesta inmunitaria a un patógeno o antígeno. Asimismo, la presencia del receptor zcytor17 y la expresión de zcytor17lig en células inmunitarias activadas, como CD3+ activada, monocitos, 10 células CD4+ y CD19+, demostró que el receptor zcytor17 puede estar implicado en las reacciones defensivas inmunitarias del organismo contra invasores extraños: como microorganismos y residuos celulares, y podría desempeñar una función en las respuestas inmunitarias durante la inflamación y la formación de cáncer. Como tales, el zcytor17lig y los anticuerpos de zcytor17lig de la presente invención, que son agonistas o antagonistas de la función del receptor 15 zcytor17, se pueden usar para modificar la respuesta inmunitaria y la inflamación.

Además, los polipéptidos zcytor17lig que se unen a los polipéptidos receptores de zcytor17, y a los anticuerpos allí contenidos, son útiles para:

20 1) Antagonizar o bloquear la señalización vía receptores que comprenden zcytor17 en el tratamiento de inflamación aguda, inflamación como consecuencia de un traumatismo, lesión de tejidos, cirugía, septicemia o infección, y enfermedades inflamatorias crónicas tales como asma, enfermedad inflamatoria de los intestinos (IBD), colitis crónicas, esplenomegalia, artritis reumatoidea, episodios inflamatorios agudos recurrentes (p. ej., tuberculosis) y tratamiento de amiloidosis, y aterosclerosis, enfermedad de Castleman, asma y otras enfermedades asociadas a la inducción de 25 respuesta de fase aguda.

2) Antagonizar o bloquear la señalización vía el receptor de los receptores zcytor17 en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como IDDM, esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (SLE), miastenia grave, artritis reumatoidea e IBD para prevenir o inhibir la señalización en células inmunitarias (p. ej., linfocitos, monocitos, leucocitos) vía el receptor zcytor17 (Hughes C *et al.*, *J. Immunol.* 153: 3319-3325, 1994). Alternativamente, 30 los anticuerpos, tales como los anticuerpos monoclonales (MAb) para zcytor17lig, también se pueden emplear como antagonistas para reducir células inmunitarias no deseadas a fin de tratar enfermedades autoinmunitarias. El asma, la alergia y otras enfermedades atópicas pueden tratarse con un MAb contra, por ejemplo, anticuerpos anti-zcytor17lig, receptores del receptor soluble zcytor17 o heterodímeros zcytor17/CRF2-4, para inhibir la respuesta inmunitaria o 35 reducir la cantidad de células ofensivas. El bloqueo o la inhibición de la señalización vía zcytor17, usando los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, también pueden beneficiar a enfermedades del páncreas, riñón, células neuronales y glándula pituitaria. Pueden beneficiarse la pancreatitis, IDDM, NIDDM y el carcinoma pancreático. El zcytor17 puede servir como diana para la terapia MAb del cáncer, en la que un MAb antagonista inhibe el desarrollo 40 del cáncer y direcciona la destrucción mediada por células inmunitarias. (Holliger P y Hoogenboom, H: *Nature Biotech.* 16:1015-1016, 1998). Los Mab para monómeros, homodímeros, heterodímeros y multímeros del receptor soluble zcytor17 pueden también ser útiles para tratar nefropatías tales como glomerulosclerosis, neuropatía membranosa, 45 amiloidosis (que también afecta al riñón y otros tejidos), arteriosclerosis renal, glomerulonefritis de diversos orígenes, enfermedades fibroproliferativas del riñón, además de disfunción renal asociada a SLE, EDDM, diabetes de tipo II (NIDDM), tumores renales y otras enfermedades.

45 3) Agonizar o iniciar la señalización vía los receptores zcytor17 en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como IDDM, MS, SLE, miastenia grave, artritis reumatoidea e IBD. El zcytor17lig puede señalizar linfocitos u otras células inmunitarias para diferenciar, alterar la proliferación o cambiar la producción de citocinas o proteínas de la superficie celular que mejoran la autoinmunidad. Específicamente, la modulación de una respuesta de linfocitos 50 T cooperadores a un patrón alterno de secreción de citocinas puede desviar una respuesta inmunitaria para mejorar la enfermedad (Smith JA *et al.*, *J. Immunol.* 160:4841-4849, 1998). De modo similar, el zcytor17lig se puede usar para señalizar, disminuir y desviar las células inmunitarias implicadas en asma, alergia y enfermedad atópica. La señalización vía el receptor zcytor17 puede además beneficiar a enfermedades del páncreas, el riñón, las células pituitarias y 55 neuronales. Pueden beneficiarse la pancreatitis, IDDM, NIDDM y el carcinoma de páncreas. El zcytor17 puede servir como una diana para la terapia con MAb del cáncer pancreático, en el que un MAb de señalización inhibe el desarrollo del cáncer y direcciona la destrucción mediada por células inmunitarias (Tutt, AL *et al.*, *J. Immunol.* 161: 3175-3185, 1998). De modo similar, las leucemias, linfomas, discrasias de células plasmáticas (p. ej., mieloma múltiple) y 60 carcinomas específicos de células T se pueden tratar con anticuerpos monoclonales (p. ej., anticuerpo neutralizador) para los receptores solubles que comprenden zcytor17 de la presente invención.

60 Los anticuerpos anti-zcytor17lig, polipéptidos monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos del receptor soluble zcytor17 descritos en la presente memoria se pueden usar para neutralizar/bloquear la actividad de ligando del receptor zcytor17 en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, enfermedad atópica, NIDDM, pancreatitis y disfunción renal, como se describió precedentemente. Se puede usar una forma soluble del receptor zcytor17 para promover una respuesta de anticuerpos mediada por células T y/o para promover la producción de IL-4 u otras citocinas por linfocitos u otras células inmunitarias.

ES 2 310 660 T3

Los anticuerpos anti-zcytor17lig, y los receptores solubles que comprenden zcytor17, son útiles como antagonistas de zcytor17lig. Dichos efectos antagónicos se pueden lograr por neutralización directa o unión de su ligando natural. Además de los usos antagónicos, los receptores solubles pueden unirse a zcytor17lig y actuar como portadores o proteínas portadoras, con el fin de transportar zcytor17lig hacia diferentes tejidos, órganos y células del organismo. Como tales, los receptores solubles se pueden condensar o acoplar a moléculas, polipéptidos o restos químicos que dirigen el complejo receptor soluble-ligando hacia un sitio específico, como un tejido, inmunocito específico, monocitos o tumores. Por ejemplo, en infección aguda o en algunos tipos de cáncer se pueden obtener beneficios de la inducción de las proteínas de respuesta de fase aguda local e inflamación. Por ende, los receptores solubles descritos aquí, o los anticuerpos de la presente invención, se pueden usar para dirigir específicamente la acción de un ligando de zcytor17lig proinflamatorio. Véanse, Cosman, D. *Cytokine* 5: 95-106, 1993; y Fernandez-Botran, R. *Exp. Opin. Invest Drugs* 9:497-513, 2000.

Asimismo, los receptores solubles se pueden usar para estabilizar el zcytor17lig, aumentar la biodisponibilidad, longevidad terapéutica y/o eficacia del ligando, estabilizando el ligando de degradación o aclaramiento, o direccionalizando el ligando hacia un sitio de acción dentro del organismo. Por ejemplo, el complejo IL-6 natural/IL-6R soluble estabiliza la IL-6 y puede señalizarse a través del receptor gp130. Véase, Cosman, D. *supra.*, y Fernandez-Botran, R. *supra*. Además, el Zcytor17 se puede combinar con un ligando análogo, como su ligando, para comprender un complejo ligando/receptor soluble. Dichos complejos pueden usarse para estimular respuestas de células que presentan una subunidad receptor acompañante. La especificidad celular de los complejos receptores zcytor17/zcytor17lig puede diferir de aquella observada en el ligando administrado solo. A su vez, los complejos pueden tener propiedades de farmacocinética diferentes, que pueden afectar la semivida, dosis/respuesta y especificidad de órganos y tejidos. Los complejos zcytor17/ligando pueden así tener actividad agonista para potenciar una respuesta inmunitaria o estimular células mesangiales, o estimular células hepáticas. Alternativamente, solamente los tejidos que expresan una subunidad de señalización que se heterodimeriza con el complejo pueden estar afectados en analogía a la respuesta a los complejos IL6/IL6R (Hirota H. *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 92:4862-4866, 1995; Hirano, T. en Thomason, A. (Ed.) "The Cytokine Handbook", 3^a Ed., p. 208-209). Los complejos receptor soluble/citocina para IL12 y CNTF exhiben actividades similares.

El zcyt017lig puede además usarse dentro de sistemas diagnósticos para detección de niveles circulantes de ligando, y en la detección de respuesta inflamatoria de fase aguda. Dentro de una realización relacionada, los anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente a zcyt017lig se pueden usar para detectar polipéptidos zcyt017lig circulantes; de forma inversa, se puede emplear zcyt017lig propiamente dicho para detectar polipéptidos receptores circulantes o que actúen localmente. Los niveles elevados o disminuidos de ligando o polipéptidos receptores pueden indicar patologías que incluyen inflamación o cáncer. A su vez, la detección de proteínas de fase aguda o moléculas tales como zcyt017lig puede ser indicativa de una afección inflamatoria crónica en determinados estados de enfermedad (p. ej., artritis reumatoidea). La detección de dichas afecciones sirve para ayudar a diagnosticar la enfermedad, como también para ayudar al médico a elegir el tratamiento correcto.

Los polipéptidos y las proteínas de la presente invención se pueden usar *ex vivo*, como en cultivo autólogo de médula. En síntesis, se extrae médula ósea de un paciente, antes de la quimioterapia o trasplante de órganos, y se trata con zcyt017lig, opcionalmente combinado con una o más de otras citocinas. La médula tratada se retorna al paciente después de la quimioterapia y se acelera la recuperación de la médula, o después del trasplante para suprimir la enfermedad de injerto contra hospedante. Además, las proteínas de la presente invención también se pueden usar para la expansión *ex vivo* de células progenitoras de sangre periférica o de médula ósea de monocitos/macrófagos. Antes del tratamiento, puede estimularse la médula con factor de células madre (SCF) para liberar células progenitoras tempranas hacia la circulación periférica. Estos progenitores se pueden extraer y concentrar de sangre periférica y luego tratarse en cultivo con zcyt017lig, opcionalmente en combinación con una o más de otras citocinas que incluyen, aunque sin limitarse a ellas, SCF, IL-2, IL-4, IL-7, Lif, IL-3, IL-12, IL-21 o IL-15, para diferenciarse y proliferarse en cultivos linfoideos de alta densidad, que pueden luego retornarse al paciente, tras la quimioterapia o el trasplante.

La presente invención proporciona un método de expansión de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas, que comprende cultivar células de médula o sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de zcyt017lig suficiente para producir un incremento en el número de células linfoideas de la médula ósea o de células de sangre periférica, en comparación con células de sangre periférica o médula ósea cultivadas en ausencia de zcyt017lig. En otras realizaciones, las células hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas son células linfoideas. En otra realización, las células linfoideas son linfocitos citolíticos naturales o células T citotóxicas. Asimismo, la composición puede también comprender por lo menos una otra citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-15, IL-4, Lif, IL-3, IL-12, IL-21, GM-CSF, ligando Flt3 y factor de células madre.

Alternativamente, el zcyt017lig puede activar el sistema inmunitario, lo que sería importante para reforzar la inmunidad a enfermedades infecciosas, tratar a pacientes inmunocomprometidos, como pacientes HIV+, pacientes de cáncer, o para mejorar las vacunas. En particular, la estimulación con zcyt017lig o la expansión de monocitos/macrófagos, células T, células B, linfocitos citolíticos naturales o sus progenitores aportaría valor terapéutico en el tratamiento de infecciones víricas y como factor antineoplásico. De forma similar, la estimulación con zcyt017lig de la respuesta inmunitaria contra agentes patógenos víricos y no víricos (por ejemplo bacterias, protozoos y hongos) aportaría valor terapéutico en el tratamiento de dichas infecciones, inhibiendo el desarrollo de tales agentes infecciosos. La determinación directa o indirecta de niveles de patógeno o antígeno, como células tumorales presentes en el organismo, se puede lograr mediante una serie de métodos conocidos en la técnica y descritos en esta memoria.

La presente invención incluye un método para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno, que comprende las etapas de: (1) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno presente en dicho mamífero; (2) administrar una composición que comprende un polipéptido zcytor17lig en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno en dicho mamífero; y (4) comparar el nivel de antígeno o patógeno de la etapa 1 con el nivel de antígeno o patógeno de la etapa 3, en donde un cambio en el nivel es indicativo de estimulación de una respuesta inmunitaria. En otra realización, la composición de zcytor17lig se vuelve a administrar. En otras realizaciones, el antígeno es un tumor de células B; un virus; un parásito o una bacteria.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno, que comprende: (1) determinar el nivel de anticuerpo específico del antígeno o patógeno; (2) administrar una composición que comprende un polipéptido zcytor17lig en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar un nivel pos-administración de anticuerpo específico del antígeno o patógeno; (4) comparar el nivel de anticuerpo de la etapa (1) con el nivel de anticuerpo de la etapa (3), en donde un incremento en el nivel de anticuerpo es indicativo de la estimulación de una respuesta inmunitaria.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos zcytor17lig son útiles dentro de aplicaciones en terapia génica, en donde se desea aumentar o inhibir la actividad de zcytor17lig. Si un mamífero tiene un gen zcytor17lig mutado o ausente, el gen zcytor17lig puede introducirse en las células del mamífero. En una realización, un gen que codifica un polipéptido zcytor17lig se introduce *in vivo* en un vector vírico. Dichos vectores incluyen un virus de DNA atenuado o defectuoso, por ejemplo, aunque sin limitación, virus herpes simple (HSV), papillomavirus, virus de Epstein Barr (EBV), adenovirus, virus adenoasociado (AAV) y similares. Se prefieren los virus defectuosos, que carecen completamente o casi completamente de genes víricos. Un virus defectuoso no es infectivo después de la introducción a una célula. El uso de vectores víricos defectuosos permite la administración a células en un área específica localizada, sin preocupación de que el virus pueda infectar a otras células. Los ejemplos de vectores particulares incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un vector del virus herpes simple I (HSV1) defectuoso (Kaplitt *et al.*, *Molec. Cell. Neurosci.* 2:320-30, 1991); un vector de adenovirus atenuado, como el vector descrito por Stratford-Perricaudet *et al.*, *J. Clin. Invest.* 90:626-30, 1992; y un vector del virus adenoasociado defectuoso (Samulski *et al.*, *J. Virol.* 61:3096-101, 1987; Samulski *et al.*, *J. Virol.* 63:3822-8, 1989).

Se puede introducir un gen zcytor17lig en un vector retrovírico, p. ej., como se describe en Anderson *et al.*, patente estadounidense No. 5.399.346; Mann *et al.*, *Cell* 33:153, 1983; Temin *et al.*, patente estadounidense No. 4.650.764; Temin *et al.*, patente estadounidense No. 4.980.289; Markowitz *et al.*, *J. Virol.* 62:1120, 1988; Temin *et al.*, patente estadounidense No. 5.124.263; publicación de patente internacional No. 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 introducirse por lipofección *in vivo*, usando liposomas. Los lípidos catiónicos sintéticos pueden usarse para preparar liposomas para 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 lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos *in vivo* tiene ciertas ventajas prácticas. El direccionamiento molecular de liposomas para células específicas representa un área de beneficio. Más particularmente, dirigir la transfección a células particulares representa un área de beneficio. Por ejemplo, dirigir la transfección a tipos de células particulares sería particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, como el sistema inmunitario, páncreas, hígado, riñón y cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas para los fines de direccionamiento. Los péptidos dirigidos (p. ej., hormonas o neurotransmisores), proteínas como anticuerpos, o moléculas no peptídicas pueden acoplarse químicamente a liposomas.

Es posible eliminar las células diana del organismo; introducir el vector como plásmido de DNA desnudo; y luego reimplantar las células transformadas en el organismo. Los vectores de DNA desnudos para terapia génica pueden introducirse en las células hospedantes deseadas por métodos conocidos en la técnica, p. ej., transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación de fosfato cálcico, uso de un gen gun o uso de un transportador del vector de DNA. Véanse, p. ej., Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:963-7, 1992; Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263:14621-4, 1988.

Se puede emplear metodología antisentido para inhibir la transcripción del gen zcytor17lig, como para inhibir la proliferación celular *in vivo*. Los polinucleótidos que son complementarios a un segmento de un polinucleótido que codifica zcytor17lig (p. ej., un polinucleótido tal como se expone en la SEC ID NO: 1) están diseñados para unirse a mRNA que codifica zcytor17lig y para inhibir la traducción de dicho mRNA. Dichos polinucleótidos antisentido se usan para inhibir la expresión de genes que codifican el polipéptido zcytor17lig en cultivo celular o en un sujeto.

Pueden también generarse ratones genomanipulados para expresar el gen zcytor17lig, denominados "ratones transgénicos", y los ratones que exhiben una ausencia completa de la función del gen zcytor17lig, denominados "ratones con genes inactivados" (Snouwaert *et al.*, *Science* 257:1083, 1992; Lowell *et al.*, *Nature* 366:740-42, 1993; Capecchi, M.R., *Science* 244:1288-1292, 1989; Palmiter, R.D. *et al.*, *Annu Rev Genet.* 20: 465-499, 1986). Por ejemplo, los ratones transgénicos que sobreexpresan zcytor17lig, o bien en forma ubicua o bajo un promotor específico de tejido o restringido a tejido, pueden usarse para averiguar si la sobreexpresión causa un fenotipo. Por ejemplo, la sobreexpresión del polipéptido zcytor17lig natural, el fragmento de polipéptido o su mutante, puede alterar los procesos celulares normales, dando como resultado un fenotipo que identifica un tejido en el que la expresión de zcytor17lig es funcionalmente relevante y puede indicar una diana terapéutica para el zcytor17lig, sus agonistas o antagonistas. Por ejemplo,

un ratón transgénico preferido para genomanipular es uno que sobreexpresa el zcytor17lig (residuos aminoácido 23-164 de la SEC ID NO: 2; o 24-163 de la SEC ID NO: 11). Además, dicha sobreexpresión puede resultar en un fenotipo que muestre similitud con enfermedades humanas. De forma similar, los ratones con genes inactivados zcytor17lig se pueden usar para determinar si zcytor17lig es absolutamente necesario *in vivo*. El fenotipo de ratones con genes inactivados es predictivo de los efectos *in vivo* que puede tener ese antagonista de zcytor17lig, como los descritos en la presente memoria. El cDNA de zcytor17lig humano o de ratón descrito en el presente documento se puede usar para generar ratones con genes inactivados. Estos ratones pueden emplearse para estudiar el gen zcytor17lig y la proteína codificada allí en un sistema *in vivo*, y se pueden usar como modelos *in vivo* para las correspondientes enfermedades humanas. A su vez, la expresión en ratones transgénicos de polinucleótidos zcytor17lig antisentido o ribosomas dirigidos contra zcytor17lig, descritos aquí, se puede usar análogamente a los ratones transgénicos anteriormente descritos. Se pueden realizar estudios por administración de la proteína zcytor17lig purificada.

Los datos experimentales indican una función del zcytor17lig en la progresión de enfermedades que implican la piel o el epitelio de superficies internas, por ejemplo, intestino grueso, intestino delgado, páncreas, pulmón, próstata, útero y similares. Primero, como se describe en la presente invención, los receptores zcytor17, incluyendo el receptor OSM y beta, y zcytor17, se expresan en varios tipos de células ubicados en superficies epiteliales, incluyendo líneas celulares derivadas de epitelio pulmonar, fibroblasto pulmonar, próstata, colon, mama, epitelio de hígado, epitelio de hueso y piel, fibroblasto óseo y similares. A su vez, como se describe en esta memoria, los ejemplos de cada uno de estos tipos de células también respondieron a la activación de zcytor17lig de un constructo indicador STAT. Además, varias líneas celulares respondieron a la estimulación de zcytor17lig, produciendo niveles mayores de IL-6, IL-8, MCP-1 (un factor quimiotáctico), como se describe en la presente memoria. En total, estos datos indican una función de zcytor17lig en enfermedades que implican el epitelio, como por ejemplo dermatitis atópica; dermatitis; psoriasis; artritis psoriásica; eczema; gingivitis; enfermedad periodontal; enfermedad inflamatoria de los intestinos (IBD) (p. ej., colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn); trastornos reproductivos, como por ejemplo displasia cervical, cáncer cervical; otras enfermedades de la piel como cáncer: sarcomas; carcinomas; melanoma, etc. es decir, no solo enfermedades inflamatorias, ya que el sistema inmunitario está implicado en la activación/cura de distintos tipos de cáncer; enfermedades que implican la disfunción de barrera, como por ejemplo la enfermedad injerto contra hospedante (GVHD) y el síndrome de intestino irritable (IBS); y enfermedades que implican el epitelio pulmonar, como asma, enfisema y similares. Asimismo, la liberación de citocinas IL-6, IL-8 y MCP-1 por las células expuestas a zcytor17lig indica que zcytor17lig está implicado en la inflamación. Por lo tanto, la regulación de zcytor17lig puede ser útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias o cancerosas asociadas con los tejidos que expresan el receptor. Estas enfermedades incluyen, por ejemplo, prostatitis, hepatitis, artrosis y similares. El zcytor17lig puede regular positiva o negativamente, directa o indirectamente, estas enfermedades. En consecuencia, la administración de zcytor17lig se puede usar para tratar las enfermedades descritas aquí, directamente o con moléculas que inhiben la actividad de zcytor17lig, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales para zcytor17lig o anticuerpos monoclonales para zcytor17, o anticuerpos monoclonales que reconocen el beta complejo receptor de OSM y zcytor17.

Los datos indican que el zcytor17lig podría estar implicado en la regulación de enfermedades mediadas por células T TH2. Primero, el zcytor17lig está formado por el subconjunto TH2 de células T activadas. Las células TH2 expresan más zcytor17lig que las células TH1. Además, se estimularon por lo menos dos líneas celulares del epitelio pulmonar (SK-LU-1, A549) para aumentar alfa-2 mRNA de IL-13 en respuesta a la estimulación del ligando de zcytor17, como se describe en esta memoria. Existe una asociación de la cadena de alfa2 del receptor de IL-13 y la tumorigenidad de tumores pancreáticos y de mama humanos. Esto indica que el zcytor17lig puede desempeñar una función en la regulación de la tumorigenidad de estos tipos de cáncer, como también otros tipos de cáncer. Por lo tanto, la administración de un antagonista de zcytor17lig o el uso directo de zcytor17lig pueden ser útiles en el tratamiento de estos tipos de cáncer, benignos o malignos y de diferentes grados (grados I-IV) y estadios (p. ej., métodos TNM o AJC) de desarrollo de tumores, en mamíferos, preferiblemente en seres humanos.

Se conoce en la técnica que la IL-13 está implicada en la generación de células TH2 activadas y en enfermedades mediadas por TH2, como asma, dermatitis atópica y similares. El zcytor17lig o los antagonistas de zcytor17lig pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades que implican células T TH2. Esto incluiría enfermedades tales como, por ejemplo, dermatitis atópica, asma, como también otras enfermedades exacerbadas por células TH2 activadas. La implicación de zcytor17lig en enfermedades, como por ejemplo la dermatitis atópica, está también soportada por el fenotipo de los ratones transgénicos que sobreexpresan zcytor17lig y presentan síntomas de dermatitis atópica, como se describe aquí.

A pesar de la expresión diferencial de zcytor17lig por las células TH2, existe incluso cierta expresión de zcytor17lig en células TH1 y en células T CD8+. Por lo tanto, el zcytor17lig o sus antagonistas pueden ser útiles para tratar enfermedades que implican inmunomodulación de células T activadas, por ejemplo, infección vírica, cáncer, rechazo de injertos y similares.

El zcytor17lig puede también estar implicado en el desarrollo del cáncer. Hay expresión del zcytor17 y de los beta-receptores del receptor OSM en osteosarcoma de fibroblastos óseos de seres humanos, melanoma de fibroblastos de piel de seres humanos, carcinoma epitelial de colon, adenocarcinoma, adenocarcinoma epitelial de mama, adenosarcoma epitelial de próstata y adenocarcinoma epitelial de pulmón, y carcinoma. Por ende, puede ser útil tratar tumores de origen epitelial con zcytor17lig, sus fragmentos, o con antagonistas de zcytor17lig que incluyen, aunque sin limitarse a ello, carcinoma, adenocarcinoma y melanoma. Sin perjuicio de ello, se puede usar zcytor17lig o un antagonista de zcytor17lig para tratar cáncer, o reducir uno o más de los síntomas de un cáncer, desde cáncer que incluye, aunque

sin limitarse a ello, carcinoma de células escamosas o epidermoides, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma papilar, citadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células transicionales, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor maligno mixto de origen en las glándulas salivales, tumor de Wilms, teratoma inmaduro, teratocarcinoma y otros tumores 5 que comprenden por lo menos algunas células de origen epitelial.

En general, la dosis del polipéptido zcytor17lig (o proteína de fusión o análogo de zcytor17) administrado variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la estatura, el sexo y la condición médica general y la historia 10 clínica del paciente. Típicamente, es conveniente proporcionar al receptor una dosis del polipéptido zcytor17lig que esté en el intervalo de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque también se puede administrar una dosis inferior o superior, según lo impongan las circunstancias. El experto en la técnica puede determinar fácilmente dichas dosis y los ajustes a la misma, usando métodos conocidos en la técnica.

La administración de un polipéptido zcytor17lig a un sujeto puede ser tópica, por inhalación, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, por perfusión a través de un catéter regional, 15 o por inyección intralesional directa. Cuando se administren proteínas terapéuticas por inyección, la administración podrá ser por infusión continua o por una o varias inyecciones intravenosas rápidas.

Otras rutas de administración incluyen la vía oral, mucosa-membrana, pulmonar y transcutánea. La administración 20 oral es adecuada para microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas proteinoides, microesferas de policianoacrilato y sistemas a base de lípidos (véanse, por ejemplo, DiBase y Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins", en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). La factibilidad de una administración intranasal se ejemplifica por un modo de administración tal como el de la insulina (véase, por ejemplo, Hinchcliffe y Illum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:199 (1999)). Las partículas secas o líquidas que comprenden Zcytor17lig se pueden preparar e inhalar con la ayuda de dispersadores de polvo, generadores 25 de aerosol líquidos o nebulizadores (p. ej., Pettit y Gombotz, TIBTECH 76:343 (1998); Patton *et al.*, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 35:235 (1999)). Este planteamiento se ilustra mediante el sistema de administración para diabetes AERX, que es un inhalador electrónico manual que suministra insulina en aerosol a los pulmones. Los estudios han demostrado que 30 las proteínas tan grandes como de 48.000 kDa se han administrado a través de la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonido de bajo frecuencia, que ilustra la factibilidad de la administración transcutánea (Mitragotri *et al.*, *Science* 269:850 (1995)). La administración transdérmica, que usa electroporación, provee otro medio para administrar una molécula que tenga actividad de unión a Zcytor17lig (Potts *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10:213 (1997)).

Se puede formular una composición farmacéutica que comprenda una proteína, polipéptido o péptido que tenga 35 actividad de unión a Zcytor17lig, según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en las que las proteínas terapéuticas se combinan con una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. La solución salina estéril tampionada con fosfato es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente 40 aceptable. Otros vehículos adecuados se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19a Edición (Mack Publishing Company 1995).

Para propósitos terapéuticos, las moléculas que tienen actividad de unión a Zcytor17lig y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una combinación 45 de una proteína, polipéptido o péptido que tiene actividad de unión a Zcytor17lig y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran en una "cantidad terapéuticamente eficaz", si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente utilizado para tratar la inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia por lo menos una porción de la respuesta inflamatoria.

Una composición farmacéutica que comprende Zcytor17lig (o una proteína de fusión o análogo de Zcytor17lig) se 50 puede suministrar en forma líquida, en aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran mediante soluciones inyectables, aerosoles, gotitas, soluciones topológicas y suspensiones orales. Las formas sólidas ilustrativas incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. Esta última forma se ilustra 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 (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer *et al.*, "Protein Delivery with Infusion Pumps", en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), 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 (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)). Otras formas sólidas incluyen cremas, pastas, 55 otras aplicaciones topológicas y similares.

Los liposomas proporcionan un medio para suministrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto por vía intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea o por administración oral, inhalación o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas de lípidos que rodean compartimentos 60 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 (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas son similares en composición a las membranas celulares y, como consecuencia, los liposomas se pueden administrar de modo seguro y son biodegradables. Dependiendo del método de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y los 65

liposomas pueden variar en tamaño con diámetros que oscilan entre $0,02 \mu\text{m}$ a más de $10 \mu\text{m}$. Se puede encapsular en liposomas una diversidad de agentes: partición de agentes hidrófobos en las bicapas y agentes hidrófilos dentro del espacio(s) acuoso interno (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 de los liposomas, el número de bicapas, la composición de lípidos, como también las características de carga y superficie de los liposomas.

Los liposomas pueden adsorberse prácticamente por cualquier tipo de célula y luego liberar lentamente el agente encapsulado. Alternativamente, un liposoma absorbido puede ser endocitado por las células que son fagocíticas. La endocitosis es seguida por degradación intralisosomal de lípidos liposomales y liberación de los agentes encapsulados (Scherphof *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). Después de la administración intravenosa, los liposomas pequeños ($0,1$ a $1,0 \mu\text{m}$) típicamente son absorbidos por las células del sistema reticuloendotelial, ubicado principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas más grandes que $3,0 \mu\text{m}$ se depositan en el pulmón. Esta absorción preferencial de liposomas más pequeños por las células del sistema reticuloendotelial se ha utilizado para suministrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos y a tumores del hígado.

El sistema reticuloendotelial se puede circunvenir por varios métodos, que incluyen saturación con grandes dosis de partículas de liposomas, o inactivación selectiva de macrófagos por medios farmacológicos (Claassen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 802:428 (1984)). A su vez, la incorporación de fosfolípidos derivatizados con glucolípidos o polietilenglicol a las membranas de liposomas ha demostrado producir una reducción importante de la absorción por parte del sistema reticuloendotelial (Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1068: 133 (1991); Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Los liposomas se pueden preparar también para dirigir células u órganos particulares, variando la composición de fosfolípidos o insertando receptores o ligandos a los liposomas. Por ejemplo, los liposomas, preparados con un alto contenido de un tensioactivo no iónico, se han utilizado para dirigir el hígado (Hayakawa *et al.*, patente japonesa 04-244.018; Kato *et al.*, *Biol. Pharm. Bull* 16:960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja, α -tocoferol y aceite de ricino hidrogenado y etoxilado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla a vacío, y luego reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha demostrado que una formulación liposomal de dipalmiloifosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) dirige el hígado (Shimizu *et al.*, *Biol. Pharm. Bull* 20:881 (1997)).

Alternativamente, se pueden unir diversos ligandos diana a la superficie del liposoma, como por ejemplo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, carbohidratos, vitamina y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas se pueden modificar con derivados de galactosil-lípidos de tipo ramificado para dirigir receptores de asialoglucoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente en la superficie de las células hepáticas (Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287 (1997); Murahashi *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). De modo similar, Wu *et al.*, *Hepatology* 27:772 (1998), han demostrado que el marcado de liposomas con asialofetuinina condujo a una semivida en plasma acortada y potenció en gran medida la absorción de los liposomas marcados con asialofetuinina por los hepatocitos. Por otra parte, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galactosil-lípidos de tipo ramificados se puede inhibir por preinyección de asialofetuinina (Murahashi *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Los liposomas de albúmina de suero humano poliaconitilado proveen otro planteamiento para dirigir liposomas hacia las células hepáticas (Kamps *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:11681 (1997)). Además, Geho, *et al.* patente estadounidense No. 4.603.044, describen un sistema de administración de vesículas de liposomas dirigido a los hepatocitos, que tiene especificidad para receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.

En un planteamiento más general para el direccionamiento de tejido, las células diana se premarcan con anticuerpos biotinilados específicos de un ligando expresado por la célula diana (Harasym *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)). Después de la eliminación en el plasma del anticuerpo libre, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otro planteamiento, los anticuerpos diana se dirigen directamente adheridos a los liposomas (Harasym *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99(1998)).

Los polipéptidos que tienen actividad de unión a Zcytor17lig se pueden encapsular dentro de liposomas usando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas (véanse, por ejemplo, Anderson *et al.*, *Infect. Immun.* 31:1099 (1981), Anderson *et al.*, *Cancer Res.* 50:1853 (1990), y 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. m, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef *et al.*, *Meth. Enzymol* 149: 124 (1987)). Como se observó anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener una diversidad de componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados de lípidos de polietilenglicol (Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Las microesferas de polímeros degradables se han diseñado para mantener altos niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables tales como poli(láctido-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli (ortoésteres), polímeros de etilvinilacetato no degradables, en los que las proteínas están atrapadas en el polímero (Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery", en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), 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 (eds.), 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 (véase, por ejemplo, Gref *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10:167 (1997)).

5

La presente invención también contempla polipéptidos químicamente modificados que tienen actividad de zcytor17lig, como un polipéptido zcytor17lig, agonistas de zcytor17lig y antagonistas de Zcytor17lig, por ejemplo anticuerpos anti-zcytor17lig, en donde un polipéptido se une a un polímero, como se analizó anteriormente.

10 El experto en la técnica puede contemplar otras formas de dosificación, como se muestra, por ejemplo, por Ansel y Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5^{ta} Edición (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19^a Edición (Mack Publishing Company 1995), y por Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

15 Como ilustración, las composiciones farmacéuticas pueden ser provistas como un kit que comprende un envase que contiene un polipéptido zcytor17lig o un antagonista de zcytor17lig (p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un polipéptido Zcytor17lig).

20 Los polipéptidos terapéuticos pueden proporcionarse en la forma de una solución inyectable para una o múltiples dosis, o como un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Alternativamente, dicho kit puede incluir un dispersador de polvo seco, un generador de aerosol líquido o un nebulizador para administración de un polipéptido terapéutico. Dicho kit puede además comprender información escrita sobre las indicaciones de uso de la composición farmacéutica. A su vez, dicha información puede incluir un enunciado de que la composición de Zcytor17lig está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida a Zcytor17lig.

25 Un aspecto de la presente invención provee un polipéptido aislado que comprende una secuencia de residuos aminoácidos que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de los residuos aminoácido seleccionados del grupo que consiste en: (a) el polipéptido que se muestra a partir de los residuos 38 (Val) a 152 (Leu), como se muestra en la SEC ID NO: 2; (b) el polipéptido que se muestra a partir de los residuos 27 (Leu) a 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2; (c) el polipéptido que se muestra a partir de los residuos 24 (Thr) a 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2; y (d) el polipéptido que se muestra a partir de los residuos 1 (Met) a 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2. En una realización, el polipéptido aislado es como se describió anteriormente, en donde los residuos aminoácido 73, 133 y 147 son cisteína. En otra realización, el polipéptido aislado es como se describió anteriormente, en donde el polipéptido se une al receptor de zcytor17, como se muestra en la SEC ID NO: 5 o en la SEC ID NO: 71. 30 En otra realización, el polipéptido aislado comprende por lo menos 14 residuos aminoácido contiguos de la SEC NO: 2 o de la SEC NO: 11. En otra realización, el polipéptido aislado es como se describió anteriormente, en donde los residuos aminoácido se seleccionan del grupo que consiste en: (a) los residuos aminoácido 38-52 de la SEC ID NO: 2; (b) los residuos aminoácido 83-98 de la SEC ID NO: 2; (c) los residuos aminoácido 104-117 de la SEC ID NO: 2; y (d) los residuos aminoácido 137-152 de la SEC ID NO: 2.

35 40 Dentro de un segundo aspecto de la presente invención, se provee una proteína de fusión que comprende por lo menos cuatro polipéptidos, en donde el orden de los polipéptidos desde el término N hasta el término C es: un primer polipéptido que comprende una secuencia de 38-52 residuos aminoácido de la SEC ID NO: 2; un primer espaciador de 6-27 residuos aminoácido; un segundo polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: (a) residuos aminoácido de hélice B de IL-2 de la SEC ID NO: 168; (b) residuos 65-83 de hélice B de IL-4 de la SEC ID NO: 164; (c) residuos 73-86 de hélice B de IL-4 de la SEC ID NO: 102; (d) residuos 72-81 de hélice B de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y (e) residuos aminoácido 83-98 de la SEC ID NO: 2; un segundo espaciador de 5-11 residuos aminoácido; un tercer polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: (a) los residuos 102-116 de hélice C de IL-2 de la SEC ID NO: 162; (b) los residuos 94-118 de hélice C de IL-4 de la SEC ID NO: 164; (c) los residuos 91-103 de hélice C de IL-3 de la SEC ID NO: 102; (d) los residuos 85-103 de hélice C de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y (e) los residuos aminoácido 104-117 de la SEC ID NO: 2; un tercer espaciador de 3-29 residuos aminoácido; y un cuarto polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: (a) los residuos 134-149 de hélice D de IL-2 de la SEC ID NO: 162; (b) los residuos 123-141 de hélice D de IL-3 de la SEC ID NO: 102; (c) los residuos 133-151 de hélice D de IL-4 de la SEC ID NO: 164; (d) los residuos 120-131 de hélice D de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y (e) los residuos aminoácido 137-152 de la SEC ID NO: 2.

45 50 55 En un tercer aspecto de la presente invención se provee una proteína de fusión que comprende por lo menos cuatro polipéptidos, en donde el orden de los polipéptidos desde el término N hasta el término C son: un primer polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: (a) los residuos 27-48 de hélice A de IL-2 de la SEC ID NO: 162; (b) los residuos 30-42 de hélice A de IL-4 de la SEC ID NO: 164; (c) los residuos 35-45 de hélice A de IL-3 de la SEC ID NO: 102; (d) los residuos 30-44 de hélice A de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y (e) los residuos aminoácido 38-52 de la SEC ID NO: 2; un primer espaciador de 6-27 residuos aminoácido; un segundo polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: (a) los residuos aminoácido de hélice B de IL-2 de la SEC NO: 168; (b) los residuos 65-83 de hélice B de IL-4 de la SEC ID NO: 164; (c) los residuos 73-86 de hélice B de IL-3 de la SEC ID NO: 102; (d) los residuos 72-81 de hélice B de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y (e) los residuos aminoácido 83-98 de la SEC ID NO: 2; un segundo espaciador de 5-11 residuos aminoácido; un tercer polipéptido que comprende una secuencia de residuos

aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: (a) los residuos 102-116 de hélice C de IL-2 de la SEC ID NO: 162; (b) los residuos 94-118 de hélice C de IL-4 de la SEC ID NO: 164; (c) los residuos 91-103 de hélice C de IL-3 de la SEC ID NO: 102; (d) los residuos 85-103 de hélice C de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y (e) los residuos aminoácido 104-117 de la SEC ID NO: 2; un tercer espaciador de 3-29 residuos aminoácido; y un cuarto polipéptido 5 que comprende una secuencia de 137-152 residuos aminoácido de la SEC ID NO: 2. En otra realización, la proteína de fusión es como se describió anteriormente, en donde el cuarto polipéptido comprende los residuos aminoácido 137-152 de la SEC ID NO: 2.

En otro aspecto de la presente invención, se provee una molécula de polinucleótidos aislada que comprende una 10 secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido ya descrito. En una realización, el polinucleótido aislado es como se describió anteriormente, en donde los nucleótidos se seleccionan del grupo que consiste en: (a) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID NO: 1 del nucleótido 139 al nucleótido 483; (b) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID NO: 1 del nucleótido 106 al nucleótido 519; (c) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID NO: 1 del nucleótido 97 al nucleótido 519; y (d) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID NO: 1 del nucleótido 28 al 15 nucleótido 519.

En otro aspecto de la presente invención, se provee una molécula de polinucleótidos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido descrito en esta memoria.

20 En otro aspecto de la presente invención, se provee un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente unidos: (a) un promotor de transcripción; (b) un segmento de DNA que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: (i) los residuos aminoácido 38-52 de la SEC ID NO: 2; (ii) los residuos aminoácido 83-98 de la SEC ID NO: 2; (iii) los residuos aminoácido 104-117 de la SEC ID NO: 2; (iv) los residuos aminoácido 137-152 de la SEC ID NO: 2; y (v) sus combinaciones; y (c) 25 un terminador de transcripción.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente unidos: (a) un promotor de transcripción; (b) un segmento de DNA que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido que es por lo menos 90% idéntica a los residuos 38 (Val) a 152 (Leu), como se muestra en la SEC ID NO: 2; y (c) un terminador de transcripción. En una realización, el vector de expresión es como se describió anteriormente, que comprende los siguientes elementos operativamente unidos: (a) un promotor de transcripción; (b) un segmento de DNA que codifica un polipéptido que comprende los residuos aminoácido 38 (Val) a 152 (Leu) de la SEC ID NO: 2; y (c) un terminador de transcripción.

35 En otro aspecto de la presente invención, se provee una célula cultivada que comprende el vector de expresión anteriormente descrito.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un método para producir una proteína, que comprende: cultivar 40 una célula como la anteriormente descrita bajo condiciones en las que se exprese el segmento de DNA; y recuperar la proteína codificada por el segmento de DNA.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un método para producir un anticuerpo para un polipéptido ccytor17lig, que comprende; inocular a un animal con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polipéptido que consiste en 9 a 141 aminoácidos, en donde el polipéptido es idéntico a una secuencia contigua de 45 residuos aminoácido en la SEC ID NO: 2 del número de aminoácido 24 (Ser) al número de aminoácido 164 (Thr); un polipéptido como el anteriormente descrito; (c) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 de los aminoácidos número 38-52; (d) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 de los aminoácidos de número 83-98; (e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 de los aminoácidos numero 104-117; (f) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de 50 la SEC ID NO: 2 de los aminoácidos número 137-152; (g) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 de los aminoácidos número 38-152; (h) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 de los aminoácidos número 24-164; (c) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 de los aminoácidos número 38-52; (d) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 de los aminoácidos número 85-98; (e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 de los aminoácidos número 104-118; (f) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 de los aminoácidos número 141-157; (g) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 de los aminoácidos número 38-157; (h) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 de los aminoácidos número 24-163; (i) un polipéptido que comprende un epítopo antigenético de acuerdo con un perfil de hidrofilicidad de Hopp/Woods de la SEC ID NO: 2 o 55 la SEC I NO 11, en donde el perfil se basa en una ventana deslizante de seis residuos. Los residuos G, S y T enterrados y los residuos H, Y y W expuestos se ignoraron; y en donde el polipéptido produce una respuesta inmunitaria en el animal para producir el anticuerpo; y aislar el anticuerpo del animal.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un anticuerpo (p. ej, un anticuerpo neutralizador) producido 60 por el método anteriormente descrito, en el que el anticuerpo se une a un polipéptido de la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 11. En una realización, el anticuerpo descrito anteriormente se une a un polipéptido que se muestra en la SEC ID NO: 2 o en la SEC ID NO: 11.

ES 2 310 660 T3

En otro aspecto de la presente invención, se provee un método para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno, que comprende las etapas de: (1) determinar, directa o indirectamente, el nivel de antígeno o patógeno presente en dicho mamífero; (2) administrar una composición que comprende el polipéptido zcytor17lig en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar, directa o indirectamente, el nivel 5 de antígeno o patógeno en dicho mamífero; y (4) comparar el nivel de antígeno o patógeno de la etapa 1 con el nivel de antígeno o patógeno de la etapa 3, en donde un cambio en el nivel es indicativo de la estimulación de una respuesta inmunitaria. En una realización, el método para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero ya descrito, comprende además: (5) re-administrar una composición que comprende el polipéptido zcytor17lig en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (6) determinar, directa o indirectamente, el nivel de antígeno o patógeno en 10 dicho mamífero; y; (7) comparar el nivel de antígeno o patógeno en la etapa 1 con el nivel de antígeno en la etapa 6, en donde un cambio en el nivel es indicativo de la estimulación de una respuesta inmunitaria.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un método para expansión de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas, que comprende cultivar células de sangre periférica o médula ósea con una 15 composición que comprende una cantidad de zcytor17lig suficiente para producir un incremento en el número de células linfoides en las células de sangre periférica o médula ósea, según lo comparado con las células de sangre periférica o médula ósea cultivadas en ausencia de zcytor17lig. En una realización, el método para expansión de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es tal como se describió anteriormente, en donde las células hematopoyéticas y los progenitores de células hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, el 20 método para expansión de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es tal como se describió anteriormente, en donde las células linfoides son células monocíticas, macrófagos o células T.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un método para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno, que comprende: (1) determinar el nivel de un anticuerpo específico de 25 antígenos o patógenos; (2) administrar una composición que comprende el polipéptido zcytor17lig en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar un nivel pos-administración del anticuerpo específico de antígenos o patógenos; (4) comparar el nivel de anticuerpo de la etapa (1) con el nivel de anticuerpo de la etapa (3), en donde un incremento en el nivel de anticuerpo es indicativo de estimulación de una respuesta inmunitaria.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un método para detectar la presencia de ARN de zcytor17lig en 30 una muestra biológica, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una sonda de ácido nucleico de zcytor17lig bajo condiciones hibridantes con (i) moléculas de RNA de ensayo aisladas de la muestra biológica, o (ii) moléculas de ácido nucleico sintetizadas de las moléculas de RNA aisladas, en donde la sonda tiene una secuencia de nucleótidos que comprende o bien una porción de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico anteriormente 35 descrita, o su complemento, y (b) detectar la formación de híbridos de la sonda de ácido nucleico y las moléculas de RNA de ensayo o las moléculas de ácido nucleico sintetizadas, en donde la presencia de híbridos indica la presencia de RNA de zcytor17lig en la muestra biológica.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un método para detectar la presencia de zcytor17lig en una 40 muestra biológica, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo como se describió anteriormente, en donde el contacto se realiza bajo condiciones que permiten la unión del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo a la muestra biológica, y (b) detectar cualquiera del anticuerpo unido o el fragmento de anticuerpo unido.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para destruir células cancerosas, que comprende obtener 45 un tejido o muestra biológica *ex vivo*, que contiene las células cancerosas de un paciente, o identificar las células cancerosas *in vivo*; producir un polipéptido por el método descrito en la presente memoria; formular el polipéptido en un vehículo farmacéuticamente aceptable; y administrar al paciente o exponer las células cancerosas al polipéptido; en donde el polipéptido destruye las células. En una realización, el método para destruir las células cancerosas es 50 como se describió anteriormente, en donde el polipéptido se conjuga además a una toxina. En una realización, el anticuerpo es como se describió anteriormente, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: (a) anticuerpo policlonal, (b) anticuerpo monoclonal murino, (c) anticuerpo humanizado derivado de (b), (d) fragmento de anticuerpo, y (e) anticuerpo monoclonal humano.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente 55 a un polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: (a) el polipéptido que se muestra desde los residuos 38 (Val) a 152 (Leu), como se muestra en la SEC ID NO: 2; (b) el polipéptido que se muestra desde los residuos 27 (Leu) a 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2; (c) el polipéptido que se muestra desde los residuos 24 (Thr) a 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2; y (d) el polipéptido que se muestra desde los residuos 1 (Met) a 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2. En otra realización, el anticuerpo es como se describió anteriormente, en donde el anticuerpo comprende además 60 un radionúcleo, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimiluminiscente, marcador peptídico, partícula magnética, fármaco o toxina.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para inhibir la proliferación o diferenciación inducida por 65 zcytor17lig de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas, que comprende cultivar células de sangre periférica o médula ósea con una composición que comprende una cantidad de un anticuerpo descrito precedentemente, suficiente para reducir la proliferación o diferenciación de las células hematopoyéticas en las células de

sangre periférica o médula ósea, en comparación con células de sangre periférica o médula ósea cultivadas en ausencia del receptor soluble de citocina. En una realización, el método para inhibir la proliferación o diferenciación inducida por zcyt17lig de las células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es el anteriormente descrito, en donde las células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, el método para inhibir la proliferación o diferenciación inducida por zcyt17lig de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es el anteriormente descrito, en donde las células linfoides son macrófagos o células T.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para reducir la inflamación inducida por zcyt17lig, que comprende administrar a un mamífero que padece inflamación, una cantidad de una composición de un anticuerpo descrito en la presente memoria, suficiente para reducir la inflamación.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero que padece inflamación, que comprende: (1) determinar el nivel de una molécula inflamatoria; (2) administrar una composición que comprende un anticuerpo como el que se describe en esta memoria en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar un nivel pos-administración de la molécula inflamatoria; (4) comparar el nivel de molécula inflamatoria de la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria de la etapa (3), en donde la falta de incremento o disminución del nivel de la molécula inflamatoria es indicativo de la supresión de una respuesta inflamatoria. En una realización, el anticuerpo es aquel descrito precedentemente, en donde el anticuerpo comprende además un radionúcleo, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimiluminiscente, marcador peptídico, partícula magnética, fármaco o toxina.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir la proliferación o diferenciación inducida por zcyt17lig de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas, que comprende cultivar células de sangre periférica o médula ósea con una composición que comprende una cantidad de un anticuerpo como el que se describe aquí, suficiente para reducir la proliferación o diferenciación de las células hematopoyéticas según lo comparado con células de sangre periférica o médula ósea cultivadas en ausencia del receptor soluble de citocinas. En una realización, el método para inhibir la proliferación o diferenciación inducida por zcyt17lig de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es el anteriormente descrito, en el que las células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, el método para inhibir la proliferación o diferenciación inducida por zcyt17lig de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es aquel descrito previamente, en el que las células linfoides son macrófagos o células T.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para reducir la inflamación inducida por zcyt17lig, que comprende administrar a un mamífero que padece inflamación, una cantidad de una composición de un anticuerpo descrito en la presente memoria, suficiente para reducir la inflamación.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un método para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero que padece inflamación, que comprende: (1) determinar un nivel de una molécula inflamatoria; (2) administrar una composición que comprende un anticuerpo descrito en este documento, en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar un nivel pos-administración de la molécula inflamatoria; (4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria de la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria de la etapa (3), en donde la falta de incremento o disminución del nivel de la molécula inflamatoria es indicativa de supresión de una respuesta inflamatoria.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para tratar a un mamífero afectado por una enfermedad inflamatoria en la que el zcyt17lig desempeña una función, que comprende: administrar un antagonista de zcyt17lig al mamífero, de modo que la inflamación se reduzca, en donde el antagonista se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o un polipéptido de unión que se une específicamente a un polipéptido o fragmento de polipéptido de zcyt17lig (SEC ID NO: 2). En una realización, el método para tratar a un mamífero afectado por una enfermedad inflamatoria es aquel anteriormente descrito, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica. En otra realización, el método para tratar a un mamífero afectado por una enfermedad inflamatoria es aquel descrito precedentemente, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica seleccionada del grupo que consiste en: enfermedad inflamatoria de los intestinos; colitis ulcerosa; enfermedad de Crohn; dermatitis atópica; eczema; y psoriasis. En otra realización, el método para tratar a un mamífero afectado por una enfermedad inflamatoria es el descrito previamente, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda. En otra realización, el método para tratar a un mamífero afectado por una enfermedad inflamatoria es el anteriormente descrito, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda seleccionada del grupo que consiste en: endotoxemia; septicemia; síndrome de choque tóxico; y enfermedad infecciosa. En otra realización, el método para tratar a un mamífero afectado por una enfermedad inflamatoria es aquel ya descrito, en el que el anticuerpo comprende además un radionúcleo, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimiluminiscente, marcador peptídico, partícula magnética, fármaco o toxina.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para detectar inflamación en un paciente, que comprende: obtener una muestra de tejido o biológica de un paciente; incubar la muestra de tejido o biológica con un anticuerpo descrito en la presente invención, bajo condiciones en las que el anticuerpo se une a su polipéptido complementario en la muestra de tejido o biológica; visualizar el anticuerpo unido en la muestra de tejido o biológica; y comparar los niveles de anticuerpo unido en la muestra de tejido o biológica del paciente con una muestra de tejido o biológica normal de control, en donde un incremento en el nivel de anticuerpo unido a la muestra de tejido o biológica del paciente, comparada con la muestra de tejido o biológica normal de control, es indicativo de inflamación en el paciente.

ES 2 310 660 T3

En otro aspecto, la presente invención provee un método para detectar inflamación en un paciente, que comprende: obtener una muestra biológica o de tejido de un paciente; marcar un polinucleótido que comprende por lo menos 14 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO: 1 o del complemento de la SEC ID NO: 1; incubar la muestra de tejido o biológica bajo condiciones en las que el polinucleótido se hibride a la secuencia de polinucleótidos complementaria; 5 visualizar el polinucleótido marcado en la muestra de tejido o biológica; y comparar el nivel de hibridación del polinucleótido marcado en la muestra de tejido o biológica del paciente con una muestra de tejido o biológica normal de control, en donde un incremento en la hibridación del polinucleótido marcada en la muestra de tejido o biológica del paciente, comparada con la muestra de tejido o biológica normal de control, es indicativo de inflamación en el paciente.

10 La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de quimera del polipéptido MPL-zcytor17: Dominio TM y extracelular MPL condensado al dominio de señalización intracelular zcytor17

20 Se aisló el dominio extracelular 5' del receptor extracelular MPL de un plásmido que contenía el receptor MPL murino (plásmido PHZ1/MPL) por digestión con EcoRI y BamHI, generando un fragmento de 1164 bp. La digestión se realizó en un gel de agarosa al 1%, y el fragmento se aisló usando el kit de extracción de gel Qiaquick (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. El resto del dominio extracelular MPL y el dominio transmembrana se generó usando PCR con los cebadores ZC6, 673 (SEC ID NO: 13) y ZC29,082 (SEC ID NO: 14). Las condiciones de reacción 25 fueron las siguientes: 15 ciclos a 94°C durante 1min., 55°C durante 1 min., 72°C durante 2 min.; seguidos de 72°C durante 7 min.; luego una impregnación a 4°C. El producto PCR se pasó por gel de agarosa al 1% y se aisló el fragmento MPL de aproximadamente 4G0 bp, usando el kit de extracción de gel Qiaquick™ (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

30 Se aisló el dominio intracelular de zcytor17 humano de un plásmido que contenía cDNA del receptor zcytor17 (No 23/pCAP) usando PCR con los cebadores ZC29,083 (SEC ID NO: 15) y ZC29,145 (SEC ID NO: 16). La secuencia de polinucleótidos que corresponde a la secuencia codificante del receptor zcytor17 se muestra en la SEC ID NO: 5. Las condiciones de reacción fueron las mismas que se mencionaron anteriormente. El producto PCR se pasó por gel de agarosa al 1% y se aisló el fragmento de zcytor17lig de aproximadamente 320 bp, usando el kit de extracción de 35 gel Qiaquick, siguiendo las instrucciones del fabricante.

40 Cada uno de los fragmentos PCR aislados descritos anteriormente se mezcló en una relación volumétrica 1:1 y se usó en una reacción PCR, utilizando ZC6673 (SEC ID NO: 13) y ZC29145 (SEC ID NO: 16) para crear todo excepto la porción de MPL 5' de la quimera MPL-zcytor17. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 15 ciclos a 94°C durante 1 min., 55°C durante 1 min., 72°C durante 2 min.; seguidos de 72°C durante 7 min.; luego una impregnación a 4°C. Todo el producto PCR se pasó por un gel de agarosa al 1%, y se aisló el fragmento de la quimera MPL-zcytor17 45 de aproximadamente 700 bp, usando el kit de extracción de gel (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El fragmento de la quimera MPL-zcytor17 se digirió con BamHI (BRL) y XbaI (Boehringer Mannheim), siguiendo las instrucciones del fabricante. Toda la digestión se pasó por un gel de agarosa al 1%, y la quimera MPL-zcytor17 escindida se aisló usando el kit de extracción de gel Qiaquick™ (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La quimera MPL-zcytor17 escindida resultante, más el fragmento 5' MPL EcoRI/BamHI ya descrito, se insertaron en un vector de expresión para generar todo el receptor quimérico MPL-zcytor17, como se describe a continuación.

50 El vector de expresión receptor pZP-7 se digirió con EcoRI (BRL) y XbaI (BRL) según las instrucciones del fabricante, y gel purificado, como se describió antes. Este fragmento vector se combinó con la quimera de PCR MPL-zcytor17 escindida con EcoRI y XbaI anteriormente aislada, y el fragmento MPL 5' de EcoRI y BamHI anteriormente aislado en una reacción de ligadura. La ligadura se realizó usando Ligasa T4 (Epicentre Technologies), a temperatura ambiente durante 1 hora, según las instrucciones del fabricante. Se electroporó una muestra de la ligadura en células de *E. coli* electrocompetentes DH10B ElectroMAX™ (25 µF, 200Ω, 1,8V). Los transformantes se dispusieron en 55 placas de LB+Ampicilina y se criaron colonias simples por miniprep (Qiagen) y digestión con EcoRI para controlar la quimera MPL-zcytor17. La digestión EcoRI de clones correctos proporciona un fragmento de aproximadamente 2 kb. La confirmación de la secuencia de la quimera MPL-zcytor17 se realizó por análisis de secuencias. El inserto tuvo aproximadamente 3,1 kb, y fue de longitud total.

Ejemplo 2

Proliferación basada en la quimera MPL-zcytor17 en un ensayo BAF3 que utiliza Alamar Blue

A. Construcción de células BaF3 que expresan la quimera MPL-zcytor17

65 Se mantuvo BaF3, una interleucina 3 (IL-3) dependiente de la línea celular prelinfoida derivada 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, KS) enriquecido con suero de ternero fetal inactivado

ES 2 310 660 T3

por calor al 10%, 1-2 ng/ml IL-3 murina (mIL-3) (R & D, Minneapolis, MN), L-glutaMax-1™ 2 mM (Gibco BRL), piruvato sódico 1 mM (Gibco BRL) y antibiótico PSN (GIBCO BRL)). Antes de la electroporación, se preparó el DNA plasmídico pZP-7/MPL-zcytor17 (Ejemplo 1) y se purificó usando un kit Qiagen Maxi Prep (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Las células BaF3 para electroporación se lavaron dos veces en medios RPMI y luego 5 se resuspendieron en medios RPMI a una densidad celular de 10^7 células/ml. Se mezcló 1 ml de células BaF3 resuspendidas con 30 μ g del DNA plasmídico pZP-7/MPL-zcytor17 y se transfirió a cámaras de electroporación separadas (GIBCO BRL). A temperatura ambiente, las células recibieron choques de 5x1 msec a 800 voltios y luego 5x2 ms choques a 600 voltios, suministrados por un aparato de electroporación (Cyto-Pulse). Alternativamente, las células se electroporaron con dos pulsos en serie (800 μ FAD/300 V, seguidos de 1180 μ FAD/300 V) suministrados por un aparato 10 de electroporación Cell-Porator (GibcoBRL). Las células electroporadas se transfirieron a 50 ml de medio completo y se dispusieron en una incubadora durante 15-24 horas (37°C, 5%CO₂). Luego se añadió selección de Geneticin™ (Gibco) (1 mg/ml G418) a las células en un matraz T-162 para aislar la combinación resistente a G418. Las combinaciones de las células BaF3 transfectadas, en lo sucesivo denominadas células BaF3/MPL-zcytor17, se ensayaron para 15 capacidad de señalización, como se describe a continuación.

15 B. Prueba de la capacidad de señalización de las células BaF3/MPL-zcytor17 usando un ensayo de proliferación Alamar Blue

Se centrifugaron células BaF3/MPL-zcytor17 y se lavaron en medio completo, descrito anteriormente, pero sin 20 mIL-3 (en adelante denominado “medio libre de mIL-3”). Las células se centrifugaron y lavaron 3 veces para asegurar la eliminación de mIL-3. Las células se contaron luego en un hemacitómetro. Se dispusieron en placas con un formato de 96 pocillos a 5000 células por pocillo, en un volumen de 100 μ l por pocillo, usando el medio libre de mIL-3.

La proliferación de las células BaF3/MPL-zcytor17 se evaluó usando trombopoyetina murina (mTPO) diluida con 25 medio libre de mIL-3 hasta concentraciones de 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,1 ng/ml, 1,5 ng/ml. Se añadieron 100 microlitos del mTPO diluido a las células BaF3/MPL-zcytor17. El volumen de ensayo total fue 200 μ l. Los controles negativos se efectuaron en paralelo, usando solamente medio libre de mIL-3, sin la adición de mTPO. Las placas de ensayo se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 3 días, momento en el cual 30 se añadió Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) a 20 μ l/pocillo. Alamar Blue proporciona una lectura fluorométrica basada en la actividad metabólica de las células y, por lo tanto, es una medición directa de la proliferación celular en comparación con un control negativo. Las placas se incubaron nuevamente a 37°C, 5% CO₂ durante 24 horas. Se leyeron en la lectora de placas Fmax™ (Molecular Devices Sunnyvale, CA), usando el programa SoftMax™ Pro, a longitudes de onda de 544 (Excitación) y 590 (Emisión), o en la lectora de placas Wallac Victor 2 (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA).

35 Los resultados confirmaron la capacidad de señalización de la porción intracelular del receptor zcytor17, ya que la trombopoyetina indujo la proliferación aproximadamente 9-13 veces sobre el fondo a concentraciones de mTPO de 50 ng/ml y más.

40 **Ejemplo 3**

Construcción del vector de expresión que expresa zcytor17: pZp7pX/zcytor17 de longitud total

45 A. Clonación de cDNA de zcytor17 de longitud total para expresión

Para obtener cDNA de zcytor17 de longitud total, se aislaron los productos PCR 5' y 3' y se unieron usando un sitio PstI interno. Los cebadores PCR se diseñaron usando la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 4 e incluyen los sitios de restricción BamHI y Xho I para propósitos de clonación.

50 Se generó un producto PCR 5' usando una genoteca de DNA WI-38 como molde, y los oligonucleótidos ZC29,359 (SEC ID NO: 18) y ZC27,899 (SEC ID NO: 19) como cebadores. WI-38 es una genoteca de cDNA interna de una línea celular de pulmón embrionario humano (ATCC CRL-2221). Esta reacción PCR 5' se llevó a cabo de la siguiente manera: 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 65°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos, luego 72°C durante 7 minutos; impregnación a 10°C. La reacción PCR utilizó aproximadamente 3 μ g de plásmido preparado a partir de la genoteca cDNA, 20 pmoles de cada oligonucleótido y cinco unidades de DNA polimerasa PWO (Roche). Aproximadamente 90% del producto PCR 5' fue etanol precipitado, digerido con BamHI y PstI, y gel purificado en gel de agarosa al 1,0%. La banda de aproximadamente 600 bp se cortó y se usó para ligadura al vector de clonación pUC18 digerido con BamHI y PstI. Los transformantes resultantes se secuenciaron para confirmar la secuencia de cDNA de zcytor17. Para uno de estos transformantes, se preparó DNA plasmídico y se digirió con BamHI y PstI. La banda de 55 aproximadamente 600 bp resultante se purificó con gel y se usó para una ligadura para formar un cDNA de longitud total.

60 Se generó un producto PCR 3' usando una genoteca de cDNA interna de testículos humanos como molde y los oligonucleótidos ZC27,895 (SEC ID NO: 20) y ZC29,122 (SEC ID NO: 21) como cebadores. Esta reacción PCR 3' se llevó a cabo de la siguiente manera: 30 ciclos a 94°C durante 45 segundos, 65°C durante 45 segundos, 72°C durante 2 minutos, luego 72°C durante 7 minutos; 10°C impregnación. La reacción PCR 3' completa se purificó con gel en un gel de agarosa al 1,0% y se cortó la banda principal de 1500 bp. Esta banda se clonó en el vector PCR Blunt II TOPO usando el kit ZeroBlunt TOPO (Invitrogen). Los transformantes resultantes se secuenciaron para confirmar el

ES 2 310 660 T3

cDNA de zcytor17. Para uno de estos transformantes, se preparó DNA plasmídico y se digirió con PstI y XhoI. La banda de aproximadamente 1500 bp resultante se purificó con gel. Se realizó una ligadura de tres partes con BamHI 5' hacia el fragmento Pst I anterior, PstI 3' hacia el fragmento XhoI, y el vector de expresión pZp7pX se digirió con BamHI y Xhol. Este plásmido pZp7pX generado que contenía un cDNA de longitud total para zcytor17 (SEC ID NO: 4), se designó como pZp7p/zcytor17. El cDNA de zcytor17 de longitud total en pZp7p/zcytor17 tiene una mutación silenciosa que cambia T a G en la posición 1888 de la SEC ID NO: 4 (que codifica un residuo Gly en el residuo 464 de la SEC ID NO: 5). Ya que esta mutación fue silenciosa, el cDNA de zcytor17 en pZp7p/zcytor17 codifica el polipéptido, como se muestra en la SEC ID NO: 5. El plásmido pZp7pX es un vector de expresión mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de CMV, intrón A, sitios de restricción múltiples para inserción de secuencias codificantes, y un terminador de la hormona de crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de resistencia a puromicina y el terminador SV40.

B. Construcción del vector de expresión que expresa WSX-1 de longitud total

Se aisló todo el receptor WSX (SEC ID NO: 9) de un plásmido que contiene cDNA del receptor WSX-1 (SEC ID NO: 8) (patente estadounidense No. 5.925.735). Se digirió DNA plasmídico de hWSX-1/pBluescript SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA) con EcoRI y Xhol para generar un fragmento de 1075 bp, y también se digirió con Xhol y XbaI para generar un fragmento de 900 bp. Ambas digestiones se realizaron en un gel de agarosa al 1%, y se aislaron los fragmentos de WSX-1 escindidos.

El vector de expresión receptor pZp7Z se digirió con EcoRI y XbaI, y se purificó con gel, como se describió previamente. Este fragmento vector se combinó con dos fragmentos de zcytor17 escindidos aislados anteriormente en una reacción de ligadura, usando Ligasa T4 (BRL). La ligadura se incubó a temperatura ambiente durante una noche. Se electroporó una muestra de la ligadura en células de *E. coli* electrocompetentes DH10B electroMAXTM (25 μ F, 200 Ω , 2.3V). Se desarrollaron seis colonias en cultivo y se preparó DNA y se digirió para confirmar el correcto inserto de longitud total WSX-1 de 2,0 kb. El plásmido resultante es pZPZ7Z/WSX-1.

Ejemplo 4

Proliferación basada en Zcytor17 en un ensayo de BaF3 usando Alamar Blue

A. Construcción de células BaF3 que expresan el receptor zcytor17, el receptor WSX-1 y OSMR

Se construyeron células BaF3 que expresan el receptor zcytor17 de longitud total, según el Ejemplo 2A anterior, usando 30 μ g del vector de expresión de zcytor17 descrito en el Ejemplo 3A. Una excepción es que en lugar de selección de Geneticina, se añadieron 2 μ g/ml de Puromicina (ClonTech) a las células transfectadas en un matraz de T-162 para aislar la mezcla resistente a puromicina. Las células BaF3 que expresan mRNA del receptor zcytor17 se designaron BaF3/zcytor17. Para obtener clones, se contaron células BaF3/zcytor17 en un hemacitómetro y se dispusieron en placas a 1 célula/pocillo, 0,5 célula/pocillo, 0,1 célula/pocillo y 0,01 célula/pocillo en placas de 96 pocillos. Se extrapolaron 15 clones a matraces T75, y se ensayaron cinco clones para expresión de zcytor17. Se aisló RNA total de los sedimentos celulares usando un kit de aislamiento de RNA total S.N.A.P.TM (InVitrogen). Se sintetizó cDNA de la primera cadena, usando el kit de RT-PCR de primera cadena proSTARTM, y luego se realizó PCR con los cebadores específicos de zcytor17 ZC29,180 (SEC ID NO: 22) y ZC29,122 (SEC ID NO: 23) para cribar los clones para expresión de zcytor17. Se eligió un clon, BaF3/zcytor17#15, para expandirse y transfectarse con el vector de expresión WSX-1.

Se construyeron células BaF3 que expresan zcytor17 y WSX-1 de longitud total como en el Ejemplo 2A anterior, usando 30 μ g del vector de expresión de WSX-1, WSX-1/pZp7Z (Ejemplo 3B), para electroporar las células BaF3/zcytor17#15. Una excepción es que en lugar de selección de Geneticina, se añadieron 200 μ g/ml de Zeocina (InVitrogen) a las células transfectadas en un matraz T-162 para aislar la mezcla resistente a zeocina. Las células BaF3 que expresan zcytor17 y WSX-1 se designaron BaF3/zcytor17/hWSX-1. Para obtener clones, se dispusieron en placas mezclas de BaF3/zcytor17/hWSX-1 a una dilución limitante en placas de 96 pocillos. Los clones resultantes se expandieron y se aisló RNA total, usando un kit de aislamiento de RNA total S.N.A.P.TM (InVitrogen). El cDNA de la primera cadena se sintetizó usando el kit de RT-PCR de primera cadena proSTARTM, y luego se usó PCR con los cebadores específicos de WSX-1 ZC9791 (SEC ID NO: 24) y ZC9793 (SEC ID NO: 25) para cribar los clones para expresión de WSX-1. Se eligió un clon, BaF3/zcytor17/hWSX-1#5, para expandirse más y transfectarse con el vector de expresión OSMRbeta.

Se construyeron células BaF3 que expresan zcytor17, WSX-1 y OSMRbeta de longitud total, según el Ejemplo 2A anterior, usando 30 ug del vector de expresión de OSMRbeta, OSMR/pZp7NX, como se describe en el Ejemplo 29, para electroporar las células BaF3/zcytor17/hWSX-1#5. Las células BaF3 que expresan zcytor17, WSX-1 y mRNA de OSMRbeta se designaron BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR. Para obtener clones, se dispusieron mezclas de células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta a una dilución limitante en placas de 96 pocillos. Se expandieron clones individuales y se aisló RNA total usando un kit de aislamiento de RNA total S.N.A.P.TM (InVitrogen). Se sintetizó cDNA de la primera cadena, usando el kit de RT-PCR de primera cadena proSTARTM, y luego se usó PCR con los cebadores específicos de OSMRbeta, ZC40109 (SEC ID NO: 26) y ZC40112 (SEC ID NO: 27), para cribar los clones para expresión de zcytor17, WSX-1 y OSMR. Se seleccionó un clon, BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR#5, y estas células se usaron para cribar zcytor17lig, como se describe a continuación en los Ejemplos 5 y 6.

ES 2 310 660 T3

B. Construcción de células BaF3 que expresan el receptor zcytor17 y OSMR

Se construyeron células BaF3 que expresan el receptor zcytor17 de longitud total, según el Ejemplo 2A anterior, usando 30 μ g del vector de expresión de zcytor17, descrito en el Ejemplo 3A. Una excepción es que en lugar de selección de Geneticina, se añadieron 2 μ g/ml de Puromicina (ClonTech) a las células transfectadas en un matraz T-162 para aislar la mezcla resistente a puromicina. Las células BaF3 que expresan mRNA del receptor zcytor17 se designaron BaF3/zcytor17. Para obtener clones, se dispusieron mezclas de células BaF3/zcytor17 en dilución limitante en placas de 96 pocillos. Estos clones se expandieron en cultivo y se aisló RNA total, usando un kit de aislamiento de RNA total S.N.A.P.TM (InVitrogen). Se sintetizó cDNA de la primera cadena, usando el kit RT-PCR de primera cadena proSTARTM, y luego se usó PCR para cribar los clones de expresión de zcytor17. Se eligió un clon, BaF3/zcytor17 #15, para expandirse y transfectarse con el vector de expresión OSMRbeta.

Se construyeron células BaF3 que expresan zcytor17 y OSMRbeta de longitud total, según el Ejemplo 2A anterior, usando 30 ug del vector de expresión de OSMRbeta, OSMR/pZp7NX (Ejemplo 29) para electroporar las células BaF3/zcytor17#15. Las células BaF3 que expresan zcytor17 y mRNA de OSMRbeta se designaron BaF3/zcytor17/OSMR. Estas células se utilizaron para cribar zcytor17lig, como se describe a continuación en el Ejemplo 5.

Ejemplo 5

20 *Cribado de zcytor17lig que utiliza células BaP3/Zcytor17/WSX-1/OSMRbeta, usando un ensayo de proliferación con Alamar Blue*

A. Activación de células CCRF-CEM y CCRF-HSB2 para ensayar la presencia de zcytor17lig

25 Se obtuvieron células CCRF-CEM y CCRF-HSB2 de ATCC, y se estimularon en cultivo para producir medio condicionado para ensayar la presencia de la actividad de zcytor17lig, como se describe a continuación. Las células en suspensión se sembraron a 2×10^5 células/ml o 5×10^5 células/ml en medio RPMI-1640 enriquecido con PBS al 10%, L-glutamina 2 mM (GibcoBRL), IX PSN (GibcoBRL), y se activaron con 10 ng/ml de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Calbiochem, San Diego, CA) y 0,5 ug/ml de IonomycinTM (Calbiochem) durante 24 o 48 horas. El sobrenadante de las células estimuladas se usó para ensayar la proliferación de células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta, como se describe a continuación.

B. Cribado de zcytor17lig que utiliza células BaF3/Zcytor17/WSX-1/Q5MRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta, usando un ensayo de proliferación con Alamar Blue

35 Se centrifugaron células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta y se lavaron en medio libre de mIL-3. Las células se centrifugaron, se lavaron 3 veces para asegurar la eliminación de mIL-3 y se contaron en un hemacitómetro. Las células se dispusieron en una placa de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 μ l por pocillo, usando el medio libre de mIL-3.

40 La proliferación de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o las células BaF3/zcytor17/OSMRbeta se evaluó usando medio condicionado de células CCRFCEM y CCRF-HSB2 activadas (véase el Ejemplo 5A). El medio condicionado se diluyó con medio libre de mIL-3 hasta concentraciones de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% y 0,375%. Se añadieron 100 microlitos del medio condicionado diluido a las células BaF3/zcytor17AVSX-1/OSMRbeta o a las células BaF3/zcytor17/OSMRbeta. El volumen de ensayo total fue de 200 μ l. Las placas de ensayo se incubaron a 37°C, 5%CO₂ durante 3-5 días, tras lo cual se añadió Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) a placas a 20 μ l/pocillo. Las placas se incubaron nuevamente a 37°C, 5% CO₂ durante 24 horas. Se leyeron en la lectora de placas FmaxTM (Molecular devices), como se describió precedentemente (Ejemplo 2).

50 Los resultados confirmaron la respuesta proliferativa de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o las células BaF3/zcytor17/OSMRbeta a un factor presente en el medio condicionado de CCRF-CEM y CCRF-HSB2 activado. La respuesta, según lo medido, fue aproximadamente 10 veces sobre el fondo a la concentración de 25%. Las células BaF3 no transfectadas no proliferaron en respuesta a este factor, ni tampoco las células BaF3 transfectadas con zcytor17 y WSX-1 (células BaF3/zcytor17/WSX-1), lo que demuestra que este factor es específico de los receptores Zcytor17/OSMRbeta o zcytor17/OSMRbeta/WSX-1. Además, el receptor soluble de zcytor17 disminuyó esta actividad proliferativa del zcytor17lig en las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta (véase, Ejemplo 11). Se esperan resultados similares en células BaF3/zcytor17/OSMRbeta.

C. Fuente primaria humana utilizada para aislar zcytor17lig

60 Se trajeron 100 ml de sangre de cada uno de seis donantes. La sangre se extrajo usando tubos Vacutainer de 10X10 ml que contenían heparina. La sangre de los seis donantes se combinó (600 ml), se diluyó 1:1 en PBS y se separó usando Ficoll-Paque[®] PLUS (Pharmacia Biotech). El rendimiento de células humanas primarias aisladas, después de la separación en el gradiente ficoll, fue 1,2X10⁹ células.

65 Las células se suspendieron en 9,6 ml de tampón MACS (PBS, EDTA al 0,5%, EDTA 2 mM). Se eliminaron 1,6 ml de suspensión celular, y se añadieron 0,4 ml de microesferas de CD3 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). La mezcla se incubó durante 15 min. a 4°C. Estas células marcadas con esferas de CD3 se lavaron con 30 ml de tampón MACS y luego se resuspendieron en 2 ml de tampón MACS.

ES 2 310 660 T3

Se preparó una columna VS+ (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La columna VS+ se dispuso luego en un campo magnético VarioMACS™ (Miltenyi). La columna se equilibró con 5 ml de tampón MACS. Las células humanas primarias aisladas se aplicaron luego a la columna. Las células CD3 negativas se dejaron pasar. La columna se enjuagó con 9 ml (3 X 3 ml) de tampón MACS. La columna se quitó luego del imán y se dispuso sobre 5 un tubo falcon de 15 ml. Se eluyeron células CD3+ añadiendo 5 ml de tampón MACS a la columna, y las células unidas se lavaron usando el pistón provisto por el fabricante. La incubación de las células con las esferas magnéticas CD3, los lavados y las etapas de la columna VS+ (desde incubación hasta elución) se repitieron cinco veces más. Se combinaron las fracciones de CD3+ resultantes de las seis separaciones de las columnas. El rendimiento de las células humanas seleccionadas de CD3+ fue 3X10⁸ células totales.

10 Se eliminó una muestra de las células humanas seleccionadas para CD3+ combinadas para tinte y clasificación en un clasificador celular de anticuerpos fluorescente (FACS) para evaluar su pureza. Las células seleccionadas humanas CD3+ fueron 91% células CD3+.

15 Las células seleccionadas para CD3+ humanas se activaron incubando en RPMI + FBS al 5%+ PMA 10 ng/ml y Ionomicina 0,5 µg/ml (Calbiochem) durante 13 horas a 37°C. El sobrenadante de estas células humanas seleccionadas para CD3+ se ensayó para actividad de zcytor17lig, como se describe a continuación. Además las células humanas seleccionadas para CD3+ activadas se usaron para preparar una genoteca de cDNA, como se describe en el Ejemplo 6 a continuación.

20 D. *Sobrenadante de ensayo de células humanas seleccionadas para CD3+ activadas para zcytor17lig, usando células BaF3/Zcytor17/WSX-1/OSMRbeta y un ensayo de proliferación de Alamar Blue*

25 Se centrifugaron células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta y se lavaron en medio libre de mIL-3. Las células se centrifugaron y lavaron 3 veces para asegurar la eliminación de mIL-3. Las células se contaron en un hemacitómetro y se dispusieron en placas de 96 pocillos a 5000 células por pocillo, en un volumen de 100 µl por pocillo, usando el medio libre de mIL-3.

30 La proliferación de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o las células BaF3/zcytor17/OSMRbeta se evaluó usando medio condicionado de células humanas seleccionadas para CD3+ activadas (véase el Ejemplo 5C) diluidas con medio libre de mIL-3 hasta concentraciones de 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75%, 0,375% y 0,187%. Se añadieron 100 microlitos del medio condicionado diluido a las células BaF3/zcytor17AVSX-1/OSMRbeta o a las células BaF3/zcytor17/OSMRbeta. El volumen de ensayo total fue 200 µl. Las placas de ensayo se incubaron y ensayaron como se describe en el Ejemplo 5B.

35 Los resultados confirmaron la respuesta proliferativa de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o las células BaF3/zcytor17/OSMRbeta a un factor presente en el medio condicionado de células humanas seleccionadas para CD3+ activadas. La respuesta, según lo medido, fue aproximadamente 15 veces sobre el fondo en la concentración de 25%. Las células BaF3 no transfectadas no proliferaron en respuesta a este factor, ni las células BaF3 transfectadas con 40 zcytor17 y WSX-1 (células BaF3/zcytor17/WSX-1), lo que demuestra que este factor fue específico de los receptores Zcytor17/OSMRbeta o zcytor17/OSMRbeta/WSX-1.

Ejemplo 6

45 *Clonación de zcytor17lig humano de una genoteca de células seleccionadas para CD+ humanas*

El cribado de una genoteca de cDNA de células seleccionadas para CD3+ activadas humanas reveló un cDNA aislado que es un nuevo miembro de la familia de citocinas de cuatro hélices. Este cDNA codificó el zcytor17lig. El cDNA se identificó cribando la actividad del zcytor17lig, usando los receptores zcytor17/WSX-1/OSM.

50 A. *Vector para construcción de la genoteca seleccionada para CD3+*

El vector para la construcción de la genoteca seleccionada para CD3+ fue pZP7NX. El vector p2P7NX se construyó de la siguiente manera: la región codificante para el marcador selectivo DHFR en el vector pZP7 se eliminó por 55 digestión de DNA con las enzimas de restricción NcoI y PstI (Boehringer Mannheim). El DNA digerido se pasó por un gel de agarosa al 1%, se cortó y se purificó en gel, usando el kit de extracción de gel Qiagen (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se amplió un fragmento de DNA que representa la región codificante del marcador selectivo de Zeocina, por el método PCR con los cebadores ZC13,946 (SEC ID NO: 28) y ZCI3,945 (SEC ID NO: 29), y pZeoSV2(+) como molde. Hay sitios de restricción adicionales PstI y Bell en el cebador ZC13,946 (SEC ID NO: 28), y sitios adicionales NcoI y SfuI en el cebador ZC13,945 (SEC ID NO: 29). El fragmento de PCR se cortó con las enzimas de restricción PstI y NcoI, y se clonó en el vector pZP7 preparado escindiendo con las mismas dos enzimas y posterior purificación con gel. A este vector se lo denominó pZP7Z. Luego, la región codificante de Zeocina se eliminó por digestión de DNA del vector pZP7Z con las enzimas de restricción BclI y SfuI. El DNA digerido se pasó por un gel de agarosa al 1%, se cortó y se purificó en gel, y luego se ligó con un fragmento de DNA de corte de la 60 región codificante de Neomicina del vector pZem228 (depositado en The American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA; Depósito ATCC No. 69446) con las mismas enzimas de restricción (Bell y SfuI).

Este nuevo vector se denominó pZP7N, en el cual la región codificante para el marcador selectivo DHFR se reemplazó con la región codificante para un marcador selectivo de Neomicina del vector pZem228. Un fragmento relleno que incluía un sitio *Xho*I se añadió a pZP7N para crear un vector adecuado para clonación de alta eficacia direccional de cDNA; a este nuevo vector se lo denominó pZP7NX. Para preparar el vector para cDNA, se dirigieron 20 µg de pZP7NX con 20 unidades de EcoRI (Life Technologies Gaithersberg, MD) y 20 unidades de *Xho*I (Boehringer Mannheim Indianapolis, IN) durante 5 horas a 37°C, luego 68°C durante 15 minutos. La digestión se pasó luego por un gel IXTAE de agarosa de baja fusión al 0,8% para separar el relleno del vector. La banda del vector se cortó y digirió con “beta-Agarase” (New England Biolabs, Beverly, MA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Despues de la precipitación de etanol, el vector digerido se resuspendió en agua hasta 45 ng/ml en preparación para ligadura de una genoteca de cDNA seleccionada con CD3+ descrita a continuación.

B. Preparación de una genoteca de cDNA de células seleccionadas para CD3+ activadas humanas

Aproximadamente 1,5X10⁸ células seleccionadas para CD3+ primarias humanas estimuladas en ionomicina/PMA se aislaron por centrifugación después de cultivar a 37°C durante 13 horas (Ejemplo 5C). Se aisló RNA total de sedimento celular, usando el kit “RNeasy Midi” de Qiagen, Inc. (Valencia, CA). Se aisló mRNA de 225 microgramos de RNA total, usando el “kit de purificación de mRNA MPG” de CPG Inc. (Lincoln Park, NJ). Se aislaron 3,4 microgramos de mRNA y se convirtieron a cDNA bicatenario, usando el seguimiento procedimiento.

Se sintetizó cDNA de la primera cadena de células seleccionadas para CD3+ humanas estimuladas, de la siguiente manera. Se mezclaron 9 µl de oligo d(T)-seleccionado poly(A) CD3+ RNA a una concentración de 0,34 µg/µl y 1,0 µl de 1 µg/µl de cebador de primera cadena ZC18,698 (SEC ID NO: 30) que contenía un sitio de restricción *Xho*I, y se calentaron a 65°C durante 4 minutos, y se enfriaron en hielo. La síntesis de cDNA de primera cadena se inició por adición de 9 µl de tampón de primera cadena (5x tampón SUPERSCRIPT®; (Life Technologies), 4 µl de 100 mM ditioreitol y 2 µl de una solución de trifosfato desoxinucleotídico que contenía 10 mM cada una de dATP, dGTP, dTTP y 5-metil-dCTP (Pharmacia Biotech Inc.) a la mezcla de RNA-cebador. La mezcla de reacción se incubó a 45°C durante 4 minutos y se le añadieron 8 µl de 200 U/µl SuperscriptII®, RNase H-transcriptasa inversa (Life technologies). La reacción se incubó a 45°C durante 45 minutos, seguida de una rampa de incubación de 1°C cada 2 minutos hasta 50°C, en donde la reacción se mantuvo durante 10 minutos. Para desnaturizar cualquier estructura secundaria y permitir la extensión adicional del cDNA, la reacción se calentó luego hasta 70°C durante 2 minutos, luego se disminuyó hasta 55°C durante 4, tras lo cual se añadieron 2 µl de SuperscriptII® RT y se incubó durante 15 minutos más, y luego se subió gradualmente hasta 70°C 1 minuto/1°C. Los nucleótidos no incorporados se eliminaron del cDNA precipitando dos veces en presencia de 2 µg de vehículo de glucógeno, acetato de amonio 2,0 M y 2,5 volúmenes de etanol, seguidos de un lavado de 100 µl con etanol al 70%. El cDNA se resuspendió en 98 µl de agua en una síntesis de la segunda cadena. Se realizó la síntesis de la segunda cadena en el cDNA de la primera cadena que promocionó el cebador de la primera cadena de la síntesis de la segunda cadena, dando como resultado la formación de una horquilla de DNA. La reacción de la segunda cadena contenía 98 µl del cDNA de la primera cadena, 30 µl de 5x polimerasa, 1 tampón (Tris 100 mM: HCl, pH 7,5, KCl 500 mM, MgCl₂ 25 mM, (NH₄)₂SO₄) 50 mM, 2 µl de ditioreitol 100 mM, 6 µl de una solución que contenía 10 mM de cada trifosfato desoxinucleotídico, 5 µl de b-NAD 5 mM, 1 µl de 3 U/µl *E. coli* DNA ligasa (New England Biolabs Inc.) y 4 µl de 10 U/µl *E. coli* DNA polimerasa I (New England Biolabs Inc.). La reacción se ensambló a temperatura ambiente y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos, seguida de adición de 4 µl de 3,8 U/µl RNase H (Life Technologies). La reacción se incubó a 15°C durante dos horas seguida de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron diez microlitos de TRIS 1M, pH7,4 a la reacción, y se extrajeron dos veces con fenol/cloroformo y una vez con cloroformo, las fases orgánicas se retroextrajeron con 50 µl de TE (TRIS 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM), se combinaron con otras acuosas, y precipitó etanol en presencia de acetato sódico 0,3 M. El sedimento se lavó con 100 µl de etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en 40 µl de agua.

El DNA monocatenario de la estructura de horquillas se escindió usando nucleasa de poroto mung. La mezcla de reacción contenía 40 µl de cDNA de la segunda cadena, 5 µl de tampón de nucleasa de poroto mung 10x (Life technologies), 5 µl de nucleasa de poroto mung (Pharmacia Biotech Corp.) diluida hasta 1 U/µl en tampón de nucleasa de poroto mung 1X. La reacción se incubó a 37°C durante 45 minutos. La reacción finalizó por adición de 10 µl de Tris 1M: HCl, pH 7,4 seguida de extracciones secuenciales de fenol/cloroformo y cloroformo, como se describió anteriormente. Despues de las extracciones, el cDNA precipitó con etanol en presencia de acetato sódico 0,3 M. El sedimento se lavó con 100 µl de etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en 38 µl de agua.

El cDNA resuspendido se enrómó en los extremos con DNA polimerasa T4. El cDNA, que se resuspendió en 38 µl de agua, se mezcló con 12 µl de tampón DNA polimerasa T4 5x (Tris 250 mM:HCl, pH 8,0, KCl 250 mM, MgCl₂ 25 mM), 2 µl de ditioreitol 0,1 M, 6 µl de una solución que contenía 10 mM de cada trifosfato desoxinucleotídico y 2 µl de 1 U/µl DNA polimerasa T4 (Boehringer Mannheim Corp.). Despues de una incubación de 45 minutos a 15°C, la reacción terminó por la adición de 30 µl de TE seguida de extracciones secuenciales de fenol/cloroformo y cloroformo, y se retroextrajo con 20 µl de TE, como se describió anteriormente. El DNA precipitó con etanol en presencia de 2 µl de sedimento Paint™ (Novagen) y acetato sódico 0,3 M, y se resuspendió en 11 µl de agua.

Se ligaron adaptadores RI *Eco* RI a los extremos 5' del cDNA descrito anteriormente para permitir la clonación al vector de expresión. Se mezclaron 11 µl de cDNA y 4 µl de 65 pmol/µl del adaptador RI hemifosforilado *Eco* (Pharmacia Biotech Corp), con 5 µl de tampón de ligasa 5x (Life Technologies), 2 µl de ATP 10 mM y 3 ul de 1 U/µl DNA ligasa T4 (Life Technologies), 1 µl de tampón de ligadura 10X (Promega Corp), 9 µl de agua. La dilución extra

ES 2 310 660 T3

con 1X tampón se realizó para prevenir que el sedimento Paint precipitara. La reacción se incubó 9 horas en un baño de agua, con una temperatura gradual de 10°C a 22°C durante 9 horas, seguida de 45 minutos a 25°C. La reacción finalizó por incubación a 68°C durante 15 minutos.

5 Para facilitar la clonación direccional del cDNA a un vector de expresión, el cDNA se digirió con *Xhol*, resultando en un cDNA que tenía un extremo 5' cohesivo de RI *Eco* y un extremo 3' cohesivo de *Xhol*. El sitio de restricción *Xhol* en el extremo 3' del cDNA se había introducido previamente usando el cebador ZC18698 (SEC ID NO: 30). La digestión de la enzima de restricción se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía 35 μ l de la mezcla de ligadura antes mencionada, 6 μ l de tampón H 10x (Boehringer Mannheim Corp.), 1 μ l de 2 mg/ml BSA (Biolabs Corp.), 17 μ l agua y 1,0 μ l de 40 U/ μ l *Xhol* (Boehringer Mannheim). La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora. La reacción finalizó por incubación a 68°C durante 15 minutos, seguida por precipitación de etanol, lavado y secado como se describió anteriormente y resuspensión en 30 μ l de agua.

15 El cDNA resuspendido se calentó hasta 65°C durante 5 minutos y se enfrió en hielo, se añadieron 4 μ l de tinte con carga de gel 5X (Research Genetics Corp.), se cargó el cDNA a agarosa de baja fusión al 0,8% 1X TAE (agarosa de baja fusión SEA PLAQUE GTGTM; FMC Corp.) y electroforesis. Los adaptadores contaminantes y el cDNA de menos de 0,6 Kb de longitud se cortaron del gel. Los electrodos se invirtieron, se añadió agarosa triturada para llenar los pocillos, se cambió el tampón y se sometió el cDNA a electroforesis hasta que se concentró cerca de la senda de origen. El área del gel que contenía el cDNA concentrado se cortó y se dispuso en un tubo Microfuge, y la agarosa se fundió calentando hasta 65°C durante 15 minutos. Tras equilibrar la muestra hasta 45°C, se añadieron 2 μ l de 1 U/ μ l Beta-agarosa I (Biolabs, Inc.), y la mezcla se incubó durante 90 min. a 45°C para digerir la agarosa. Después de la incubación, se añadió a la muestra un volumen de un décimo de acetato de Na 3 M, y la mezcla se incubó en hielo durante 15 minutos. La muestra se centrifugó a 14.000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar la agarosa no digerida, el cDNA se precipitó con etanol, se lavó en 70% etanol, se secó al aire y se resuspendió en 40 25 μ l de agua.

30 Para determinar la relación óptima de cDNA al vector, se ensamblaron varias ligaduras y se sometieron a electroportación. En síntesis, 2 μ l de tampón ligasa T4 5X (Life Technologies), 1 μ l de ATP 10 mM, 1 μ l pZP7NX digerido con EcoRI-XhoI, 1 μ l DNA ligasa T4 diluida hasta 0,25 u/ μ l (Life Technologies) agua hasta 10 μ l y 0,5, 1, 2 ó 3 μ l de cDNA se mezclaron en 4 ligaduras separadas, se incubaron a 22°C durante 4 horas, 68°C durante 20 minutos, precipitó acetato de sodio-etanol, se lavó, secó y resuspendió en 10 μ l. Un solo microlitro de cada ligadura se electroporó en 40 μ l de bacterias electrocompetentes DH10b ElectroMaxTM (Life Technologies) usando una cubeta de 0,1 cm (Biorad) y un controlador de pulsos Genepulser, (Biorad) regulado a 2,5 KV, 251F, 200 ohms. Estas células se resuspendieron inmediatamente en 1 ml de caldo SOC (Manniatis *et al. supra.*) seguidas de 500/ μ l de glicerol-SOC al 50% como conservante. Estos “stocks de glicerol” se congelaron en varias alícuotas a -70°C. Se descongeló una alícuota de cada uno y se dispuso en serie en placas LB-agar enriquecidas con ampicilina a 100 μ g/ml. Los números de colonias indicaron que la relación óptima de cDNA de CD3+ a vector pZP7NX era de 1 μ l hasta 45 ng; dicha ligadura proporcionó 4,5 35 millones de clones primarios.

40 Para los fines de cribar la genoteca usando un ensayo de proliferación basado en BaF3 (Ejemplo 5) se diluyeron los stocks de glicerol anteriormente mencionados en cultivos líquidos de 100 ó 250 clones por mezcla en placas de microvaloración con pocillos profundos, se desarrollaron durante 24 horas a 37°C con agitación y se aisló el plásmido, usando un kit Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Dicho DNA se transfeció posteriormente a células BHK, medio condicionado 72 horas, se cosechó y se conservó a -80°C, y luego se dispuso en 5K de células 45 BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta durante 72 horas, tras lo cual se evaluó la proliferación usando un ensayo de fluorescencia “Alamar blue” (Ejemplo 5B y Ejemplo 2B).

Ejemplo 7

50 Clonación de expresión de zcytor17lig humano

Los stocks de glicerol de la genoteca de células seleccionadas para CD3+ activadas humanas (Ejemplo 6) se añadieron a Super Broth IITM (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) + 0,1 mg/ml ampicilina (amp) a una concentración de 250 células por 800 microlitros. Las *E. coli* se dejaron equilibrar durante 24 horas a temperatura ambiente. Al 55 momento de la inoculación, se dispusieron 400 microlitros en placas de LB + amp para determinar la valoración real de la inoculación. Después de 24 horas, las placas se contaron y luego la concentración final del SuperBrothIITM + *E. coli* se ajustó, de modo que la concentración final fue 250 células por 1,2 ml. Se inocularon 2 litros tres veces para un total de 6 litros. El medio se dispuso luego en placas de 96 pocillos profundos (Qiagen). La disposición en las placas se realizó con el dispensador de 8 canales Q-Fill2TM (Genetix, Christchurch, Dorset, Reino Unido). Las *E. coli* 60 se desarrollaron durante la noche a 37°C, agitando a 250 rotaciones/min. en un agitador de ambiente multicapa New Brunswick Scientific Innova 4900. Las *E. coli* se centrifugaron fuera de la solución a 3000 rpm, usando una máquina centrifuga Beckman GS-6KR. Estos sedimentos de *E. coli* se congelaron a -20°C o se usaron nuevos antes de minipreparar el DNA plasmídico. Cada sedimento contiene aproximadamente 250 clones de cDNA de la genoteca de células seleccionadas para CD3+ humanas.

65 Estas mezclas de 250 clones de cDNA se miniprepararon luego usando el kit QIAprepTM 96 Turbo Miniprep (Qiagen). Se eluyó el DNA plasmídico, usando 125 μ l de TE (Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM). Este DNA plasmídico se usó luego para transfectar células BHK.

ES 2 310 660 T3

Transfección de BHK

Se dispusieron células BHK en placas de 96 pocillos con cultivo de tejido a una densidad de 12.000 células por pocillo en un volumen de 100 μ l por pocillo. El medio de cultivo fue DMEM (GibcoBRL), suero bovino fetal inactivado por calor al 5%, L-glutamina 2 mM (GibcoBRL), 1X PSN (GibcoBRL), piruvato de Na 1 mM (GibcoBRL).

Al día siguiente, las células BHK se lavaron una vez con 100 μ l SFA. SFA es medio libre de suero que es DMEM/F12 o DMEM (Gibco/BRL), GlutaMaxTM 2 mM (Gibco/BRL), piruvato de Na 1 mM, 10 μ g/ml de transferrina, 5 μ g/ml insulina, 10 μ g/ml fetuina, 2 μ g/ml selenio, HEPES 25 mM (Gibco/BRL), 100 μ M aminoácidos no esenciales (Gibco/BRL).

Se elaboró una mezcla de DNA/LipofectamineTM de la siguiente manera: se combinaron 2,2 μ l de reactivo LipofectamineTM (Gibco/BRL) con 102,8 μ l de SFA a temperatura ambiente; se añadieron luego aproximadamente 5 μ l del DNA plasmídico (200 ng/ μ l) a la mezcla LipofectamineTM/SFA para formar la mezcla DNA/LipofectamineTM, que se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se eliminó el SFA de las células BHK, y las células se incubaron con 50 μ l de la mezcla DNA/LipofectamineTM durante 5 horas a 37°C con 5% CO₂. Se añadieron 50 μ l de la mezcla DNA/LipofectamineTM a cada uno de los dos pocillos de células BHK, de modo que las transfecciones se realizaron por duplicado.

Después de incubar las células BHK con la mezcla DNA/LipofectamineTM durante 5 horas, la mezcla DNA/LipofectamineTM se eliminó, y se añadieron 100 μ l de medio de cultivo. Las células se incubaron durante toda la noche, se eliminó el medio y se reemplazó con 100 μ l de medio de cultivo. Después de cultivar las células durante 48-72 horas, se separó el medio condicionado, se congeló a -80°C durante un mínimo de 20 minutos, se descongeló y luego se ensayaron 50 μ l en el ensayo de proliferación de Baf3, descrito en el Ejemplo 5, para identificar combinaciones de 250 clones con actividad de ligandos.

Se cribaron 20 placas de 96 pocillos en un solo ensayo. Esto representaba aproximadamente 250 cDNA/pocillo o un total de 480.000 cDNA. De éstos, el medio condicionado de aproximadamente 60 pocillos (que representan 250 cDNA por pocillo) dio positivo en el ensayo de proliferación. Se eligió una de estas combinaciones positivas para descomponer y aislar un cDNA sencillo que codificaría el zcytor17lig. Ésta fue la combinación 62A12.

Par combinar 62A12, se usó 1 μ l de DNA para transformar células ElectroMaxTM DH10B (Gibco/BRL) por electroporación. Los transformantes se dispusieron en placas de LB + amp (100 μ g/ml) para dar colonias sencillas. De la combinación electroporada, se seleccionaron 672 colonias individuales por palillo en siete placas de 96 pocillos que contenían 1,2 ml de SuperBrothIITM por pocillo. Estas placas se numeraron #62.1 a #62.7. Se cultivaron durante una noche y el DNA plasmídico se minipreparó como anteriormente. Para las siete placas, se transfeció DNA plasmídico de las placas de descomposición a células BHK, y se ensayó por proliferación como anteriormente, excepto que las transfecciones no se realizaron por duplicado.

Se identificaron dos clones positivos 62.6C7 y 62.6E9 por actividad de un total de 672 clones. Se secuenció el DNA plasmídico minipreparado a partir del clon 62.6E9 y se obtuvo una identificación tentativa, pero se obtuvo una secuencia mixta de estos clones positivos. Para aislar más el cDNA de zcytor17lig a un clon sencillo, se usó 1 μ l de DNA de la combinación de 62.6E9 para electroporar células DH10B, y los transformantes se dispusieron en placas LB + amp (100 μ g/ml) para dar colonias sencillas. Se secuenció DNA plasmídico minipreparado a partir de varias colonias para dar la secuencia de DNA exacta. La secuencia de polinucleótidos de zcytor17lig fue de longitud total (SEC ID NO: 1) y se muestra su correspondiente secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 2).

Ejemplo 8

Construcción de vectores de expresión mamífera que expresan receptores solubles zcytor17: zcytor17CEE, zcytor17CFLG, zcytor17CHIS y zcytor17-Fc4

A. Construcción del vector de expresión mamífera de zcytor17 que contiene zcytor17CEE, zcytor17CFLG y zcytor17CHIS

Se preparó un vector de expresión para la expresión del dominio soluble extracelular del péptido zcytor17, pZp9zcytor17CEE, en donde el constructo se diseñó para expresar un polipéptido zcytor17 comprendido por la metionina iniciadora pronosticada, y se truncó adyacente al dominio de transmembrana pronosticado, y con un marcador C-terminal Glu-Glu (SEC ID NO: 32).

Se generó un producto PCR de aproximadamente 1500 bp usando ZC29,451 (SEC ID NO: 33) y ZC29,124 (SEC ID NO: 34) como los cebadores PCR para añadir los sitios de restricción EcoRI y BamHI. Se usó una genoteca de cDNA interna de HPVS humano como molde, y se llevó a cabo la ampliación PCR de la siguiente manera: 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 65°C durante 1 minuto, 72°C durante 1,5 minutos, luego 72°C durante 7 minutos; impregnación a 10°C. La reacción PCR precipitó con etanol y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. El producto PCR digerido se purificó con gel en un gel de agarosa al 1,0% y se cortó la banda de aproximadamente 1500 bp. Esta banda se volvió a ampliar luego usando cebadores idénticos con los siguientes ciclos: 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 65°C durante 1 minuto, 72°C durante 3 minutos, luego 72°C durante 7 minutos; impregnación a 10°C. La

ES 2 310 660 T3

reacción PCR precipitó con etanol y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. El producto PCR digerido se purificó con gel en un gel de agarosa al 1,0% y se cortó la banda de aproximadamente 1500 bp. El DNA cortado se subclonó en el plásmido CEEpZp9 que se había cortado con EcoRI y BamHI, para generar plásmido con un receptor soluble C-terminalmente marcado con GLU-GLU para zcytor17, zcytor17CEEpZp9. El dominio 5 extracelular en el cDNA de zcytor17CEE en zcytor17CEEpZp9 tiene una mutación silenciosa que cambia de T a C en la posición 1705 de la SEC ID NO: 4 (que codifica un residuo Pro en el residuo 403 de la SEC ID NO: 5). Ya que esta mutación fue silenciosa, el cDNA de zcytor17 en zcytor17CEEpZp9 codifica el polipéptido como se muestra en la SEC ID NO: 5. Además, debido al constructo utilizado, se insertó un par de residuos Gly-Ser C-terminal al 10 extremo del dominio soluble extracelular de zcytor17 y antes del marcador C-terminal Glu-Glu (SEC ID NO: 32). Como tal, el marcador en el término C del dominio extracelular de zcytor17 fue el marcador Glu-Glu, como se muestra en la SEC ID NO: 17. El plásmido CEEpZp9 es un vector de expresión mamífera que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de metalotioneina-1 de ratón, sitios de restricción múltiples para inserción de secuencias codificantes y un terminador de la hormona del crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor SV40, 15 potenciador y origen de replicación, un gen DHFR y el terminador SV40. Usando técnicas de biología molecular convencionales, se electroporó zcytor17CEEpZp9 en células competentes DH10B (GEBCO BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se dispuso en placas LB que contenían 100 µg/ml ampicilina, y se incubó durante una noche. Las colonias se criaron por análisis de restricción, o PCR de DNA preparado a partir de 20 colonias individuales. La secuencia del inserto de clones positivos se verificó por análisis de secuencias. Se elaboró una preparación del plásmido a gran escala usando el kit QIAGEN® Maxi prep (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

Se empleó el mismo procedimiento para preparar receptores solubles zcytor17 con un marcador G-terminal His, compuesto de 6 residuos His en hilera; y un marcador C-terminal FLAG® (SEC ID NO: 36), zcytor17CFLAG. Para construir estos constructos, el vector anteriormente mencionado tiene el marcador HIS o FLAG® en lugar del marcador glu-glu (p. ej., la SEC ID NO: 17; SEC ID NO: 32 o SEC ID NO: 35).

B. Construcción de expresión mamífera del receptor soluble zcytor17 humano: zcytor17-Fc4

30 Se preparó un vector de expresión, pEZE-2 hzcytor17/Fc4, para expresar una versión soluble marcada C-terminalmente con Fc4 de hzcytor17 (zcytor17-Fc4 humano) en células PF CHO. Las células PF CHO son una línea celular de CHO interna adaptada para desarrollo en medio libre de proteína (medio ExCell 325 PF; JRH Biosciences). La línea celular de CHO interna derivó originalmente de células CHO DG44 (G. Urlaub, J. Mitchell, E. Kas, L.A. Chasin, V.L. Funanage, T.T. Myoda y J.L. Hamlin, "The Effect Of Gamma Rays at the Dihydrofolate Reductase Locus: Deletions 35 and Inversions", *Somatic Cell and Molec. Genet.*, 12: 555-566 (1986). Un fragmento de cDNA de zcytor17 que incluye la secuencia de polinucleótidos del dominio extracelular del receptor zcytor17 se condensó dentro del marco a la secuencia de polinucleótidos Fc4 (SEC ID NO: 37) para generar una fusión de zcytor17-Fc4 (SEC ED NO: 38 y SEC ID NO: 39). El vector pEZE-2 es un vector de expresión mamífera que contiene la secuencia de polinucleótidos Fc4 y un sitio de clonación que permite la construcción rápida de fusiones C-terminales Fc4, usando técnicas convencionales 40 de biología molecular.

Se generó un fragmento de 1566 pares de bases por PCR, que contenía el dominio extracelular de zcytor17 humano y los primeros dos aminoácidos de Fc4 (Glu y Pro) con sitios FseI y BglIII codificados en los extremos 5' y 3', respectivamente. Este fragmento PCR se generó usando los cebadores ZC29,157 (SEC ID NO: 40) y ZC29,150 (SEC ID NO: 41) por ampliación de un plásmido que contiene el dominio extracelular de zcytor17 humano (pZp9zcytor17CEE) (Ejemplo 8A). Las condiciones de reacción PCR fueron las siguientes: 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 60°C 45 durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos; 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos; seguidos de impregnación a 4°C. El fragmento se digirió con las endonucleasas de restricción FseI y BglIII y posteriormente se purificó con electroforesis en gel al 1% y purificación de la banda, usando el kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen). El DNA purificado 50 resultante se ligó durante 5 horas a temperatura ambiente en un vector pEZE-2 previamente digerido con FseI y BglIII que contenía Fc4 3' de los sitios FseI y BglIII.

Se electroporaron 2 µl de la mezcla de ligadura en 37 µl DH10B de *E. coli* electrocompetentes (Gibco) según las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se diluyeron en 400 µl de medio LB y se dispusieron en placas LB que contenían 100 µg/ml ampicilina. Los clones se analizaron por digestos de restricción y los clones positivos se enviaron para secuenciación de DNA, para confirmar la secuencia del constructo de fusión. Se transformó 1 microlitro de un clon positivo en 37 µl de DH10B *E. coli* electrocompetentes y se rayó en una placa de LB/amp. Se recogió una colonia sencilla de esta placa rayada para comenzar un cultivo de 250 ml LB/amp que luego se desarrolló durante una noche a 37°C con agitación a 250 rpm. Este cultivo se usó para generar 750 µg de DNA purificado usando un kit 60 Qiagen Maxi (Qiagen).

Se disponen en placas células BHK 570 (ATCC No. CRL-10314), DG-44 CHO u otras células mamíferas, a aproximadamente 1,2X10⁶ células/pocillo (placas de 6 pocillos) en 800 µl de medio libre de suero (SF) apropiado (p. ej., DMEM, Gibco/Alta Glucosa BRL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Las células se transfecan con plásmidos de expresión que contienen zcytor17CEE, zcytor17CFLAG, zcytor17CHIS o zcytor17-Fc4 (Ejemplo 8), usando Lipofectin™ (Gibco BRL), en un medio libre de suero (SF) según las instrucciones del fabricante. Se aíslan clones sencillos que expresan los receptores solubles, se criban y se desarrollan en medio de cultivo celular, y se purifican usando técnicas convencionales.

ES 2 310 660 T3

A. Expresión mamífera de receptores solubles zcytor17CEE humanos

Se dispusieron células BHK 570 (ATCC NO: CRL-10314) en matraces de cultivo celular T-75 y se dejaron desarrollar hasta aproximadamente 50 a 70% confluencia a 37°C, 5% CO₂, en medio DMEM/FBS (DMEM, Gibco/Alta Glucosa BRL, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), suero bovino fetal al 5%, L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenea, KS), piruvato sódico 1 mM (Gibco BRL)). Las células se transfectaron luego con el plásmido que contenía zcytor17CEE (Ejemplo 8A), usando Lipofectamine™ (Gibco BRL), en una formulación de medio libre de suero (SF) (DMEM, 10 mg/ml transferrina, 5 mg/ml insulina, 2 mg/ml fetuina, L-glutamina al 1% y piruvato sódico al 1%). Se diluyeron 10 microgramos del DNA plasmídico pZp9zcytor17CEE (Ejemplo 8A) en 15 ml de tubo hasta un volumen final total de 500 µl con medio SF. Se mezclaron 50 microlitos de Lipofectamine con 450 µl de medio SF. La mezcla de Lipofectamine se añadió a la mezcla de DNA y se dejó incubar aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 4 ml de medio SF a la mezcla DNA:Lipofectamine. Las células se enjuagaron una vez con 5 ml de medio SF, se aspiraron, y se añadió la mezcla DNA:Lipofectamine. Las células se incubaron a 37°C durante cinco horas, y luego se añadieron 5 ml de medio DMEM/FBS al 10%. El matraz se incubó a 37°C durante una noche, y luego las células se repartieron en el medio de selección (medio DMEM/FBS anteriormente mencionado con la adición 1 µM metotrexato, 10 µM Metotrexato (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) en placas de 150 a 1:2, 1:10 y 1:50. Aproximadamente 10 días después de la transfección, se trisnizó una placa de 150 mm de colonias resistentes a 1 µM metotrexato, las células se combinaron y una mitad de las células se volvió a disponer en placas con 10 µM metotrexato, para ampliar más la expresión de la proteína zcytor17CEE. Una muestra de medio condicionado de esta combinación de células ampliadas se ensayó para niveles de expresión, usando análisis Western y SDS-PAGE.

B. Expresión mamífera del receptor soluble zcytor17-Fc4 humano

Se linealizaron 5 réplicas de 200 µg del DNA plasmídico pEZE-2hzcytor17Fc4 (Ejemplo 8B) por digestión de restricción con FspI, una enzima de restricción que se corta una vez dentro del vector y no perturba los genes necesarios para la expresión. Se añadieron 200 µg de DNA genómico de células CHO a cada réplica como DNA portador, y luego el DNA precipitó por adición de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M, pH 5,2, y 2,2 volúmenes de etanol, seguidos de una incubación en hielo de 15 minutos y microcentrifugación a 4°C. Los sedimentos de DNA resultantes se lavaron en metanol al 70% y se secaron al aire antes de resuspenderse en 100 µl de medio de desarrollo sin selección de CHO libre de proteínas (PF) (21 g/L PF CHO Ex Cell 325/L-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco)/1x HT Suplemento (Gibco). Se añadieron 61 células de pasaje PF CHO de diez millones al DNA en 600 µl de medio de desarrollo sin selección de CHO PF y luego se electroporaron en un sistema de electroporación Gene Pulser II (BioRad) usando 950 µF capacitancia y 300 Kv, empleando una cubeta de electroporación Gene Pulser (BioRad) con un espacio de 0,4 cm. Las 5 réplicas de las células electroporadas se combinaron y seleccionaron directamente en medio HT (21 g/L PF CHO Ex Cell 325/L-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco). Las células se seleccionaron durante 15 días en medio HT antes de pasarse a 4 x 10⁵ ml a una selección MTX 50 nm. Ocho días después, las células se sembraron a 3,5X10⁵ células/ml en una selección MTX 200 mM. Al cabo de una semana, las células se sembraron a 4X10⁵ células/ml en una selección MTX 1 µM. Despues de dos semanas a 1 µM MTX, las células se sembraron a 1X10⁶ células/ml en 50 ml para generar medio condicionado. El medio condicionado de 72 horas resultante se analizó sondeando transferencias Western con un anticuerpo contra Ig humana. Las células produjeron la proteína hzcytor17/Fc4 a aproximadamente 1 mg/L.

C. Expresión mamífera a mayor escala del receptor soluble zcytor17-Fc4 humano

Se linealizaron 200 µg de DNA plasmídico pEZE-2hzcytor17Fc4 (Ejemplo SB) por digestión de restricción con FspI, una enzima de restricción que se corta una vez dentro del vector pEZE-2 y no perturba los genes necesarios para la expresión. Se añadieron 200 microgramos de DNA genómico de CHO (preparado internamente) como DNA portador, y luego precipitó DNA por adición de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M, pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol, seguidos de microcentrifugación a temperatura ambiente. Se elaboraron 5 réplicas de sedimentos de DNA y se transformaron. El sedimento de DNA resultante se lavó en etanol al 70% y se secó al aire antes de resuspenderse en 100 µl de medio de desarrollo sin selección de PF CHO (21 g/L PF CHO Ex Cell 325/L-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco)/1x HT (Gibco). Se añadieron 10 millones de células PF CHO al DNA en 600 µl de medio de desarrollo sin selección de PF CHO y luego se electroporaron en un sistema de electroporación Gene Pulser (BioRad), usando 950 µF capacitancia y 300 voltios, usando una cubeta de electroporación Gene Pulser con un espacio de 0,4 cm (BioRad). Las células electroporadas se combinaron y colocaron directamente en el medio HT de selección (21 g/L PF CHO Ex Cell 325/L-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco). Las células se seleccionaron durante 14 días en medio HT antes de pasarse a 4 x 10⁵/ml a una selección MTX 50 nm. Las células se ampliaron hasta MTX 200 nM y luego hasta MTX 1 uM. Las combinaciones de HT 50 nM, y 1 uM se sembraron a 1 x 10⁶ c/ml durante 48 horas, y luego el medio condicionado resultante se analizó sondeando las transferencias Western con un anticuerpo generado contra Ig humana.

ES 2 310 660 T3

Ejemplo 10

Purificación de receptores solubles zcytor17 de células BHK 570 y CHO

5 A. Expresión mamífera transitoria y purificación del receptor soluble zcytor17-Fc4 humano

El DNA plasmídico pEZE-2hzcytor17Fc4 (Ejemplo 8B) se introdujo en 40 maxiplacas de células BHK usando Lipofectamine (Gibco BRL) como se describe en la presente memoria, y según las instrucciones del fabricante. Las células se dejaron recuperar durante la noche, luego se enjuagaron y realimentaron con medio libre de suero (SL7V4, elaborado internamente). Despues de 72 horas, el medio se recogió y filtró, y las células se realimentaron con medio libre de suero. Despues de 72 horas, el medio se recogió y filtró nuevamente.

10 El medio condicionado libre de suero (lotes de 2 x 1,5 L) de células BHK transitoriamente transfectadas se bombeó en una columna de 1,5 ml de proteína A-agarosa en Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M. La columna se lavó ampliamente con este tampón y luego la proteína unida se eluyó con 1 ml de glicina 0,2 M, pH 2,5, NaCl 0,5 M. La proteína eluida se recogió en 0,1 ml de Tris 2 M, pH 8,5. Se recogieron alícuotas para electroforesis SDS-gel de poliacrilamida y el zcytor17-Fc se dializó durante la noche contra PBS. El receptor soluble se filtró estéril y se dispuso en alícuotas a -80°C.

20 B. Purificación de zcytor17-Fc4

Se produjo zcytor17 marcado con Fc4 carboxiterminal recombinante (Ejemplo 8 y Ejemplo 9) a partir de células CHO transfectadas. La transfección de CHO se realizó usando métodos conocidos en la técnica. Se cosecharon aproximadamente cinco litros de medio condicionado y se filtraron estériles usando filtros Nalgene de 0,2 µm.

25 La proteína se purificó a partir del medio filtrado por una combinación de cromatografía de afinidad de proteína A Poros 50 (PerSeptive Biosystems, 1-5559-01, Framingham, MA) y columna de cromatografía de exclusión de gel Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). El medio de cultivo se cargó directamente a una columna de afinidad de proteína A 10x70mm (volumen de lecho 5,5 ml) a un caudal de aproximadamente 3-10 ml/minuto. Despues del lavado en la columna para diez volúmenes de columna de PBS, la proteína unida se eluyó con cinco volúmenes de columna de glicina 0,1 M, pH 3,0 a 10 ml/minuto). Las fracciones de 2 ml cada una se recogieron en tubos que contenían 100 µl de Tris 2,0, pH 8,0, con el fin de neutralizar las proteínas eluidas. Las muestras de la columna de afinidad se analizaron por SDS-PAGE con tinte coomassie y transferencia Western para presencia de zcytor17-Fc4, usando Ig-HRP humano. Las fracciones que contenían zcytor17-Fc4 se combinaron y concentraron hasta 1-2 ml, usando el concentrador Biomax-30 (Millipore), y se cargaron a una columna de filtración de gel de 30 20x580 mm Superdex 200. Las fracciones que contenían zcytor17-Fc4 purificado se combinaron, se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm, se dividieron en alícuotas de 100 µl cada una y se congelaron a -80°C. La concentración de la proteína purificada final se determinó por el ensayo BCA (Pierce, Rockford, IL).

40 C. Análisis SDS-PAGE y transferencia Western de zcytor17/Fc4

Se analizó zcytor17-Fc4 recombinante por SDS-PAGE (Nupage 4-12%, Invitrogen, Carlsbad, CA) con el método de tinte coomassie y transferencia Western, usando Ig-HRP humano. O bien el medio condicionado o la proteína purificada se sometieron a electroforesis, usando una minicelda Xcell de Invitrogen Novex, y se transfirieron a nitrocelulosa (0,2 mm; Invitrogen, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente usando un modulo de transferencia Xcell de Novex 45 con agitación de acuerdo con las instrucciones del fabricante provistas en el manual del instrumento. La transferencia se realizó a 500 mA durante una hora en un tampón que contenía base de Tris 25 mM, glicina 200 mM y metanol al 20%. Los filtros luego se bloquearon con leche en polvo descremada al 10% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. La nitrocelulosa se enjuagó rápidamente, luego se añadió el anticuerpo humano Ig-HRP (1:2000) en PBS que contenía leche en polvo descremada al 2,5%. Las transferencias se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente, o durante una noche a 4°C, con agitación moderada. Despues de la incubación, las transferencias se lavaron tres veces durante 10 minutos cada una en PBS, luego se enjuagaron rápidamente H₂O. Las transferencias se revelaron usando reactivos de sustratos quimiluminiscentes (reactivos SuperSignal® ULTRA 1 y 2 mixtos 1:1; reactivos obtenidos de Pierce, Rockford, IL), y la señal se capturó usando el programa Lumi Analyst 3.0 de Lumi-Imager (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) para tiempos de exposición en el intervalo de 10 segundos a 5 minutos, o según fue necesario.

50 El zcytor17-Fc4 purificado apareció como una banda sola o bien con tinte coomassie o plata a aproximadamente 220 kDa bajo condiciones no reductoras, y a aproximadamente 120 kDa bajo condiciones reductoras, lo que indica la forma dimérica de zcytor17-Fc4 bajo condiciones no reductoras, según lo esperado.

60 Ejemplo 11

Ensayo que usa el receptor soluble zcytor17-Fc4 del receptor soluble zcytor17 en el ensayo de inhibición competitiva

65 Se centrifugaron células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta y células BaF3/zcytor17/OSMRbeta, y se lavaron en medio libre de mIL-3. Las células se centrifugaron y lavaron 3 veces para asegurar la eliminación de mIL-3. Las células se contaron luego en un hemacitómetro. Las células se dispusieron en placas de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo, usando el medio libre de mIL-3.

ES 2 310 660 T3

Ambos medios condicionados de la activación de células CCRF-CEM y CCRF-HSB2, y las células seleccionadas para CD3+ humana, que se describen en el Ejemplo 5, se añadieron en experimentos separados a concentraciones 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75%, 0,375% y 0,187%, con o sin receptores solubles de zcytor17 (Zcytor17-Fc4; véanse, Ejemplo 9 y Ejemplo 10) a 1-10 μ g/ml. El volumen de ensayo total fue 200 μ l.

5 Las placas de ensayo se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 3-5 días, tras los cuales se añadió Alamar Blue (Accumed) a 20 μ l/pocillo. Las placas se incubaron nuevamente a 37°C, 5% CO₂ durante 16-24 horas. Las placas se leyeron en una lectora de placas FmaxTM (Molecular Devices) como se describió en el Ejemplo 2. Los resultados demostraron la inhibición parcial del desarrollo celular con el receptor soluble zcytor17-Fc4 a 10 μ g/ml, confirmando 10 que el factor en cada muestra fue específico del receptor zcytor17.

15 Las curvas de valoración, diluyendo el receptor soluble o los heterodímeros del receptor soluble que comprendían zcytor17/OSMR y zcytor17AVS \bar{X} -1 también se realizaron usando el ensayo anteriormente mencionado para determinar si los receptores zcytor17 son capaces de inhibir el desarrollo celular, por ejemplo, a concentraciones bajas o fisiológicas.

20 Se realizaron ensayos de inhibición competitiva similares usando zcytor17lig purificado humano (Ejemplo 35) y receptores solubles en ensayos de luciferasa (Ejemplo 20). Los resultados muestran que tanto zcytor17 homodimérico como zcytor17/OSMR heterodimérico son capaces de inhibir la actividad de zcytor17lig.

Ejemplo 12

Ensayo de captura de secreción

25 Se usó un ensayo de captura de secreción para ensayar la unión del zcytor17lig a los receptores, que comprendían el receptor zcytor17, como por ejemplo el receptor zcytor17 o los heterodímeros del receptor que comprendían zcytor17/OSMR y zcytor17/WSX-1. Se transfeció el DNA plasmídico zcytor17lig a células COS, y se usó para evaluar la unión del zcytor17lig a los receptores que comprendían el receptor zcytor17 por captura de secreción, como se describe a continuación.

A. Transfección de células COS

30 La transfección de células COS se realizó de la siguiente manera: 800 ng de cDNA de zcytor17lig y 4 μ l de LipofectamineTM se mezclaron en 80 μ l de medio DMEM libre de suero (55 mg de piruvato de sodio, 146 mg L-glutamina, 5 mg transferrina, 2,5 mg insulina, 1 μ g selenio y 5 mg fetuina en 500 ml DMEM), y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se añadieron 320 μ l de medio DMEM libre de suero. Esta mezcla de 500 μ l se añadió a 2x10 células COS/pocillo dispuestas en placas de cultivo de tejido de 12 pocillos y se incubó durante 5 horas a 37°C. Luego se añadieron 500 μ l de medio FBS DMEM al 20% (100 ml FBS, 55 mg piruvato sódico y 146 mg L-glutamina en 500 ml DMEM), y las células se incubaron durante una noche.

B. Ensayo de captura de secreción

35 La captura de secreción se realizó de la siguiente manera: Se eliminaron las células del medio con PBS, luego se fijaron durante 15 minutos con formaldehído al 1,8% en PBS. Las células se lavaron luego con PBS/BSA al 0,1% y se permeabilizaron con Triton-X al 0,1% en PBS durante 15 minutos, y se lavaron nuevamente con PBS/BSA al 0,1%. Las células se bloquearon durante 1 hora con PBS/BSA al 0,1%. Dependiendo de qué receptor soluble se usó, las células se incubaron durante 1 hora en TNB con: (A) 1-3 μ g/ml proteína de fusión zcytor17-Fc4 receptor soluble zcytor17 (Ejemplo 10); o (B) 1-3 μ g/ml proteína de fusión del receptor soluble zcytor17/OSMRbeta. Las células se lavaron luego con TNT. Dependiendo de qué receptor soluble se usó (p. ej., si estaba marcado con un marcador Fc4 (SEC ID NO: 37), marcador C-terminal FLAG (SEC ID NO: 26) o marcador CEE (SEC ID NO: 32; SEC ID NO: 35)), las células se incubaron durante otra hora con: (A) Ig-HRP antihumano de cabra diluido 1:200 (específico de Fc); (B) M2-HRP diluido 1:1000; (C) anticuerpo anti-GluGlu-HRP diluido 1:1000; o (D) estreptavidina-HRP diluido 1:300 (kit NEN) en TNB, por ejemplo. Una vez más, las células se lavaron con TNT.

40 55 Para detectar unión positiva, se diluyó reactivo de fluoresceína tiramida 1:50 en tampón de dilución (kit NEN) y se incubó durante 4-6 minutos, y se lavó con TNT. Las células se conservaron con medio Vectashield Mounting (Vector Labs Burlingame, CA) diluido 1:5 en TNT. Las células se visualizaron usando un filtro FITC en un microscopio fluorescente. Los resultados de este ensayo demostraron que el zcytor17lig humano no se une a ninguno de los receptores solubles. Estos datos indican que la estructura del zcytor17lig fue sensible a la etapa de fijación en este protocolo, ya 60 que fue claramente capaz de unirse a los receptores de la superficie celular (véase, por ejemplo, datos de citometría de flujo presentados a continuación en el Ejemplo 39).

Ejemplo 13

Asignación y disposición cromosómica de la secuencia génica para zcytor17lig

65 La secuencia del gen zcytor17lig se mapeó al cromosoma humano 12 usando la versión disponible en el mercado del “Stanford G3 Radiation Hybrid Mapping Panel” (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). El “Stanford G3 RH

ES 2 310 660 T3

Panel”, contiene DNA de cada uno de los 83 clones híbridos de radiación del genoma humano completo, más dos DNA control (el donante RM y el receptor A3). Un servidor WWW públicamente disponible ubicado en Internet en www.stanford.edu permite la localización cromosómica de marcadores y genes.

5 Para el mapeo de la secuencia del gen zcytor17lig con el “Stanford G3 RH Panel”, se establecieron 20 μ l de reacciones en una placa de microvaloración de 96 pocillos compatible para PCR (Stratagene, La Jolla, CA) y se usó en un ciclador térmico “RoboCycler Gradient 96” (Stratagene). Cada una de las 95 reacciones PCR consistió en 2 μ l tampón de reacción PCR 10X (Qiagen, Inc., Valencia, CA), 1,6 μ l mezcla dNTP (2,5 mM cada una, PERKIN-ELMER, Foster City, CA), 1 μ l cebador sentido, ZC41.458 (SEC ID NO: 42), 1 μ l cebador antisentido, ZC41.457 (SEC ID NO: 43), 2 μ l “RediLoad” (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL), 0,1 μ l DNA polimerasa Qiagen HotStarTaq (5 unidades/ μ l), 25 ng de DNA de un clon híbrido individual o control y agua destilada para un volumen total de 20 μ l. Las reacciones se cubrieron con una cantidad equivalente de aceite mineral y se sellaron. Las condiciones del ciclador PCR fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 15 minutos a 95°C, 35 ciclos de una desnaturalización de 45 segundos a 95°C, una renaturalización de 1 minuto a 53°C y una extensión de 15 segundos a 72°C, seguida de 15 una extensión de 1 ciclo final de 7 minutos a 72°C. Las reacciones se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 (EM Science, Gibbstown, NJ) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

20 Los resultados mostraron el ligamiento de la secuencia del gen zcytor17lig al marcador del cromosoma 12 SHGC-83339 con un puntaje LOD de >11 y a una distancia de 17 cR_10000 desde el marcador. Este marcador posiciona al gen zcytor17lig en la región cromosómica 12q24.31.

Identificación y clonación de zcytor17lig murino

A. Identificación de zcytor17lig murino de longitud total

25 Usando la secuencia del péptido zcytor17lig humano (SEC ID NO: 2) para investigar una base de datos de DNA humana, se identificó cDNA murino, No de acceso en Genbank AK005939, como una secuencia parcial potencial para el zcytor17lig murino. La secuencia de cDNA AK005939 se usó para investigar una base de datos cDNA que contenía fragmentos genómicos murinos. Se ensambló un cóntigo genómico del zcytor17lig murino (SEC ID NO: 76). 30 La predicción del potencial codificante en este fragmento genómico con el programa Genscan reveló una probable secuencia de cDNA, con la misma estructura génica que el zcytor17lig humano. Se representa una secuencia de cDNA de murino en la SEC ID NO: 10, y la correspondiente secuencia de polipéptidos se muestra en la SEC ID NO: 11.

B. Clonación de zcytor17lig de ratón de una genoteca de cDNA de testículo de ratón por PCR

35 En base a la secuencia genómica (SEC ID NO: 76), se diseñaron dos cebadores PCR y se usaron para identificar una fuente de cDNA de zcytor17lig de ratón por PCR. Estos cebadores ZC41498 (SEC ID NO: 86) y ZC41496 (SEC ID NO: 87) se diseñaron para las regiones no traducidas 5' y 3' putativas de las secuencias de ratón (SEC ID NO: 76 y SEC ID NO: 10). Se criaron varias fuentes de cDNA por PCR, incluyendo cDNA Marthon-ready (Clontech) y 40 alícuotas de genotecas de cDNA localmente elaboradas. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1%. Las bandas del tamaño esperado se observaron en reacciones que utilizan un molde de genoteca de cDNA de testículo de ratón. Estas reacciones PCR se realizaron con éxito en volúmenes de aproximadamente 50 μ l con o sin DMSO al 10%, usando pfu turbo polimerasa (Stratagene) según las recomendaciones del fabricante; con una aplicación adicional de un arranque con exceso de temperatura de cera que emplea exceso de temperatura 50s (Molecular Bioproducts, Inc. 45 San Diego, CA). El ciclado térmico de PCR se realizó con un solo ciclo de 94°C durante 4 min; seguido de 40 ciclos de 94°C: 30 segundos, 48°C: 30 segundos, 72°C: 50 segundos; con extensión final adicional a 72°C durante 7 minutos. Las dos reacciones PCR se combinaron y purificaron usando agarosa de baja fusión y enzima de digestión de agarosa Gelase (Epicenter, Inc. Madison, WI) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

50 La determinación de la secuencia de DNA de estos productos PCR reveló una secuencia de cDNA de zcytor17 murino (SEC ID NO: 90) que comprendía un ORF idéntico a la SEC ID NO: 10, confirmando que la SEC ID NO: 10 codifica el polipéptido zcytor17lig de ratón. Los cebadores PCR, ZC41583 (SEC ID NO: 88) y ZC415S4 (SEC ID NO: 89), se usaron luego para agregar los sitios de restricción FseI y AscI, y una secuencia parcial Kozak al marco de lectura abierto de mcytor17lig y al codón de terminación (SEC ID NO: 92). Se usó un ciclador térmico Robocycler 55 40 (Stratagene) para lograr una temperatura en gradiente de temperatura de renaturalización y ciclado de la siguiente manera. Se aplicó Pfu turbo polimerasa (Stratagene) como se describió anteriormente, pero solamente en DMSO al 10%. El ciclado se realizó con un solo ciclo de 94°C durante 4 min; seguido por 20 ciclos de 94°C: 30 segundos, gradiente de 65°C a 51°C: 30 segundos, 72°C: 1 minuto; y una sola extensión a 72°C durante 7 minutos. El molde de esta segunda reacción de ciclado térmico fue 1 μ l del producto PCR inicial mcytor17lig purificado con gel anteriormente mencionado. El producto PCR resultante de las tres reacciones de temperatura más baja se combinaron y purificaron con gel, usando el método Gelase (Epicenter) anteriormente descrito. Este mcytor17lig purificado se digirió con FseI y AscI, y se ligó al vector pZP7X modificado para tener sitios FseI y AscI en su sitio de clonación. El plásmido pZP7X es un vector de expresión mamífero que contenía un casete de expresión que tenía el promotor metalotioneina-1 (MT-1) de ratón, sitios de restricción múltiples para inserción de secuencias codificantes y un terminador de la hormona de crecimiento humana. El plásmido tiene también un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión del marcador selectivo de mamífero que tiene un promotor SV40, potenciador y origen de replicación, un gen DHF y el terminador SV40. La secuencia de cDNA murino clonada en la SEC ID NO: 90, y la correspondiente secuencia de polipéptidos se muestran en la SEC ID NO: 91 (que es idéntica a la SEC ID NO: 11).

ES 2 310 660 T3

Ejemplo 15

Aislamiento del clon de cDNA de zcytor17lig de ratón de una colección de bazo de ratón activado

5 A. Fuente primaria murina utilizada para aislar zcytor17lig de ratón

Se recogen los bazos de ratones Balb/C y se trituran entre extensiones de extremo escarchado para crear una suspensión celular. Se espera que el rendimiento de las células de ratón primarias aisladas sea aproximadamente $6,4 \times 10^8$ células antes de la selección descrita a continuación.

10 Las células del bazo se suspenden en 9,6 ml de tampón MACS (PBS, EDTA al 0,5%, EDTA 2 mM). Se extraen 1,6 ml de suspensión celular y se añaden 0,4 ml de microesferas CD90 (Thy1.2) (Miltenyi Biotec). La mezcla se incuba durante 15 min. a 4°C. Estas células marcadas con esferas CD90 se lavan con 30 ml de tampón MACS, y luego se resuspenden en 2 ml de tampón MACS.

15 Se prepara una columna VS+ (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. La columna VS+ se dispone luego en un campo magnético VarioMACS™ (Miltenyi). La columna se equilibra con 5 ml de tampón MACS. Las células de ratón primarias aisladas se aplican luego a la columna. Se deja que pasen las células negativas CD90. La columna se enjuaga con 9 ml (3 X 3 ml) de tampón MACS. La columna se separa luego del imán y se dispone sobre un tubo falcon de 15 ml. Las células CD90+ se eluyen añadiendo 5 ml de tampón MACS a la columna y las células unidas se lavan usando el pistón provisto por el fabricante. La incubación de las células con las esferas magnéticas CD90, los lavados y las etapas de la columna VS+ (desde incubación hasta elución) anteriormente mencionada se repiten una vez más. Se combinan las fracciones CD90+ resultantes de las 2 separaciones de columnas. Se espera que el rendimiento de las células de bazo de ratón seleccionadas para CD90+ sea aproximadamente 1×10^8 células totales.

20 25 Se saca una muestra de las células de ratón seleccionadas para CD90+ combinadas para tinción y clasificación en un clasificador celular de anticuerpos fluorescente (FACS) a fin de evaluar su pureza. Se emplea un anticuerpo CD3ε antirratón de hámster conjugado con PE (PharMingen) para tinción y clasificación de las células seleccionadas para CD90+. Las células seleccionadas para CD90+ de ratón deben ser aproximadamente 93% células CD3+, indicando que las células son 93% células T.

30 35 Las células seleccionadas para CD90+ murinas se activan incubando 3×10^6 células/ml en RPMI + FBS al 5% + PMA 10 ng/ml y Ionomicina 0,5 µl/ml (Calbiochem) durante una noche a 37°C. El sobrenadante de estas células de ratón seleccionadas para CD90+ activadas se ensaya para actividad de zcytor17lig, como se describe a continuación. Además, las células de ratón seleccionadas para CD90+ activadas se usan para preparar una genoteca de cDNA, como se describe en el Ejemplo 16 a continuación.

Ejemplo 16

40 Clonación de zcytor17lig de ratón de una genoteca de células seleccionadas para CD90+ de ratón

El cribado de una genoteca de cDNA de células de ratón seleccionadas para CD90+ activadas puede revelar cDNA aislado que es un nuevo miembro de la familia de citocinas de cuatro hélices que codificaría el ortólogo de ratón del zcytor17lig humano. El cDNA se identifica por cribado de la hibridación.

45 A. Vector para construcción de genoteca seleccionada para CD90+

El vector, pZP7N, se usa para construcción de la genoteca seleccionada para CD3+ (Véase Ejemplo 6A).

50 B. Preparación de genoteca de cDNA de células seleccionadas para CD90+ de ratón primarias

Se aíslan por centrifugación aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células seleccionadas para CD90+ de ratón primarias, estimuladas en ionomicina/PMA (Ejemplo 15). Se aísla RNA total del sedimento celular y se convierte al cDNA bicatenario en el Ejemplo 6B. Este DNA se transfecta posteriormente a células BHK, como se describe en el Ejemplo 6B, y se evalúa la proliferación usando un ensayo de fluorescencia "Alamar blue" (Ejemplo 2B).

60 65 Para cribar la genoteca por clonación de captura de secreción, se necesita un complejo, forma ampliada de la genoteca, para transfectar células COS-7. Se disponen 4,8 millones de clones en 110 placas LB-agar de 15 cm enriquecidas con 100 µg/ml de ampicilina, 10 µg/ml de meticilina. Después de desarrollar las placas durante una noche a 37°C, las bacterias se cosechan raspando y se sedimentan. Se extrae DNA plasmídico de las bacterias sedimentadas usando Nucleobond-giga™ (Clonetech), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este plásmido se usa luego para transfectar células COS-7 en portaobjetos y se criba usando la técnica de captura de secreción descrita a continuación (Ejemplo 17).

65 C. Cribado de la genoteca de cDNA de ratón activada

Se disponen aproximadamente 5×10^5 clones en 10 placas LB/Amp Maxi. Las colonias se recogen, desnaturizan, neutralizan y entrecruzan usando el procedimiento convencional (Sambrook, J. et al. *supra*). Se marcan 50 nanogra-

ES 2 310 660 T3

mas del fragmento de PCR RACE de 300 bp 5' (Ejemplo 14) con ^{32}P , usando el kit de marcado de cebadores aleatorio Prime-It RmT (Stratagene). Los 10 filtros se hibridan con esta sonda marcada a 65°C durante una noche, usando la solución de hibridación ExpressHybTM (Clontech). Los filtros se lavan luego secuencialmente a 60°C durante 1 hora, tres veces con 0,2xSSC (NaCl 30 mM, citrato sódico 3 mM, pH 7,0), SDS al 0,1%; y luego a 65°C durante 1 hora.

5 Los filtros se exponen a -80°C durante una noche, y se revela la película de rayos X. Se sacan los tapones de agar que contienen las colonias positivas, y los clones se disponen en placas LB/Amp de 10 cm. Las colonias luego se recogen por filtración y se hibridan nuevamente, siguiendo el mismo procedimiento ya descrito. Los clones de DNA sencillos se aíslan y secuencian usando métodos estándar, para identificar el cDNA de ratón.

10 Ejemplo 17

Zcytor17lig de ratón no se une al receptor soluble zcytor17 humano en el ensayo de captura de secreción

15 Se transfeció el DNA del clon de ratón mzcytor17lig/pZP7 en células COS, y la unión de zcytor17 que comprendía los receptores solubles (receptor soluble de zcytor17 humano, zcytor17-Fc4 (Ejemplo 10), o heterodímeros del receptor soluble (zcytor17/WSX-1 o BaF3/zcytor17/OSMRbeta), a las células COS transfectadas se ensayó por un ensayo de captura de secreción (Ejemplo 12). El ensayo confirmó que el zcytor17lig de ratón se une al receptor soluble de zcytor17 humano.

20 La transfección de células COS se realizó según el Ejemplo 12, usando aproximadamente 0,7 μg de cDNA de zcytor17lig de ratón (Ejemplo 16) en 3 μl .

25 La captura de secreción se llevó a cabo según el ejemplo 12 usando, por ejemplo, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la proteína de fusión Fc4 del receptor soluble zcytor17 (Ejemplo 10) (o heterodímeros del receptor soluble que comprenden zcytor17 como se describe en esta memoria) en TNB, y Ig-HRP antihumano de cabra diluido 1:200 (específico de Fc) en TNB para el anticuerpo detectable. La unión positiva del receptor soluble zcytor17 humano a las células fijas preparadas no se detectó con el reactivo de fluoresceína tiramida como para el Ejemplo 12. Las células se conservaron y visualizaron según el Ejemplo 12.

30 Los resultados indicaron que el zcytor17lig de ratón no se une al receptor soluble zcytor17 humano (o a los heterodímeros del receptor soluble que comprenden zcytor17, como se describe en esta memoria).

Ejemplo 18

35 Expresión de zcytor17lig de ratón en células mamíferas

Expresión mamífera de zcytor17lig de ratón

40 Las células BHK 570 (ATCC No: CRL-10314) se dispusieron en placas de 10 cm para cultivo de tejido y se dejaron desarrollar hasta aproximadamente 20% confluencia durante una noche a 37°C, 5% CO₂, en medio DMEM/FBS (DMEM, Gibco/medio de Alta Glucosa BRL; Gibco BRL, Gaithersburg, MD), suero bovino fetal al 5% (Hyclone, Logan, UT), L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenexa, KS), piruvato sódico 1 mM (Gibco BRL). Las células se transfectaron luego con el plásmido mzcytor17lig/pZP7X (Ejemplo 14), usando un kit de transfección estable de mamífero Lipofectamine (GibcoBRL) según las instrucciones del fabricante.

45 Un día después de la transfección, las células se dividieron 1:10 y 1:20 en el medio de selección (medio DMEM/FBS con la adición de metotrexato 1 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)) en placas de 150 mm. El medio en las células se reemplazó con medio de selección nuevo en el día 5 pos-transfección. Aproximadamente 10 días pos-transfección, las colonias resistentes al metotrexato se tripsinizaron, y las células se combinaron y dispusieron en placas de matrices de cultivo a gran escala. Una vez que se desarrollaron las células hasta aproximadamente 90% de confluencia, se enjuagaron con PBS tres veces, y se cultivaron con medio ESTEP2 libre de suero (DMEM (Gibco BRL), 0,11 g/l piruvato de Na, 3,7 g/l NaHCO₃, 2,5 mg/l insulina, 5 mg/l transferrina, pH 7,0), medio condicionado. El medio condicionado se recogió tres días después, y se puso en un ensayo de proliferación BaF3, usando Alamar Blue, descrito en el Ejemplo 19 a continuación.

55 Ejemplo 19

Zcytor17lig de ratón no activa el receptor humano en el ensayo de BaF3 que usa Alamar Blue

60 Se evaluó la proliferación de células BaF3/zcytor17, BaF3/zcytor17/OSMRbeta y BaF3/zcytor17/WSX-1 (Ejemplo 4, y 5B) usando medio condicionado libre de suero de células BHK que expresan zcytor17lig de ratón (Ejemplo 18).

65 Se centrifugaron células BaF3/Zcytor17, BaF3/zcytor17/OSMRbeta y BaF3/zcytor17/WSX-1, se lavaron y se dispusieron en placas en medio libre de mIL-3, como se describe en el Ejemplo 5B. El medio condicionado de las células BHK que expresan zcytor17lig de ratón (Ejemplo 18) se diluyó con medio libre de mIL-3 hasta concentraciones de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% y 0,375%. El ensayo de proliferación se realizó de acuerdo con el Ejemplo 5B. Los resultados de este ensayo fueron negativos, indicando que el zcytor17lig de ratón no activa el zcytor17 humano o los complejos receptor zcytor17/OSMRbeta y zcytor17/WSX-1.

Ejemplo 20

Zcytor17lig humano activa el receptor zcytor17/OSMRbeta humano en ensayo de luciferasa

5 A. *Construcción de la línea celular BaF3/KZX34/zcytor17*

Se construyó el plásmido KZ134 con los oligonucleótidos complementarios ZC12/749 (SEC ID NO: 44) y ZC 12,748 (SEC ID NO: 45) que contienen los elementos de unión al factor de transcripción STAT de 4 genes, que incluye un elemento inducible c-fos Sis modificado (m67SEE, o hSIE) (Sadowski, H. *et al.*, *Science* **261**:1739-1744, 1993), el gen p21 SIE1 de p21 WAF1 (Chin, Y. *et al.*, *Science* **272**:719-722, 1996), el elemento de respuesta de la glándula mamaria del gen de β -caseína (Schmitt-Ney, M. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **11**:3745-3755, 1991), y un elemento inducible STAT del gen Fcg RI, (Seidel, H. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.* **92**:3041-3045, 1995). Estos oligonucleótidos contienen extremos compatibles Asp718-XhoI y se ligaron, usando métodos convencionales, a un vector indicador de luciferasa de luciérnaga receptor con un promotor c-fos (Poulsen, L.K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **273**:6229-6232, 1998) 10 digerido con las mismas enzimas y contienen un marcador seleccionable de neomicina. El plásmido KZ134 se usó 15 para transfectar establemente células BaF3, usando métodos de transfección y selección convencionales, para elaborar la línea celular BaF3/KZ134.

Se construyó una línea celular indicadora estable BaF3/KZ134, que expresa el receptor zcytor17 o el receptor zcytor17/OSMRbeta de longitud total, según el Ejemplo 4. Los clones se diluyeron, se dispusieron en placas y se seleccionaron usando técnicas convencionales. Los clones se criaron por ensayo de luciferasa (véase Ejemplo 20B a 20 continuación), usando el medio condicionado zcytor17lig humano o la proteína zcytor17lig purificada (véase el Ejemplo 35 a continuación) como inductor. Se seleccionaron los clones con la respuesta de luciferasa más alta (vía luciferasa STAT) y el fondo más bajo. Se seleccionaron las líneas celulares transfectantes estables. Las líneas celulares se denominaron BaF3/KZ134/zcytor17 o BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta, dependiendo de los receptores transfectados a la 25 línea celular.

De modo similar, también se construyeron las líneas celulares BHK, usando el método descrito en esta memoria, y se usaron en los ensayos de luciferasa aquí descritos. Las líneas celulares se denominaron BHK/KZ134/zcytor17 o 30 BHK7KZ134/zcytor17/OSMRbeta, dependiendo de los receptores transfectados a la línea celular.

B. *Zcytor17lig humano activa el receptor zcytor17 humano en el ensayo de luciferasa de BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta o BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta*

35 Se centrifugaron células BaF3/KZ134/zcytor17 y BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta, y se lavaron en medio libre de mIL-3. Las células se centrifugaron y lavaron 3 veces para asegurar la eliminación de mIL-3. Las células se contaron luego en un hematocímetro. Las células se dispusieron en placas de 96 pocillos a aproximadamente 30.000 células por pocillo en un volumen de 100 μ l por pocillo, usando el medio libre de mIL-3. Se empleó el mismo procedimiento para células BaF3/KZ134 no transfectadas, para uso como control en el ensayo subsiguiente. Las células 40 BHK/KZ134/zcytor17 o BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta se dispusieron en placas de 96 pocillos a 15.000 células por pocillo en 100 μ l de medio. Se utilizaron células BHK/KZ134 parentales como control.

La activación de STAT de las células BaF3/KZ134/Zcytor17, BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta, BHK/KZ134/zcytor17 o BHJC/KZ134/zcytor17/OSMRbeta se evaluó usando (1) medio condicionado de células BHK570 transfectadas con zcytor17lig humano (Ejemplo 7), (2) medio condicionado de células BHK570 transfectadas con zcytor17lig de ratón (Ejemplo 18), (3) zcytor17lig humano purificado (Ejemplo 35) o (4) medio libre de mIL-3 para medir la respuesta del control del medio solamente. Se diluyó medio condicionado con medio libre de mIL-3 RPMI hasta concentraciones de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% y 0,375%. Se diluyó zcytor17lig humano purificado hasta una concentración de 1200, 600, 300, 150, 75, 37,5, 18,75 ó 9,4 pM. Se añadieron 100 microlitros 50 del medio condicionado diluido o proteína a las células BaF3/KZ134/Zcytor17, BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta, BHK/KZ134/zcytor17 o BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta. El ensayo que usa el medio condicionado se realizó en paralelo a células BaF3/KZ134 o BHK/KZ134 no transfectadas, como control. El volumen de ensayo total fue 200 μ l. Las placas de ensayo se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 24 horas, momento en el cual las células BaF3 se sedimentaron por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min., y luego el medio se aspiró, y se añadieron 25 μ l de tampon de lisis (Promega). Para las líneas celulares BHK, la etapa de centrifugación no fue necesaria, ya que las células son adherentes. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, las placas se midieron para activación del constructo indicador STAT, leyéndolas en un luminómetro (Labsystems Luminoskan, modelo RS) que añadió 40 μ l de sustrato 55 del ensayo de luciferasa (Promega) a una integración de cinco segundos.

60 Los resultados de este ensayo confirmaron que la respuesta del indicador STAT de las células BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta y BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta al zcytor17lig humano, en comparación con las células BaF3/KZ134/zcytor17, las células BHK/KZ134/zcytor17 o las células no transfectadas BaF3/KZ134 o BHK/KZ134 control, demostraron que la respuesta fue mediada por los receptores zcytor17/OSMRbeta. Los resultados también demostraron que el zcytor17lig de ratón no activa el ensayo indicador STAT a través del complejo receptor humano.

65

ES 2 310 660 T3

Ejemplo 21

Zcytor17lig de ratón es activo en el ensayo de médula ósea de ratón

5 A. Aislamiento de células de médula de baja densidad, no adherentes

Se obtiene una aspiración reciente de fémur de ratón (médula) de ratones macho Balb/C o C57BL/6 de 6-10 semanas de vida. La médula se lava con RPMI+10% FBS (JRH, Lenexa KS; Hyclone, Logan UT) y se suspende en RPMI+ FBS al 10% como suspensión celular de médula completa. La suspensión celular de médula completa se somete luego a un gradiente de densidad (Nycoprep, 1.077, Animal; Gibco BRL) para enriquecer las células de baja densidad, principalmente mononucleares, de la siguiente manera: la suspensión celular de médula completa (aproximadamente 8 ml) se introduce cautelosamente con pipeta a la parte superior de aproximadamente 5 ml de solución en gradiente Nycoprep en un tubo cónico de 15 ml, y luego se centrifuga a 600X g durante 20 minutos. La capa de la interface, que contiene las células mononucleares de baja densidad, se elimina luego, se lava con exceso de RPMI+ FBS al 10% y se sedimenta por centrifugación a 400X g durante 5-10 minutos. Este sedimento se resuspende en RPMI +FBS al 10% y se coloca en un matraz T-75 a aproximadamente 10^6 células/ml, y se incuba a 37°C 5% CO₂ durante aproximadamente 2 horas. Las células resultantes en suspensión son células de médula de baja densidad no adherentes (NA LD).

20 B. Ensayo de 96 pocillos

Se disponen células de médula NA LD a 25.000 hasta 45.000 células/pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos en RPMI + FBS al 10% + 1 ng/mL factor de células madre de ratón (mSCF) (R&D Systems, Minneapolis, MN), más medio condicionado al 5% de uno de los siguientes: (1) células BHK 570 que expresan zcytor17lig de ratón (Ejemplo 18), (2) células BHK 570 que expresan zcytor17lig humano (Ejemplo 7) o (3) células BHK 570 control que contienen vector y que no expresan ningún ligando. Estas células se someten luego a una diversidad de tratamientos de citocinas para ensayar la expansión o diferenciación de células hematopoyéticas de la médula. Para los ensayos, las células de médula de ratón NA LD dispuestas en placas se someten a Interleucina 15 humana (hIL-15) (R&D Systems), o a una de un panel de otras citocinas (R&D Systems). La dilución en serie de hIL-15, u otras citocinas, se ensaya con una dilución en serie doble de aproximadamente 50 ng/ml hasta aproximadamente 0,5 ng/ml concentración. Después de 8 a 12 días, se asignan los puntajes a los ensayos de 96 pocillos para proliferación celular por el ensayo Alamar blue, como se describe en el Ejemplo 5B.

C. Resultados del ensayo de médula NA LD de 96 pocillos

35 El medio condicionado de células BHK que expresan zcytor17lig de ratón y humano puede promover la expansión de una población de células hematopoyéticas, solo o en sinergia con otras citocinas de la médula de ratón NA LD, en comparación con el medio condicionado BHK control. La población de células hematopoyéticas expandidas por el zcytor17lig de ratón con o sin otras citocinas, y aquellas células hematopoyéticas expandidas por el zcytor17lig humano con o sin otras citocinas, se propagan más en cultivo celular. Estas células hematopoyéticas se tiñen con 40 un anticuerpo de linfocitos citolíticos naturales anti-Pan marcados con Ficoeritritina (PharMingen) y se someten a análisis de citometría de flujo, que demostró que las células expandidas se tiñen positivamente para este marcador de linfocitos citolíticos naturales (NK). De modo similar, otros marcadores celulares hematopoyéticos se pueden usar para determinar la expansión, por ejemplo, de células T CD4+ o CD8+, otras poblaciones de células T, células B y otros marcadores celulares inmunitarios.

45 El mismo ensayo de 96 pocillos se lleva a cabo usando células de médula humana nuevas adquiridas de Poietic Technologies, Gaithersburg, MD. De nuevo, un resultado positivo muestra que el zcytor17lig solo o en sinergia con otras citocinas, el zcytor17lig de ratón o humano pueden expandir una población de células hematopoyéticas que se tiñen positivamente para marcadores celulares específicos, como se analizó anteriormente.

50 Ejemplo 22

Constructos para generar ratones transgénicos zcytor17lig

55 A. Constructo para expresar zcytor17lig humano del promotor MT-1

Se diseñaron oligonucleótidos para generar un fragmento PCR que contenía una secuencia Kozak de consenso y la región codificante de zcytor17lig humano. Estos oligonucleótidos se diseñaron con un sitio FseI en el extremo 5' y un sitio AscI en el extremo 3' para facilitar la clonación en (a) pMT12-8, un vector transgénico estándar, o (b) pKF051, un vector transgénico específico de linfoides (Ejemplo 22B).

60 Las reacciones PCR se llevan a cabo con aproximadamente 200 ng de molde zcytor17lig humano (SEC ID NO: 1) y oligonucleótidos diseñados para ampliar la porción activa o de longitud total del zcytor17lig. Las condiciones de reacción PCR se determinan usando métodos conocidos en la técnica. Los productos PCR se separan por electroforesis de gel de agarosa y se purifican usando un kit de extracción de gel QiaQuick™ (Qiagen). El fragmento de DNA aislado, de tamaño correcto, se digiere con FseI y AscI (Boerhinger-Mannheim), se precipita con etanol y se liga en pMT12-8 previamente digerido con FseI y AscI. El plásmido pMT12-8, diseñado para expresar un gen de interés en hígado y otros tejidos de ratón transgénico, contiene un casete de expresión flanqueado por 10 kb de DNA MT-1 5' y 7 kb

ES 2 310 660 T3

de DNA MT-1 3'. El casete de expresión comprende el promotor MT-1, la insulina de rata intrón D, un polienlazador para la inserción del clon deseado y la secuencia poly A de la hormona de crecimiento humana (hGH).

- Se electropora aproximadamente un microlitro de cada reacción de ligadura en células competentes DHIOB 5 ElectroMaxTM (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se coloca en placas LB que contienen 100 µg/ml ampicilina, y se incuba durante una noche. Las colonias se recogen y se desarrollan en medio LB que contiene 100 µg/ml ampicilina. Se prepara DNA miniprep a partir de los clones obtenidos y se criba el inserto de zcytor17lig humano o digestión de restricción con EcoRI solo, o FseI y AscI combinados, y se somete luego a electroforesis en gel de agarosa. Se llevan a cabo maxipreparaciones del pMT-zcytor17lig humano correcto. 10 Un fragmento SalI que contiene las secuencias flanco 5' y 3', el promotor MT-1, la insulina de rata II intrón, cDNA zcytor17lig humano y la secuencia poly A hGH se prepara para microinyección a oocitos murinos fertilizados. La microinyección y la producción de ratones transgénicos se realiza como se describe en Hogan, B. *et al. Manipulating the Mouse Embryo*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1994.

15 B. Constructo para expresión de zcytor17lig humano del promotor E μ LCK específico de linfoides

Se designan oligonucleótidos para generar un fragmento PCR que contiene una secuencia Kozak de consenso y la 20 región codificante de zcytor17lig humano. Estos oligonucleótidos se diseñan con un sitio FseI en el extremo 5' y un sitio AscI en el extremo 3' para facilitar la clonación en pKFO51, un vector transgénico específico de linfoides.

- Las reacciones PCR se llevan a cabo con aproximadamente 200 ng de molde zcytor17lig humano (SEC ID NO: 1) y oligonucleótidos diseñados para ampliar la porción activa o de longitud total del zcytor17lig. Se lleva a cabo una reacción PCR usando métodos conocidos en la técnica. El fragmento de DNA aislado, de tamaño correcto, se digiere con FseI y AscI (Boehringer-Mannheim), se precipita con etanol y se liga a pKFO51 previamente digerido con FseI y 25 AscI. El vector pKFO51 transgénico deriva de p1026X (Iritani, B.M., *et al.*, *EMBO J.* 16:7019-31, 1997) y contiene el promotor proximal Ick específico de células T, la inmunoglobulina específica de células B/T, el potenciador de cadena pesada μ de inmunoglobulina, un polienlazador para la inserción del clon deseado, y un gen hGH mutado que codifica la proteína de la hormona del crecimiento humana (que provee intrones 3' y una señal de poliadenilación).

- 30 Aproximadamente 1 microlitro de cada reacción de ligadura se electropora, se dispone en placas, se recogen los clones y se criba el inserto zcytor17lig humano por digestión de restricción como se describió anteriormente. Se verifica un clon correcto de pKFO51-zcytor17lig secuenciando, y se realiza una maxipreparación de este clon. Un fragmento NotI, que contiene el promotor lck proximal y el potenciador μ de inmunoglobulina (E μ LCK), cDNA de zcytor17lig y el gen hGH mutado se prepara para microinyección a oocitos de murino fertilizados.

35 C. Constructo para expresar zcytor17lig de ratón del promotor EF1alfa

- Los cebadores ZC41,498 (SEC ID NO: 86) y ZC41,496 (SEC ID NO: 87) se usaron para PCR de un molde de 40 la genoteca de cDNA de testículo de ratón. Estas reacciones PCR se llevaron a cabo exitosamente en volúmenes de aproximadamente 50 µl con o sin DMSO al 10%, usando pfu turbo polimerasa (Stratagene) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante; con una aplicación adicional de arranque con exceso de temperatura de cera que emplea exceso de temperatura 50s (Molecular Bioproducts, Inc. San Diego, CA). El ciclado térmico de PCR se efectuó con un solo ciclo de 94°C durante 4 min; seguido de 40 ciclos de 94°C: 30 segundos, 48°C: 30 segundos, 72°C: 50 segundos; con extensión adicional final a 72°C durante 7 minutos. Las dos reacciones PCR se combinaron y purificaron 45 usando agarosa de baja fusión y enzima de digestión de agarosa Gelase (Epicenter, Inc. Madison, WI) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los productos PCR con secuencias de DNA revelaron una secuencia de cDNA zcytor17 murina (SEC ID NO: 90) que comprendía un ORF idéntico a la SEC ID NO: 10, confirmando que la SEC ID NO: 10 codificaba el polipéptido zcytor17lig de ratón. Los cebadores PCR, ZC41583 (SEC ID NO: 88) y ZC41584 (SEC ID NO: 89), se emplearon luego para añadir los sitios de restricción FseI y AscI, y una secuencia Kozak parcial 50 al marco de lectura abierto de mcytor17lig y al codón de terminación (SEC ID NO: 92). Se usó un ciclador térmico Robocycler 40 (Stratagene) para pasar un gradiente de temperatura de temperaturas de renaturalización y ciclado de la siguiente manera. Se aplicó Pfu turbo polimerasa (Stratagene) como se describió anteriormente, pero solamente en DMSO al 10%. El ciclado se llevó a cabo con un solo ciclo de 94°C durante 4 min; seguido de 20 ciclos de 94°C: 30 segundos, gradiente de 65°C a 51°C: 30 segundos, 72°C: 1 minuto; y una sola extensión a 72°C durante 7 minutos. El 55 molde de esta segunda reacción de ciclado térmico fue 1 µl del producto PCR purificado con gel inicial mcytor17lig anterior. El producto PCR resultante de las tres reacciones más bajas se combinó y purificó en gel usando el método Gelase (Epicenter) ya descrito. Este fragmento purificado se digirió luego con FseI y AscI, y se ligó al vector pZP7X modificado para tener los sitios FseI y AscI en su sitio de clonación. Esto se envió a secuenciación para confirmar la secuencia correcta. La secuencia de cDNA murino clonado se representa en la SEC ID NO: 90, y la correspondiente 60 secuencia de polipéptidos se muestra en la SEC ID NO: 91 (que es idéntica a la SEC ID NO: 11).

- El fragmento de DNA aislado, de tamaño correcto, digerido con FseI y AscI (Boehringer-Mannheim) se subclonó 65 en un plásmido que contenía el promotor EF1alfa previamente digerido con FseI y AscI. Se realizaron las maxipreparaciones del zcytor17lig de ratón EF1alfa. El casete de expresión contiene el promotor EF1alfa (con un sitio FseI eliminado), el intrón EF1alfa, el sitio tipo SUR IRES para facilitar la expresión, un polienlazador flanqueado con sitios de insulina II de rata en el extremo 5' que añade los sitios FseI, PmeI, AscI, para inserción del clon deseado y la secuencia poly A de la hormona del crecimiento humana (hGH). Un fragmento NotI de 7,5 kb que contiene el casete de expresión del promotor EF1alfa y zcytor17lig de ratón se preparó para usarse para microinyección a oocitos murinos

ES 2 310 660 T3

fertilizados. El plásmido EF1alfa se obtuvo de Louis-Marie del Laboratoire de Differentiation Cellulaire, como se describe en Taboit-Dameron *et al.*, 1999, *Transgenic Research* 8:223-235.

D. Constructo para expresar *zcytor17lig* de ratón del promotor *E μ LCK* específico de linfoides

5 Se diseñaron oligonucleótidos para generar un fragmento PCR que contenía una secuencia Kozak de consenso y la región codificante *zcytor17lig* de ratón. Estos oligonucleótidos se diseñaron con un sitio *FseI* en el extremo 5' y un sitio *AscI* en el extremo 3' para facilitar la clonación a *pKFO51* (véase el Ejemplo 22B anterior).

10 El fragmento de DNA de *zcytor17lig* aislado, del tamaño correcto, usado en los constructos EF1alfa, digerido con *FseI* y *AscI* (Boehringer-Mannheim), se subclonó en un plásmido que contenía *pKF051*, un vector transgénico 15 específico de linfoides. El vector transgénico *pKFO51* deriva de *p1026X* (Iritani, B.M., *et al.*, *EMBO J.*, 16:7019-31, 1997) y contiene el promotor proximal *Ick* específico de células T, el potenciador de cadena pesada de inmunoglobulina μ específica de células B/T, un polienlazador para la inserción del clon deseado y un gen *hGH* mutado que codifica una 20 proteína de la hormona del crecimiento humana inactiva (proporcionando intrones 3' y una señal de poliadenilación). Se preparó un fragmento *NotI* de 6,5 kb, que contenía el promotor proximal *Ick* y el potenciador de inmunoglobulina μ (*E μ LCK*), cDNA de *zcytor17lig* de ratón y el gen *hGH* mutado, para usar para microinyección a oocitos murinos fertilizados (Ejemplo 41).

20 Ejemplo 23

Construcción de vectores de expresión mamífera que expresan *zcytor17lig-CEE*

A. Construcción de *zCytor17Lig-CEE/p2MP21*

25 Se construyó un plásmido de expresión que contenía todo o parte de un polinucleótido que codifica el *zCytor17lig* humano, vía recombinación homóloga. El plásmido se denominó *zCytor17Lig-CEE/pZMP21*.

30 La construcción de *zCytor17Lig-CEE/pZMP21* se logra generando un fragmento *zCytor17Lig-CEE* (SEC ID NO: 95) (su correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID IG:96), usando ampliación PCR. El molde de DNA utilizado para la producción del fragmento *zCytor17Lig-CEE* fue *zCytor17Lig/pZP7nx*. Los cebadores utilizados para la producción del fragmento *zCytor17Lig-CEE* fueron: (1) *ZC41607* (SEC ID NO: 97) (secuencia sentido), que incluye desde el extremo 5' hasta el extremo 3': 28 bp de la secuencia flanqueadora del vector (5' del inserto) y 21 bp correspondientes a la secuencia 5' de *zCytor17Lig*; y (2) *ZC41605* (SEC ID NO: 98) (secuencia antisentido), que incluye desde el extremo 5' al extremo 3': 37 bp de la secuencia flanqueadora del vector (3' del inserto), 3 bp del codón finalizador, 21 bp que codifican un marcador C-terminal EE y 21 bp correspondientes al extremo 3' de la secuencia *zCytor17Lig*. El fragmento resultante de la ampliación PCR anterior es una copia del molde *zCytor17Lig* con la adición de un marcador C-terminal EE, lo que proporciona un producto final *zCytor17Lig-CEE*.

40 Las reacciones PCR se realizaron de la siguiente manera: A un volumen final de 100 μ l se le añadieron: 10 μ l de tampón de reacción de polimerasa Taq 10x con MgCl 15 mM (Gibco), 1 μ l de DNA Polimerasa Taq (5 unidades/ μ l, Gibco), 3 μ l de dNTP 10 mM, 78 μ l dH2O, 3 μ l de un stock 20 pmol/ μ l del cebador *ZC41607* (SEC ID NO: 97) 45 3 μ l de un stock 20 pmol/ μ l del cebador *ZC43605* (SEC ID NO: 98) y 2 μ l de un stock 0,13 μ g/ μ l del DNA del molde *zCytor17Lig*. Se añadió a la mezcla un volumen equivalente a 50 μ l de aceite mineral. La reacción se calentó hasta 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto; 55°C durante 2 minutos; 72°C durante 3 minutos; seguidos de una extensión de 10 minutos a 72°C, y se mantuvo a 4°C hasta que se recogió la reacción.

50 El plásmido *pZMP21* se digirió por restricción con la enzima *BgIII*, se limpió con un kit de purificación PCR QiaQuick (Qiagen), usando un protocolo de microcentrifugación, y se usó para recombinación con el fragmento PCR. Se construyó el plásmido *pZMP21* a partir de *pZMP20*, que se construyó a partir de *pZP9* (depositado en The American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y designado con el No. 98668) con elementos genéticos de levadura tomados de *pRS316* (depositado en The American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y designado con el No. 77145), un elemento IRES de poliovirus y 55 el dominio extracelular de *CD8*, truncado en el extremo carboxiterminal del dominio de transmembrana. *PZMP21* es un vector de expresión mamífera que contiene un casete de expresión que tiene el promotor MPSV, intrón del péptido de señal de inmunoglobulina, múltiples sitios de restricción de secuencias codificantes, un codón finalizador y un terminador de la hormona del crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor SV40, potenciador y origen de replicación, un gen DHFR, el terminador SV40, como también las secuencias URA3 y CEN-ARS necesarias para la selección y replicación en *S. cerevisiae*.

60 Se combinaron independientemente 50 microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con 100 ng de plásmido cortado, 5 μ l de la mezcla PCR previamente descrita, y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla levadura/DNA se electropulsó a 0,75 kV (5 kV/cm), ohms infinito, 25 μ F. A cada cubeta se le habían añadido 600 μ l de sorbitol 1,2 M, y la levadura se dispuso en dos placas URA-D en una alícuota de 100 μ l y en una alícuota de 300 μ l y se incubó a 30°C. Despues de aproximadamente 72 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una de las placas se resuspendieron en 1 ml de H₂O y se centrifugaron brevemente para sedimentar las células

ES 2 310 660 T3

de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 500 μ l de tampón de lisis (Triton X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Los 500 μ l de la mezcla de lisis se añadieron a un tubo Eppendorf que contenía 300 μ l esferas de vidrio lavadas con ácido, 600 μ m y 300 μ l fenol-cloroformo. Se agitó en vórtex durante dos o tres intervalos de 1 minuto, luego se centrifugó durante 5 minutos en una máquina centrífuga Eppendorf a velocidad máxima. Se transfirieron 300 microlitros de la fase acuosa a un tubo nuevo, y precipitó el DNA con 600 μ l de etanol al 100% (EtOH), seguido de centrifugación durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de DNA se lavó luego con 500 μ l de EtOH al 70%, luego se centrifugó durante 1 minuto a 4°C. El sedimento de DNA se resuspendió en 30 μ l de H₂O.

Se realizó la transformación de células de *E. coli* competentes (MC1061) con 5 μ l de prep de DNA de levadura y 50 μ l de células MC1061. Las células se electropulsaron a 2,0 kV, 25 μ F y 400 ohms(Ω). Tras la electroporación, se añadieron 600 μ l SOC (2% Bacto' Tryptone (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5% (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM). Las células de *E.coli* electroporadas se dispusieron en dos placas de caldo LB AMP LB (Lennox) en alícuotas de 200 μ l y 50 μ l (1,8% Bacto Agar (Difco), 100 mg/L Ampicilina). Las placas se incubaron boca abajo durante aproximadamente 24 horas a 37°C. Se seleccionaron aleatoriamente tres colonias resistentes a Ampicilina y se tomaron para análisis de secuencias del inserto. Se aisló DNA plasmídico a gran escala de un clon con la secuencia confirmada, usando el kit Qiagen Maxi (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

B. Expresión mamífera de zcytor17lig humano

Se produjo la proteína zCytor17Lig de longitud total en células BHK transfectadas con zCytor17Lig-CEE/pZMP21 (Ejemplo 23A). Las células BHK 570 (ATCC CRL-10314) se dispusieron en matraces para cultivo de tejido T75 y se dejaron desarrollar hasta aproximadamente 50 a 70% confluencia a 37°C, 5% CO₂, en medio de desarrollo (SL7V4, FBS al 5%, pen/estrep al 1%). Las células luego se transfecaron con zCytor17Lig-CEE/pZMP21 por transfección mediada por liposomas (usando LipofectamineTM, Life Technologies), en medio libre de suero (SF) (SL7V4). El plásmido (16 μ g) se diluyó en tubos de 1,5 ml hasta un volumen final total de 640 μ l con medio SF. Se mezclaron 35 microlitros de la mezcla de lípidos con 605 μ l de medio, y la mezcla resultante se dejó incubar aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron luego 5 ml de medio SF a la mezcla DNA:lípido. Las células se enjuagaron una vez con 10 ml de PBS, el PBS se decantó y se añadió la mezcla DNA:lípido. Las células se incubaron a 37°C durante cinco horas, luego se añadieron 15 ml de medio (SL7V4, FBS al 5%, pen/estrep al 1%) a cada placa. Las placas se incubaron a 37°C durante una noche y la mezcla DNA:lípido se reemplazó con medio de selección (SL7V4, FBS al 5%, pen/estrep al 1%, 1 μ M metotrexato) al día siguiente. Aproximadamente 10 días después de la transfección, las colonias resistentes al metotrexato del matraz de transfección de T75 se tripsinizaron, y las células se combinaron y colocaron en un matraz T-162, y se transfirieron para cultivo a gran escala.

Ejemplo 24

Expresión del receptor soluble zcytor17 en *E. coli*

A. Construcción del vector de expresión pCMH01 que expresa el polipéptido de fusión huzcytor17/MBP-6H

Se construyó un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codifica un receptor soluble zcytor17 condensado C-terminalmente a la proteína de unión de maltosa (MBP), vía recombinación homóloga. El polipéptido de fusión contiene una porción MBP de aproximadamente 388 aminoácidos N-terminal condensada a cualquiera de los receptores solubles zcytor17 descritos en la presente memoria. Se aisló un fragmento de cDNA de zcytor17 (SEC ID NO: 4), usando PCR como se describe aquí. Se usaron dos cebadores en la producción del fragmento zcytor17 en una reacción PCR convencional: (1) uno contenía aproximadamente 40 bp de la secuencia flanqueadora del vector y aproximadamente 25 bp correspondientes al término amino del zcytor17, y (2) el otro contenía aproximadamente 40 bp del extremo 3' correspondientes a la secuencia flanqueadora del vector y aproximadamente 25 bp correspondientes al término carboxilo del zcytor17. Se prepararon 2 μ l de la reacción PCR de 100 μ l en un gel de agarosa al 1,0% con 1 x tampón TBE para análisis, y se observó el fragmento aproximadamente esperado. El resto de la reacción PCR se combinó con el segundo tubo PCR y precipitó con 400 μ l de etanol absoluto. El DNA precipitado se usó para recombinar en el vector receptor cortado con SmaI, pTAPHO, para producir el constructo que codifica la fusión MBP-zcytor17, como se describe a continuación.

El plásmido pTAPHO derivó de los plásmidos pRS316 y pMAL-c2. El plásmido pRS316 es un vector transportador de *Saccharomyces cerevisiae* (Hieter P. y Sikorski, R. *Genetics* 122:19-27, 1989). pMAL-C2 (NEB) es un plásmido de expresión de *E. coli*. Porta el promotor *tac* que conduce *MalE* (gen que codifica MBP) seguido por su marcador His, sitio n de escisión de trombina, un sitio de clonación y el terminador *rrnB*. El vector pTAPHO se construyó usando recombinación homóloga de levadura. Se recombinaron 100 ng de pMAL-c2 cortado con EcoR1 con 1 μ g de pRS316 cortado con PvuI, 1 μ g enlazador y 1 μ g pRS315 cortado con Scal/EcoR1. El enlazador consistía en los oligos zc19,372 (SEC ID NO: 157) (100 pmol): zc19,351 (SEC ID NO: 158) (1 pmol): zc19,352 (SEC ID NO: 159) (1 pmol) y zc19,371 (SEC ID NO: 160) (100 pmol) 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 impregnación a 4°C. Los productos PCR se concentraron vía precipitación de etanol al 100%.

Se combinaron 100 microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con 10 μ l de una mezcla que contenía aproximadamente 1 μ g del inserto zcytor17 humano, y 100 ng del vector pTAP170 digerido con SmaI, y se

ES 2 310 660 T3

transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla levadura/DNA se electropulsó a 0,75 kV (5 kV/cm), ohms infinito, 25 μ F. A cada cubeta se le añadieron 600 μ l de sorbitol 1,2 M. La levadura se dispuso luego en dos placas URA D en alícuotas de 300 μ l y se incubó a 30°C.

5 Despues de aproximadamente 48 horas, se recogieron los transformantes de levadura Ura+ de una de las placas, se aisló DNA y se transformó en células de *E. coli* electrocompetentes (p. ej., MC1061, Casadaban *et. al. J. Mol. Biol.* 138, 179-207), y se dispuso en placas MM/CA +KAN de 25 μ g/L (Pryor y Leiting, *Protein Expression and Purification* 10:309-319, 1997) usando procedimientos convencionales. Las células se desarrollaron en MM/CA con 25 μ g/ml Kanomiacina durante dos horas, agitando a 37°C. Se indujo 1 ml del cultivo con IPTG 1 mM. Dos a cuatro
10 horas después, los 250 μ l de cada cultivo se mezclaron con 250 μ l de esferas de vidrio lavadas con ácido y 250 μ l tampón Thorner con pME al 5% y tinte (8M urea, Tris 100 mM, pH7,0, glicerol al 10%, EDTA 2 mM, SDS al 5%). Las muestras se agitaron en vórtex durante un minuto y se calentaron hasta 65°C durante 10 minutos. Se cargaron 20 μ l por senda en un gel PAGE al 4%-12% (NOVEX). Los geles se prepararon en un tampón 1XMES. Los clones positivos se designaron pCMHOI y se sometieron a análisis de secuencias.

15 Se usó un microlitro de DNA de secuenciación para transformar la cepa BL21. Las células se electropulsaron a 2,0 kV, 25 μ F y 400 ohms. Despues de la electroporación, se añadieron 0,6 ml MM/CA con 25 μ g/L Kanomiacina. Las células se desarrollaron en MM/CA y se indujeron con IPTG como se describió anteriormente. Los clones positivos se usaron para aumentar la purificación de proteína de la proteína de fusión huzcytor17/MBP-6H, usando técnicas convencionales.

*B. Purificación del receptor soluble huzcytor17/MBP-6H a partir de fermentación de *E. coli**

20 A menos que se indique lo contrario, todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C. Se usó el siguiente procedimiento para la purificación del polipéptido receptor soluble huzcytor17/MBP-6H recombinante. Se construyeron células de *E. coli* que contenían el constructo pCMHOI y que expresaban el polipéptido receptor soluble huzcytor17/MBP-6H, usando métodos de biología molecular convencionales, y se cultivaron en SuperBroth II (12 g/L Casien, 24 g/L extracto de levadura, 11,4 g/L fosfato de di-potasio, 1,7 g/L fosfato de monopotasio; Becton Dickenson, Cockeysville, MD). Las células resultantes se cosecharon y congelaron en glicerol al 0,5%. Se usaron 20 gramos de las células congeladas para purificación de proteínas.

25 Las células descongeladas se resuspendieron en 500 mL tampón de equilibrio Amylose (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0). Se usó un sistema de ruptura de células de prensa francesa (Constant Systems Ltd., Warwick, Reino Unido) con una temperatura establecida de -7°C a -10°C y 30K PSI para lisar las células. Las células resuspendidas se controlaron para ruptura por lecturas A_{600} antes y después del ciclado a través de la prensa francesa. La suspensión celular lisada se sedimentó a 10.000G durante 30 minutos. Se cosechó el sobrenadante del residuo celular para purificación de proteínas.

30 Se vertieron 25 ml de resina Amylose (New England Biolabs, Beverly, MA) en Bio-Rad, columna de vidrio de 2,5 cm D x 10 cm H. La columna se llenó y equilibró por gravedad con 10 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrio Amylose. El sobrenadante celular cosechado se fue un lote que se cargó a la resina Amylose, sacudiendo durante una noche. La resina cargada se retornó a la columna de vidrio, se lavó con 10 CV de tampón de equilibrio Amylose y se eluyó por gravedad con -2 CV de tampón de elución Amylose (tampón de equilibrio Amylose, maltosa 10 mM, Fluka Biochemical, Suiza). Se recogieron diez fracciones de 5 ml durante el perfil de elución y se ensayaron para absorbancia a 280 y 320 nM. La resina Amylose se regeneró con 1 CV de H₂O destilada, 5 CV de SDS al 0,1% (p/v) (Sigma), 5 CV de H₂O destilada, 5 CV de tampón de equilibrio Amylose y, finalmente, 1 CV de tampón de almacenamiento Amylose (tampón de equilibrio Amylose, azida de sodio al 0,02% (p/v)). La resina regenerada se almacenó a 4°C.

35 Las fracciones del perfil de elución de interés se combinaron y dializaron en una cámara de diálisis de 10K (Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemical) contra 4 cambios de 4L PBS pH 7,4 (Sigma) durante un periodo de tiempo de 8 horas. Despues de la diálisis, el material cosechado representó el polipéptido huzcytor17/MBP-6H purificado. El polipéptido huzcytor17/MBP-6H purificado se esterilizó por filtración y se analizó mediante SDS-PAGE tinción Coomassie para un producto de peso molecular adecuado. El análisis BCA determinó que la concentración del polipéptido huzcytor17/MBP-6H era de 0,76 mg/ml.

40 El polipéptido huzcytor17/MBP-6H purificado se formuló adecuadamente para la inmunización de conejos y se envió a R & R Research and Development (Stanwood, WA) para producción de anticuerpos policlonales (Ejemplo 25 a continuación).

45 Ejemplo 25

Anticuerpo policlonal del receptor soluble zcytor17 humano

A. Preparación y purificación

50 Se prepararon anticuerpos policlonales inmunizando dos conejos blancos hembra de Nueva Zelanda con la proteína recombinante purificada huzcytor17/MBP-6H (Ejemplo 24). Los conejos recibieron cada uno una inyección inicial

ES 2 310 660 T3

intraperitoneal (IP) de 200 μ g de proteína purificada en Adyuvante de Freund Completo seguida de inyecciones IP de refuerzo de 100 μ g de proteína en Adyuvante de Freund Incompleto cada tres semanas. Siete a diez días después de la administración de la segunda inyección de refuerzo (3 inyecciones totales), se les realizaron extracciones de sangre a los animales y se recogió el suero. A los animales se les inyectó refuerzo y se les extrajo sangre cada tres semanas.

5 El suero de conejo específico de huzcytor17/MBP-6H se preadsorbió de anticuerpos anti-MBP, usando una columna de proteína CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB) que se preparó usando 10 mg de proteína de fusión MBP recombinante, purificada, no específica por gramo de CKBr-SEPHAROSE. Los anticuerpos policlonales específicos de huzcytor17/MBP-6H se purificaron por afinidad a partir del suero de conejo pre-adsorbido usando una columna 10 de proteínas CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB) que se preparó utilizando 10 mg de la proteína recombinante, purificada específica de antígenos, huzcytor17/MBP-6H. Tras la purificación, los anticuerpos policlonales se dializaron con 4 cambios de 20 veces el volumen del anticuerpo de PBS durante un periodo de tiempo de por lo menos 8 horas. Los anticuerpos específicos de huzcytor17 se caracterizaron por ELISA, usando 500 ng/ml de la proteína recombinante purificada huzcytor17/MBP-6H, como diana de anticuerpos. El límite inferior de detección (LID) del 15 anticuerpo purificado por afinidad anti-huzcytor17/MBP-6H de conejo fue 500 pg/ml en su antígeno recombinante purificado específico huzcytor17/MBP-6H.

B. Análisis SDS-PAGE y transferencia Western del anticuerpo ZcytoR17 MBP-6H antihumano de conejo

20 Se ensayó el anticuerpo ZcytoR17 MBP-6H antihumano de conejo por SDS-PAGE (NuPage 4-12%, Invitrogen, Carlsbad, CA) con el método de tinción coomassie y transferencia Western, usando IgG-HRP anticonejo de cabra. Se sometió a electroforesis o bien la proteína purificada (200-25 ng) o medio condicionado que contenía zcytor17, usando una minicelda n Invitrogen Novex's Xcell, y se transfirió a nitrocelulosa (0,2 mm; Invitrogen, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente, usando un módulo de transferencia Novex's Xcell con agitación de acuerdo a las instrucciones 25 provistas en el manual del instrumento. La transferencia se llevó a cabo a 300 mA durante una hora en un tampón que contenía Tris 25 mM, glicina 200 mM y metanol al 20%. El filtro se bloqueó luego con tampón Western A (interno), Tris 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, pH 8,0, Igepal CA-630 al 0,05%, NaCl 150 mM y gelatina al 0,25%) durante una noche con oscilación moderada a 4°C. La nitrocelulosa se enjuagó rápidamente, luego se añadió zcytoR17 MBP- 30 6H antihumano de conejo (1:1000) en tampón Western A. La transferencia se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente con oscilación moderada. La transferencia se enjuagó 3 veces durante 5 minutos cada una en Western A, luego se añadió anticuerpo IgG HRP anticonejo de cabra (1:1000) en tampón Western A. La transferencia se incubó durante 1,25 horas a temperatura ambiente con oscilación moderada. La transferencia se enjuagó 3 veces durante 5 35 minutos cada vez en Western A, luego se enjuagó rápidamente en H₂O. La transferencia se reveló usando reactivos de sustratos quimiluminiscentes disponibles en el mercado (reactivos de detección de transferencias Western ECL 1 y 2 en mezcla 1:1; los reactivos se obtuvieron de Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) y la transferencia se expuso a película de rayos X para durante un máximo de 15 minutos.

El zcytoR17 MBP-6H antihumano de conejo pudo detectar el zcytor17 humano presente en medio condicionado, como también la proteína zcytoR17 purificada como una banda a 120 kDa bajo condiciones de reducción.

Ejemplo 26

Distribución de tejido de zcytor17 de ratón en paneles de tejido usando PCR

45 Se cribó un panel de cDNA de tejidos murinos para expresión de zcytor17 de ratón, usando PCR. El panel se elaboró internamente y contenía 94 muestras de cDNA y cDNA marathon de diversos tejidos y líneas celulares de murinos normales y cancerosos que se muestran en la Tabla 6 a continuación. Los cDNA provenían de genotecas internas o cDNA marathon de preparaciones de RNA internas, Clontech RNA, o Invitrogen RNA. Los cDNA marathon de ratón se realizaron usando el kit marathon-Ready™ (Clontech, Palo Alto, CA) y se realizó el control de la calidad 50 con los cebadores del receptor transferrina de ratón ZC10,651 (SEC ID NO: 46) y ZC10,565 (SEC ID NO: 47), y luego se diluyó en base a la intensidad de la banda de transferrina. Para asegurar la calidad de las muestras de la genoteca ampliada en el panel, se realizaron tres pruebas de control de calidad (QC): (1) para evaluar la calidad del RNA utilizado para las genotecas, los cDNA internos se ensayaron para tamaño del inserto promedio por PCR con oligos vectores que eran específicos de las secuencias del vector de una genoteca de cDNA individual; (2) la estandarización 55 de la concentración del cDNA en las muestras del panel se logró usando métodos PCR convencionales para ampliar alfa tubulina o cDNA de G3PDH de longitud total, usando un oligo vector 5': ZC14,063 (SEC E> NO: 48) y el cebador oligo específico de alfa tubulina 3' ZC17,574 (SEC ID NO: 49) o el cebador oligo específico de G3PDH 3' ZC17,600 (SEC ID NO: 50); y (3) se envió una muestra para secuenciación, para controlar la posible contaminación de DNA ribosómica o mitocondrial. El panel se estableció en un formato de 96 pocillos que incluía una muestra 60 control positiva de DNA genómico de ratón (Clontech, Palo Alto, CA). Cada pocillo contenía aproximadamente 0,2-100 pg/ μ l de cDNA. La PCR se estableció usando los oligos ZC38,065 (SEC ID NO: 51) y ZC38,068 (SEC ID NO: 52), TaKaRa Ex Taq™ (TAKARA Shuzo Co LTD, Biomedicals Grupo, Japón) y el tinte RediLoad (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). La ampliación se llevó a cabo de la siguiente manera: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; 5 ciclos de 94 durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos; 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 65 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 reacción PCR a electroforesis en gel de Agarosa estándar usando un gel de agarosa al 4%. Se observó el tamaño del fragmento de DNA pronosticado correcto en cerebro, células CD90+, células dendríticas, embriones MEWt#2, línea celular de próstata Tuvak, glándulas salivales y testículos.

ES 2 310 660 T3

El fragmento de DNA para piel y testículos se cortó y purificó usando un kit de extracción de gel (Qiagen, Chatsworth, CA) según las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos se confirmaron por secuenciación para mostrar que realmente eran zcytor17 de ratón.

5

TABLA 6

Tejido/línea celular	No. muestras	Tejido/línea celular	No. muestras
229	1		
7F2	1		
Adipocitos-Ampliados	1		
aTC1.9	1		
Cerebro	4		
CCC4	1		
CD90+ ampliadas	1		
OC10B	1		
Células dendríticas	1		
Embrión	1		
Corazón	2		
Riñón	3		
Hígado	2		
Pulmón	2		
MEWt#2	1		
P388D1	1		
Páncreas	1		
Placenta	2		
Línea celular de cáncer de próstata Jakotay	1		
Línea celular de próstata Nelix	1		
Línea celular de próstata Paris	1		
Línea celular de próstata Torres	1		
Línea celular de próstata Tuvak	1		
Glándula salival	2		
Músculo esquelético	1		
Piel	2		
Intestino delgado	1		
Músculo liso	2		
Bazo	2		
Estómago	1		
Testículo	3		
Timo	1		

55

Ejemplo 27

Expresión de zcytor17 humano en diversos tejidos, usando RT/PCR cuantitativa en tiempo real

60

A. Cebadores y sondas para Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig humanos para análisis RT-PCR convencional y cuantitativo

65

Se había descrito previamente el análisis RT-PCR cuantitativo en tiempo real que usa el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM 7900 (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) (Véanse, Heid, C.A. et al., *Genome Research* 6:986-994, 1996; Gibson, U.E.M. et al., *Genome Research* 6:995-1001, 1996; Sundaresan, S. et al., *Endocrinology* 139:4756-4764, 1998). Este método incorpora el uso de una sonda específica de genes que contiene tanto los tintes fluorescentes indicador como inactivador. Cuando la sonda está intacta, la emisión de tinte del indicador es

ES 2 310 660 T3

negada debido a la proximidad del tinte inactivador. Durante la extensión PCR que usa cebadores adicionales directos e inversos específicos de genes, la sonda es escindida por la actividad nucleasa 5' de la polimerasa Taq que libera el tinte indicador de la sonda, lo que resulta en un incremento de emisión fluorescente.

5 Los cebadores y las sondas para análisis RT-PCR cuantitativo en tiempo real de expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig humanos se diseñaron usando el programa de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores para el Zcytor17 humano se diseñaron abarcando una unión intrón-exón para eliminar la posible ampliación de DNA genómico. El cebador directo, ZC37.877 (SEC ID NO: 53), y el cebador inverso, ZC37.876 (SEC ID NO: 54), se usaron en una reacción PCR a una concentración de 200 nM para sintetizar el producto de 73 bp. La correspondiente sonda TaqMan® del Zcytor17, designada ZC37,776 (SEC ID NO: 55), se sintetizó y marcó por PE Applied Biosystems, y se usó en cada reacción PCR a una concentración de 200nM. La sonda ZC37,776 (SEC ID NO: 55) se marcó en el extremo 5' con un tinte indicador fluorescente (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un tinte inactivador fluorescente (6-carboxi-tetrametil-rodamina) (TAMRA) (Epoch Biosciences, Bothell, WA).

10 15 Los cebadores para OSMRbeta humano se diseñaron abarcando una unión intrón-exón para eliminar la posible ampliación de DNA genómico. El cebador directo, ZC43,891 (SEC ID NO: 122), y el cebador inverso, ZC43,900 (SEC ID NO: 123), se usaron en una reacción PCR (a continuación) a una concentración de 200 nM. La correspondiente sonda TaqMan® de OSMRbeta, designada ZC43,896 (SEC ID NO: 124), se sintetizó y marcó por PE Applied Biosystems y se usó en cada reacción PCR a una concentración de 200nM. La sonda ZC43,896 (SEC ID NO: 124) se marcó en el extremo 5' con un tinte fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un tinte inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences).

20 25 Los cebadores para Zcytor17lig humano se diseñaron abarcando una unión intrón-exón para eliminar la posible ampliación de DNA genómico. El cebador directo, ZC43,280 (SEC ID NO: 125), y el cebador inverso, ZC43,281 (SEC ID NO: 126), se usaron en una reacción PCR (a continuación) a una concentración de aproximadamente 200 nM. La correspondiente sonda TaqMan® de Zcytor17lig, designada ZC43,275 (SEC ID NO: 127), se sintetizó y marcó por PE Applied Biosystems y se usó en cada reacción PCR a una concentración de 200nM. La sonda ZC43,275 (SEC ID NO: 127) se marcó en el extremo 5' con un tinte fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un tinte inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences).

30 35 Como control para ensayar la integridad y calidad de las muestras de RNA ensayadas, todas las muestras de RNA se cribaron para rRNA o GUS, usando conjuntos de cebador y sonda de PE Applied Biosystems (kit de rRNA) o diseñados internamente (GUS). El kit de rRNA contenía el cebador directo (SEC ID NO: 56), el cebador inverso de rRNA (SEC ID NO: 57) y la sonda de rRNA TaqMan® (SEC ID NO: 58). La sonda de rRNA se marcó en el extremo 5' con un tinte fluorescente indicador VIC (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con el tinte fluorescente inactivador TAMRA (PE Applied Biosystems). Los cebadores y sondas GUS se generaron internamente y se usaron en cada reacción PCR a 200 nM y 100 nM, respectivamente. El cebador directo fue ZC40,574 (SEC ID NO: 128) y el cebador inverso fue ZC40,575 (SEC ID NO: 129). La sonda GUS ZC43,017 (SEC ID NO: 130) se marcó en el extremo 5' con un tinte fluorescente indicador (Yakima-Yellow) (Epoch Biosciences) y en el extremo 3' con un tinte inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). Los resultados de rRNA y GUS también sirven como control endógeno y permiten la normalización de los resultados de expresión de mRNA de Zcytor17 observados en las muestras de ensayo.

40 45 Para análisis RT-PCR no cuantitativo, convencional, los cebadores se diseñaron usando el software de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores de Zcytor17 humano generan un producto de aproximadamente 1000 pares de bases y son los siguientes: cebador directo ZC28,917 (SEC ID NO: 83) y cebador inverso ZC28,480 (SEC ID NO: 131). Los cebadores de OSMRbeta humano generan un producto de 202 pares de bases y son los siguientes: cebador directo ZC41,653 (SEC ID NO: 132) y cebador inverso ZC41,655 (SEC ID NO: 133). Los cebadores de Zcytor17lig humano generan un producto de 305 pares de bases y son los siguientes: cebador directo ZC41,703 (SEC ID NO: 134) y cebador inverso ZC41,704 (SEC ID NO: 135).

B. Cebadores y sondas para Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig murinos para análisis RT-PCR convencional y cuantitativo

55 Los cebadores y sondas utilizados para análisis RT-PCR cuantitativo en tiempo real de expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig murinos se diseñaron usando el software de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores para Zcytor17 murino se diseñaron abarcando una unión intrón-exón para eliminar una posible ampliación de DNA genómico. El cebador directo, ZC43,272 (SEC ID NO: 136) y el cebador inverso, ZC43,273 (SEC ID NO: 137) se usaron en las reacciones PCR (a continuación) a una concentración de 300 nM. La correspondiente sonda TaqMan® de Zcytor17, designada ZC43,478 (SEC ID NO: 138), se sintetizó y marcó por PE Applied Biosystems. La sonda ZC43,478 (SEC ID NO: 138) se marcó en el extremo 5' con un tinte fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un tinte fluorescente inactivador (6-carboxi-tetrametil-rodamina) (TAMRA) (PE Applied Biosystems). La sonda ZC43,478 (SEC ID NO: 138) se usó en las reacciones PCR a una concentración de 100 nM.

60 65 Los cebadores para Zcytor17lig murino se diseñaron abarcando una unión intrón-exón para eliminar la posible ampliación de DNA genómico. El cebador directo, ZC43,278 (SEC ID NO: 139) y el cebador inverso, ZC43,279

ES 2 310 660 T3

(SEC ID NO: 140) se usaron en las reacciones PCR a una concentración de 500 nM. La correspondiente sonda TaqMan® de Zcytor17lig, designada ZC43,276 (SEC ID NO: 141), se sintetizó y marcó por PE Applied Biosystems. La sonda ZC43,478 (SEC ID NO: 138) se marcó en el extremo 5' con un tinte fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un tinte inactivado no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). La sonda ZC43,276 (SEC ID NO: 141) se usó en las reacciones PCR (a continuación) a una concentración de 200 nM.

Los cebadores para OSMRbeta murino se diseñaron abarcando una unión intrón-exón para eliminar la posible ampliación de DNA genómico. El cebador directo, ZC43,045 (SEC ID NO: 142), y el cebador inverso, ZC43,046 (SEC ID NO: 143), se usaron en las reacciones PCR a una concentración de 300 nM. La correspondiente sonda TaqMan® de OSMRbeta, designada ZC43,141 (SEC ID NO: 144), se sintetizó y marcó por Epoch Biosciences. La sonda ZC43,141 (SEC ID NO: 144) se marcó en el extremo 5' con un tinte fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un tinte inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). La sonda ZC43,141 (SEC ID NO: 144) se usó en las reacciones PCR (a continuación) a una concentración de 100 nM.

Como control para ensayar la integridad y calidad de las muestras de RNA ensayadas, todas las muestras de RNA se cribaron para el receptor GUS o transferrina de murino, usando los cebadores y las sondas diseñados usando el programa de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Los cebadores de GUS murino son los siguientes: cebador directo, ZC43,004 (SEC ID NO: 145), cebador inverso, ZC43,005 (SEC ID NO: 146) y sonda TaqMan® de ZC43,018 (SEC ID NO: 147). La sonda de GUS murino ZC43,018 (SEC ID NO: 147) se marcó en el extremo 5' con un tinte fluorescente indicador Yakima-Yellow (Epoch Biosciences) y en el extremo 3' con el tinte inactivador no fluorescente (Epoch Biosciences). Los cebadores de GUS murino se usaron en las reacciones PCR a 300 nM, y la sonda, ZC43,018 (SEC ID NO: 147), se usó a 100 nM. En algunos casos, se usó el receptor de transferrina murino en lugar de GUS, como control endógeno. El cebador directo del receptor de transferrina, ZC40,269 (SEC ID NO: 148), y el cebador inverso, ZC40,268 (SEC ID NO: 149), se usaron a 300 nM. La sonda del receptor de transferrina, ZC40,298 (SEC ID NO: 150), se usó en PCR a 100 nM y se marcó en el extremo 5' con un tinte fluorescente indicador VIC (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un tinte inactivador fluorescente (TAMRA) (PE Applied Biosystems). Los resultados del receptor de GUS y transferrina de murino también sirven como control endógeno y permiten la normalización de los resultados de expresión del mRNA de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig observados en las muestras de ensayo.

Para análisis RT-PCR semicuantitativo convencional, los cebadores se diseñaron usando el software para diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems). Los cebadores de Zcytor17 murino generan un producto de 276 pares de bases y son los siguientes: cebador directo ZC43,140 (SEC ID NO: 151), y cebador inverso ZC43,139 (SEC ID NO: 152). Los cebadores de OSMRbeta murino generan un producto de 575 pares de bases y son los siguientes: cebador directo ZC41,608 (SEC ID NO: 153) y cebador inverso ZC41,609 (SEC ID NO: 154). Los cebadores de Zcytor17lig murino generan un producto de 657 bp y son los siguientes: cebador directo ZC41,502 (SEC ID NO: 155) y cebador inverso ZC41,500 (SEC ID NO: 156).

40 C. Protocolos para análisis RT-PCR cuantitativo en tiempo real y RT-PCR semicuantitativo convencional

Se determinan los niveles relativos de mRNA de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig analizando muestras de RNA total, usando el método RT-PCR de una sola etapa (PE Applied Biosystems). Se aisló RNA total de células BAF transfectadas con Zcytor17 y OSMRbeta (humano) o células BHK (murino) por métodos convencionales, y se usó para generar una curva estándar para cuantificación de Zcytor17 y OSMRbeta. La curva consistía en diluciones en serie de 10 veces que oscilaban entre 100-0,01 ng/μl con cada punto de la curva estándar analizado por triplicado. De forma similar, para Zcytor17lig, se usó RNA de células T CD4+ activadas (previamente expuesto para elaborar Zcytor17lig) a fin de generar una curva estándar en el mismo intervalo 100-0,01 ng/μl. Se analizó el RNA total de células humanas o murinas por triplicado para niveles de transcripción de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig humano o murino y para uno de los siguientes genes de control endógeno: receptor de transferrina, rRNA o GUS. En un volumen total de 10 μl, cada muestra de RNA se sometió a una reacción RT-PCR de una sola etapa que contenía: aproximadamente 50-100 ng de RNA total en una mezcla maestra previamente formulada 2X que contenía un tinte de control interno (ROX)(carboxi- χ -rodamina) y DNA Polimerasa Thermo-Start® (Abgene, Surrey, Reino Unido); cebadores apropiados para el gen de interés (véanse partes A y B del presente ejemplo); la sonda apropiada (véanse partes A y B para concentración); transcriptasa inversa Superscript® (50 U/μl) (PE Applied Biosystems) y un volumen apropiado de agua libre de RNase. Las condiciones del ciclado térmico de PCR fueron las siguientes: una etapa de transcripción inversa inicial (RT) de un ciclo a 48°C durante 30 minutos; seguida de una etapa de activación enzimática Thermo-Start® de un ciclo a 95°C durante 10 minutos; seguida de 40 ciclos de ampliación a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los niveles relativos de RNA de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig se determinaron usando el Método de Curva Estándar descrito por el fabricante, PE Biosystems (User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, Diciembre 11, 1997). Las mediciones del receptor de Transferrina, rRNA o GUS se usaron para normalizar los niveles del gen de interés.

Las reacciones RT-PCR semicuantitativas emplearon el sistema “Superscript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq” (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada reacción de 25 μl consistía en lo siguiente: 12,5 μl de tampón de reacción 2X, 0,5 μl (20 pmol/μl) de cebador directo, 0,5 μl (20 pmol/μl) de cebador inverso, 0,4 μl mezcla de RT/polimerasa Taq, 5,0 μl de tampón de carga de gel RediLoad (Invitrogen), 5,1 μl agua libre de RNase y 1,0 μl de RNA total (100 ng/μl). La ampliación se llevó a cabo de la siguiente manera: un ciclo a 45°C durante 30 minutos seguido de 35-38

ES 2 310 660 T3

ciclos de 94°C, 20 segundos; temp de renaturalización variable (véase Tabla 7 a continuación), 20 segundos; 72°C, 45 segundos; luego finalizó con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Se sometieron 8 a 10 microlitros del producto de la reacción PCR a electroforesis en gel de agarosa estándar, usando un gel de agarosa al 2%.

5

TABLA 7

	Zcytor17 murino	58°C temp. renaturalización
10	OSMRbeta murino	60°C temp. renaturalización
	Zcytor17lig murino	52°C temp. renaturalización
15	Zcytor17 humano	55°C temp. renaturalización
	OSMRbeta humano	59°C temp. renaturalización
	Zcytor17lig humano	59°C temp. renaturalización

20

D. Aislamiento de RNA de subconjuntos y líneas celulares PBMC de seres humanos y murinos

Se extrajo sangre de varios donantes anónimos y se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando la metodología en gradiente Ficoll convencional. Los monocitos se aislaron luego usando el kit de Aislamiento de Monocitos y el Sistema de Separación Celular Magnética (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Los monocitos se dispusieron luego en placas de 24 pocillos de adherencia ultra-baja en medio libre de endotoxina. O bien no fueron estimulados o fueron tratados con IFNg recombinante humano (R&D Systems Inc.) a 10 ng/ml.

Las células se recogieron después de 24 y 48 horas. De modo similar, se aislaron células T CD4+ y CD8+ de PBMC, usando esferas magnéticas anti-CD4 o anti-CD8 de Miltenyi Biotec. Las células luego se activaron durante 4 ó 16 horas en placas para cultivo de tejido recubiertas con 0,5 µg/ml anticuerpos anti-CD3 en medio que contiene 5 µg/ml anticuerpos anti-CD28. También se aislaron linfocitos citolíticos naturales de PBMC, usando esferas magnéticas recubiertas con anti-CD56. Algunos de los linfocitos citolíticos naturales se recogieron en tiempo cero para RNA, y otros se dispusieron en placas en medio que contenía Forbol Miristato Acetato (PMA) (5 ng/ml) y ionomicina (0,5 µg/ml) durante 24 horas. Además, varias líneas celulares de tipo monocitos humanos, U937, THP-1 y HL-60, se recogieron en sus estados en reposo o activado. Las células U937 se activaron durante una noche con PMA (10 ng/ml). Las células HL-60 se activaron durante una noche con PMA (10 ng/ml) o durante 72 y 96 horas con IFNg (10 ng/ml) para conducirlas hacia una vía monocítica. Las células THP-1 se activaron durante una noche con una combinación de LPS (10 ng/ml) e IFNg (10 ng/ml). Se preparó RNA a partir de todas las células primarias, usando el kit RNeasy Midiprep™ (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El DNA remanente se eliminó usando el kit DNA-Free™ (Arnbion, Inc., Austin, TX). La concentración de RNA se determinó usando espectrofotometría estándar, y la calidad del RNA se determinó usando el Bionalizador 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Se obtuvo RNA de células T murinas, usando una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Se aislaron células T primarias CD4+ y CD8+ de los bazos de ratones C57B1/6, usando esferas magnéticas recubiertas con anticuerpo y el Sistema de Separación Celular Magnética de Miltenyi Biotec. Las células T CD4+ y CD8+ se activaron luego cultivando las células en placas de 24 pocillos con anticuerpos anti-CD3 (500 ng/ml) en medio que contenía anticuerpos anti-CD28 a 5 µg/ml. Las células se cosecharon para RNA a 0,4 y 16 horas. De manera similar, las células T CD4+ se aislaron y luego se inclinaron hacia un fenotipo Th1 o Th2, usando el siguiente protocolo. Ya que las células T C57B1/6 ya están inclinadas en dirección Th1, todo lo necesario era activarlas durante 6 horas con 0,5 µg/ml PMA y 10 ng/ml ionomicina. La inclinación “Th2” se obtuvo disponiendo células T CD4+ naturales con 2,5 µg/ml anti-CD28, 10 ng/ml mIL-2 (R&D Systems Inc.) y 25 ng/ml mIL-4 (R&D Systems) en placas recubiertas con 0,5 µg/ml anti-CD3. Después de 2 días en cultivo, las células se resuspendieron en medio que contenía 10 ng/ml mIL-2 (R&D Systems) y 25 ng/ml mIL-4. Las células se cultivaron durante tres días más, luego se activaron con PMA y ionomicina durante 6 horas.

Un conjunto adicional de células T inclinadas hacia Th1 y Th2 derivó usando la línea de células T DO11.10 Transgénicas del Receptor de Células T. Todas las células se dispusieron en placas recubiertas anti-CD3 y anti-CD28. Las células “Th1” se dispusieron en placas en medio que contenía mIL-12 (1 ng/ml) y anti-DL-4 (10 µg/ml). Las células “Th2” se dispusieron en placas en medio que contenía mIL-4 (10 ng/ml) y anti-IFNg (10 µg/ml). Después de 24 horas, a todos los cultivos se les suministró mIL-2 (10 ng/ml). Después de dos días más, el medio en las células se cambió y se añadió medio fresco que contenía las citocinas anteriormente mencionadas, y las células se cultivaron durante 4 días más antes de cosecharse.

65

Todo el RNA de las células T murinas se preparó usando el kit RNeasy Midiprep™ (Qiagen) y el DNA contaminado se eliminó usando el kit DNA-free™ de Ambion.

ES 2 310 660 T3

E. Aislamiento de RNA de los modelos murinos de pancreatitis y enfermedad del intestino irritable

Para inducir una afección similar a la enfermedad del intestino irritable (IBD) humana, se usó la cepa de ratón híbrida C57B16/129S6F1. Los ratones se dividieron en 4 grupos con una cantidad promedio de seis ratones por grupo.

5 Al Grupo 1 no se le suministró DSS, y los animales se sacrificaron en el día 14. El Grupo 2 recibió DSS al 2% durante dos días antes de ser sacrificado. El Grupo 3 recibió DSS al 2% durante siete días antes de ser sacrificado. El Grupo 4 recibió DSS al 2% durante siete días, luego se dejó recuperar durante siete días y se sacrificó en el día 14. El día 10 del sacrificio, se extirparon las secciones distales del colon y se colocaron en *RNAlater*TM (Ambion). Las secciones del colon se homogeneizaron usando técnicas convencionales, y se aisló el RNA usando el kit RNeasy MidiprepTM (Qiagen). Se eliminó el DNA contaminante por tratamiento con DNA-freeTM (Ambion), según las instrucciones del fabricante.

En un estudio diferente, se indujo la pancreatitis aguda en ratones CD-1 macho por inyección de caeruleína. Los ratones se dividieron en tres grupos (n= 8 ratones/grupo). Los animales del Grupo 1 recibieron siete inyecciones i.p. (1 inyección por hora) de Vehículo (solución salina) y se sacrificaron 12 ó 24 horas después de la primera inyección. Los animales de los Grupos 2 y 3 recibieron siete inyecciones i.p. de caeruleína (Sigma) (Catálogo #C-9026) a una dosis de 50 µg/kg/h durante seis horas (1 inyección por hora). El Grupo 2 fue sacrificado a las 12 horas de la primera inyección y el Grupo 3 a las 24 horas de la primera inyección. Se extirparon los páncreas al momento del sacrificio y se congelaron para aislamiento del RNA. Los tejidos se homogeneizaron y el RNA se aisló usando el kit Qiagen RNeasy MidiprepTM.

Incluso en otro estudio, se generaron ratones transgénicos de Zcytor17lig murino y se observaron para detectar cambios genéticos (véase Ejemplo 41). Se observaron piloerección y alopecia en muchos de los ratones transgénicos. Se sacrificaron cuatro ratones transgénicos y se tomaron muestras de piel tanto de las áreas sin pelo como de las áreas normales, que se congelaron para posterior aislamiento de RNA. También se tomaron secciones de piel de dos ratones control no transgénicos. Las muestras de piel se homogeneizaron y luego se digirieron con Proteinasa K (Qiagen) (Catálogo No 19133) durante 20 minutos a 60°C. El RNA se aisló usando el kit Qiagen RNeasy MidiprepTM, siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA remanente se eliminó usando el kit DNA-freeTM de Ambion.

30 F. Resultados de los análisis RT-PCR cuantitativo y semicuantitativo para Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig humanos

La expresión de Zcytor17 y OSMRbeta se examinó por análisis RT-PCR cuantitativo en cuatro conjuntos de monocitos humanos primarios que estaban en estado de reposo o activado con IFNg durante 24 ó 48 horas. La expresión de Zcytor17 estaba de bajo del nivel de detección en las células no estimuladas, pero aumentó notablemente después de 24 horas de activación con IFNg, y fue la más alta después de 48 horas de activación. En todos los casos, OSMRbeta estuvo debajo del nivel de detección. No se ensayó Zcytor17lig en estas muestras.

40 En las células T primarias, el Zcytor17 estuvo por debajo del nivel detectable en ambos subconjuntos de CD4+ y CD8+ en reposo. Después de cuatro horas de activación, no obstante, la expresión de Zcytor17 se elevó en ambos subconjuntos y luego disminuyó hasta un nivel levemente inferior en el punto de tiempo de la hora 16. OSMRbeta estuvo debajo del nivel detectable en estas muestras. La expresión de Zcytor17lig se examinó usando un análisis RT-PCR semicuantitativo. No se detectó expresión en células T CD4+ y CD8+ no estimuladas. No obstante, después de cuatro horas de activación, se detectaron altos niveles de Zcytor17lig. Estos niveles descendieron un poco en el punto 45 de tiempo de la hora 16.

50 La expresión de Zcytor17 no se examinó en linfocitos citolíticos naturales. OSMRb estuvo debajo del nivel detectable en estas muestras. La expresión de Zcytor17lig estuvo debajo del nivel detectable en los linfocitos citolíticos naturales en reposo, no obstante, hubo una señal tenue generada por los linfocitos citolíticos naturales, lo que indica que estos linfocitos pueden elaborar Zcytor17lig bajo determinadas circunstancias.

En las líneas celulares de tipo monocito humano, U937, THP-1 y HL-60, la expresión de OSMRbeta estuvo por debajo del nivel detectable en todas las muestras en reposo y activadas, excepto en las muestras de THP-1 activadas, en donde se detectó una señal tenue. La expresión de Zcytor17 fue alta en ambas líneas celulares U937 y THP-1 55 en reposo, y demostró un fuerte ascenso tras la activación. La expresión en U937 fue la más alta de cualquier tipo celular. En las HL-60, el Zcytor17 se expresó a niveles moderados en las células no estimuladas y disminuyó tras la estimulación con PMA. Sin embargo, la expresión de Zcytor17 ascendió notablemente en las HL-60, cuando se estimularon con IFNg durante 72 y 96 horas. Todos los datos de expresión humana se resumen a continuación en la Tabla 8.

60

65

ES 2 310 660 T3

TABLA 8

5	Monocitos humanos primarios	Estado de activación	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17lig
10	Monocitos humanos	Sin estimulación	-	-	
	Monocitos humanos	Act. 24 h IFNg	+	-	
15	Monocitos humanos	Act. 48 h IFNg	++	-	
	CD4+ humana	Sin estimulación	-	-	-
	CD4+ humana	Act 4 h	++	-	++
	CD4+ humana	Act. 16 h	+	-	+
20	CD8+ humana	Sin estimulación	-	-	-
	CD8+ humana	Act 4 h	++	-	++
	CD8+ humana	Act. 16 h	+	-	+
25	NK humanos	Sin estimulación		-	-
	NK humanos	Act 24h		-	+
30	U937	Sin estimulación	++	-	-
	U937	Act. 16 h	+++	-	-
	THP-1	Sin estimulación	++	-	-
	THP-1	Act. 1 6h	+++	+	-
35	HL-60	Sin estimulación	++	-	-
	HL-60	Act. 16 h PMA	+	-	-
	HL-60	Act. 72 h IFNg	+++	-	-
	HL-60	Act 96 h IFNg	+++	-	-

G. Resultados de los análisis RT-PCR cuantitativos y semicuantitativos para Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig murinos

40 Los niveles de expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig murinos se examinaron en varias poblaciones de células T de murinos y los resultados se resumen en la Tabla 9 a continuación. Se ensayó la expresión de Zcytor17 murino por análisis RT-PCR semicuantitativo, y demostró tener niveles bajos tanto en las células T CD4+ primarias en reposo como en las activadas. La expresión de Zcytor17 se detectó en células T CD8+ en reposo y luego pareció disminuir tras la activación con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en los puntos de tiempo de la hora 4 y de la hora 16. La expresión de OSMRbeta se midió por análisis RT-PCR cuantitativo y demostró expresarse en células T CD4+ y CD8+ activadas y en reposo. La expresión de OSMRbeta se elevó después de 4 horas de activación y luego volvió a los niveles sin estimulación después de 16 horas tanto en las células T CD4+ como en las CD8+. Se detectó Zcytor17lig por RT-PCR cuantitativo y demostró expresarse a niveles bajos en células T CD4+ no estimuladas. Sin embargo, tras 4 horas de activación, la expresión de Zcytor17lig ascendió notablemente y luego disminuyó levemente alrededor del punto de tiempo de la hora 16. En células T CD8+, no se detectó Zcytor17lig en células no estimuladas. Hubo cierta expresión de Zcytor17lig en el punto de tiempo de la hora, pero para la hora 16, los niveles de expresión habían caído debajo del nivel detectable.

55 En las células T DO11.10, la expresión de Zcytor17 se detectó en las células naturales e inclinadas hacia Th2, pero no en las células inclinadas hacia Th1. La expresión de OSMRbeta estuvo a niveles bajos en las células DO11.10 naturales. Hubo un incremento marcado en los niveles de expresión de OSMRbeta en las células inclinadas hacia Th1 y un incremento moderado de la expresión en las células inclinadas hacia Th2. La expresión de Zcytor17lig en estas células demostró ser predominante por el subconjunto inclinado hacia Th2. Se detectaron niveles bajos en el subconjunto Th1 y no se detectó ninguna expresión en las células naturales. Estos resultados se resumen en la Tabla 9 a continuación.

60 En las células T CD44 primarias que se inclinaron hacia la dirección Th1 o Th2, no se examinó el Zcytor17. La expresión de OSMRbeta se detectó en las tres muestras con los niveles más altos hallados en la muestra de Th2. Similar a los resultados de DO11.10, la expresión de Zcytor17lig se detectó en altos niveles en el subconjunto inclinado hacia Th2, con una pequeña cantidad detectada en el subconjunto Th1, y los niveles estuvieron debajo de la detección en las células no estimuladas. Estos resultados se resumen en la Tabla 9 a continuación.

ES 2 310 660 T3

TABLA 9

Células T murinas	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17lig
Células T CD4+ sin estimulación	+	+	+-
Células T CD4+ 4 h Activación	+	++	++
Células T CD4+ 16 h Activación	+	+	+
Células T CD8+ sin estimulación	+	+	-
Células T CD8+ 4 h activación	+-	++	+
Células T CD8+ 16 h Activación	-	+	-
DO 11.10 natural	+	+	-
DO 11.10	-	+++	+
Th1			
DO11.10	+	++	+
Th2			
Células T CD4+ sin estimulación		++	-
Células T CD4+ inclinadas hacia Th1		+++	+
Células T CD4+ inclinadas hacia Th2		++	+++

En las muestras de piel transgénicas de Zcytor17lig, los niveles de expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig se determinaron usando RT-PCR cuantitativo. Se demostró que el Zcytor17 estaba presente en todas las muestras a niveles aproximadamente equivalentes. Hubo niveles marcadamente superiores de expresión de OSMRbeta en los animales control no transgénicos que en las muestras transgénicas. La expresión de Zcytor17lig estuvo debajo de los niveles detectables en los animales control no transgénicos con niveles moderados a altos en los animales transgénicos. Los resultados se resumen en la Tabla 10 a continuación.

TABLA 10

Zcytor17lig murino	Piel	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17lig
Piel transgénica	Fenotipo	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17lig
Ratón tipo salvaje	Normal	+	+++	-
Ratón tipo salvaje	Normal	+	+++	-
Transgénico #1	Normal	+	+	+
Transgénico #1	Alopecia	+	+	+
Transgénico #2	Normal	+	+	+
Transgénico #2	Alopecia	+	+	+
Transgénico #3	Normal	+	+	+
Transgénico #3	Alopecia	+	+	+
Transgénico #4	Normal	+	+	+++
Transgénico #4	Alopecia	+	+	+++

En un experimento diferente, se midieron los niveles de expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig por análisis RT-PCR cuantitativo en páncreas de ratones sometidos a pancreatitis aguda. La expresión de Zcytor17 estuvo por debajo del nivel detectable en todas las muestras. Se observaron bajos niveles de expresión de OSMRbeta en las muestras control normales (Grupo 1), pero se observó un fuerte ascenso en el punto de tiempo de la hora 12 (Grupo 2) y niveles levemente inferiores en el punto de tiempo de la hora 24 (Grupo 3). La expresión de Zcytor17lig estuvo debajo del nivel detectable en los animales control, pero demostró niveles altos en ambos grupos inyectados con caeruleína. Los datos se resumen en la Tabla 11 a continuación.

ES 2 310 660 T3

TABLA 11

Modelo de pancreatitis	Descripción	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17lig
Grupo 1	Control normal	-	+	-
Grupo 2	12 h pos-inyección	-	+++	++
Grupo 3	24 h pos-inyección	-	++	++

En otro experimento, se examinaron los niveles de expresión de Zcytor17 y OSMRbeta en cólones distales de ratones sometidos a tratamiento con DSS. En este modelo murino de enfermedad inflamatoria de los intestinos, los niveles de expresión de ambos genes se determinaron por análisis RT-PCR cuantitativo y se resumen en la Tabla 12 a continuación. Los niveles de expresión de Zcytor17 aumentaron con la gravedad de la enfermedad, con bajos niveles de expresión en los animales control normales del Grupo 1 y cantidades en aumento observadas en los Grupos 2 y 3. En los animales del Grupo 4, los niveles de Zcytor17 habían vuelto a los niveles normales. A diferencia de la expresión de Zcytor17, los niveles de OSMRbeta fueron los más altos en los animales control, y los niveles realmente disminuyeron en los tres grupos tratados con DSS.

TABLA 12

Modelo IBD	Descripción	Día SAC	Zcytor17	OSMRbeta
Grupo 1	Control normal	14	+	++
Grupo 2	2 días tratamiento DSS	2	++	+
Grupo 3	7 días tratamiento DSS	7	+++	+
Grupo 4	7 días tratamiento DSS	14	+	+

Ejemplo 28

Expresión de distribución de tejido en Zcytor17lig humano en base al análisis RT-PCR de cDNA de primera cadena de tejidos múltiples

La expresión génica del zcytor17lig se examinó usando paneles de cDNA de primera cadena de tejidos múltiples normalizados (OriGene Technologies, Inc. Rockville, MD; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Éstos incluían el OriGene “Human Tissue Rapid-Scan™ Panel” (Cat #CHSCA-101, que contiene 22 tejidos diferentes, médula ósea y leucocitos de plasma) y el BD Biosciences Clontech “Human Blood Fractions MTC™ Panel” (Cat. #K1428-1, que contiene 9 fracciones sanguíneas diferentes).

Se realizaron las reacciones PCR usando los cebadores específicos de oligo de zcytor17lig ZC41,458 (SEC ID NO: 60) y ZC41,457 (SEC ID NO: 61), que generan un producto de 139 bp, y ZC41,459 (SEC ID NQ:62) y ZC41,460 (SEC IDNO: 63), que generan un producto de 92 bp, DNA polimerasa Qiagen HotStarTaq y tampón (Qiagen, Inc., Valencia, CA), dH₂O y tinte RediLoad™ (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). Las condiciones del ciclador de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de desnaturización de 15 minutos a 95°C, 35 ciclos de una desnaturización de 45 segundos a 95°C, desnaturización de 1 minuto a 53°C o 56°C y extensión de 1 minuto y 15 segundos a 72°C, seguida de una extensión final de 1 ciclo de 7 minutos a 72°C. Las reacciones se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (EM Science, Gibbstown, NJ) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Se observó un fragmento de DNA del tamaño correcto en los siguientes tejidos adultos humanos, usando OriGene “Human Tissue Rapid-Scan™ Panel”: testículo, leucocitos de plasma (PBL) y médula ósea.

Se observó un fragmento de DNA del tamaño correcto en las siguientes fracciones de sangre humana, usando BD Biosciences Clontech “Human Blood Fractions MTC™ Panel”: células mononucleares activadas (células B y T, y monocitos), células T CD8 activadas (T-supresor/citotóxico), células CD4+ activadas (linfocito T cooperador/inductor) y en forma muy tenue en células CD8+ en reposo.

ES 2 310 660 T3

Ejemplo 29

Clonación del receptor de oncostatinM humano

5 El receptor beta de OncostatinM (OSMRbeta) es un receptor de citocinas de tipo I con similitud estructural a IL12R-B2. El ZcytR17 tiene similitud estructural con IL12R-B1. Se ensayaron OSMRbeta y zcytR17 para ver si podían interactuar como subunidades en un complejo de señalización de citocinas, y si podían actuar juntos como receptor de señalización, o antagonista del receptor soluble, para zcytR17lig.

10 Para aislar OSMRbeta, se diseñaron los cebadores PCR de oligonucleótidos ZC39982 (SEC ID NO: 64) y ZC39983 (SEC ID NO: 65) para ampliar la región codificante de longitud total de la secuencia de cDNA de OncostatinM beta humano (SEC ID NO: 6) (Acceso en Genbank No. U60805; Mosley B, *JBC Volumen 271*, número 50, edición del 20 de diciembre de 1996 pp. 32635-32643).

15 Las reacciones PCR se llevaron a cabo en una hilera de moldes de la genoteca de cDNA, usando una polimerasa robusta, Advantage 0 (Clonetech, PaloAlto, CA), con el fin de identificar una fuente del cDNA. Se usó DNA de molde de genotecas de plásmido de cDNA ampliadas que contenían 5 millones de clones de cDNA independientes. Las reacciones se ensamblaron según las instrucciones del fabricante, usando 400 fmol/μl de cada oligonucleótido y 2-20 ng/μl de DNA de la genoteca del plásmido purificado como molde. Las genotecas de cDNA derivaron de los siguientes 20 tejidos y líneas celulares humanos: cerebro fetal, músculo liso de próstata, médula ósea, RPMI1588, tiroides, WI-38, testículo, células mononucleares de sangre periférica, células CD3+ estimuladas, THP-1, amígdala activada, HACAT e hígado fetal. Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico usando las siguientes condiciones: 30 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 68°C durante 3 minutos. Al final de los 30 ciclos, se llevó a cabo un ciclo adicional de extensión de 8 minutos a 68°C. Los productos PCR se visualizaron por agarosa TAE, electroforesis en gel en 25 presencia de bromuro de etidio seguida de iluminación UV. Se halló que el producto más abundante provenía de una genoteca de cDNA de músculo liso de próstata. La reacción PCR, que usa el molde de músculo liso de próstata y los oligonucleótidos ZC39982 (SEC ID NO: 64) y ZC39983 (SEC ID NO: 65), se repitió usando una DNA polimerasa termoestable menos robusta pero de mayor fidelidad “turboPfu”, (Stratagene, La Jolla, CA). Se realizaron 30 ciclos de ampliación con las siguientes condiciones: desnaturización a 94°C, 30 segundos, desnaturización a 63°C, 45 30 segundos, extensión a 72°C 3,5 minutos. Un producto de una sola banda se purificó con gel, en un gel de agarosa TAE al 0,8%.

Este DNA se amplió luego nuevamente usando los cebadores ZC39980 (SEC ID NO: 66) y ZC39981 (SEC ID NO: 67) diseñados para incluir las secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción para permitir la clonación 35 de este cDNA a un vector de expresión mamífera.

La reacción PCR se realizó usando “TurboPfu”, y el producto PCR se purificó durante 15 ciclos de: 95°C 1 minuto, 64°C 1 minuto 20 segundos, 72°C 4,5 minutos. La reacción PCR se digirió luego con EcoR1 y Xho1 (Invitrogen, 40 Carlsbad, CA) y se purificó con gel, como se describió anteriormente. Se preparó un vector de expresión mamífera, pZ7NX, digiriendo con EcoR1 y Xho1, y el producto PCR se ligó a este vector y se electroporó a células de *E. coli* DH10b. Se aislaron varias colonias bacterianas y se secuenciaron. Un clon fue correcto con la excepción de una sola 45 mutación no conservadora. Con el fin de cambiar esta base para emparejar la secuencia esperada, se usó una mutación que abarcaba oligonucleótidos y un sitio de restricción vecino Pst1 en una reacción PCR con “TurboPfu” que usaba pZP7Nx-h. Plásmido OncostatinM R previamente secuenciado como molde. El DNA ampliado por PCR se digirió con Pst1 y Xho1, y se volvió a clonar en el plásmido pZP7Nx-h OncostatinM R en lugar del fragmento Pst1/Xho1 que contenía la mutación ofensiva. Este nuevo plásmido se secuenció sobre la región Pst1 a Xho1 recientemente ampliada para confirmar la corrección y asegurar que no se hubiesen creado errores en el proceso de ampliación. Este análisis 50 confirmó la secuencia que emparejaba la secuencia esperada sobre la región codificante. La secuencia se muestra en la SEC ID NO: 6, y la correspondiente secuencia de aminoácidos en la SEC ID NO: 7.

Ejemplo 30

Constructos para generar un heterodímero de ZcytR17/receptor de OncostatinM (OSMRbeta) humano

55 Se conoce en la técnica un sistema para construcción, expresión y purificación de dichos receptores heterodiméricos solubles, y se ha adaptado al par de receptores, receptor de oncostatin M humano (OSMRbeta) y zcytR17 humano. Para este constructo, el polinucleótido para el receptor soluble de OSMRbeta se muestra en la SEC ID NO: 68 y el correspondiente polipéptido se muestra en la SEC ID NO: 69; y el polinucleótido del receptor soluble para zcytR17 humano se muestra en la SEC ID NO: 70 y el correspondiente polipéptido se muestra en la SEC ID NO: 71.

60 Para construir una línea celular que expresa un hzcytR17 soluble/heterodímero OSMRbeta humano secretado, se creó un constructo, de modo que el receptor soluble heterodimérico resultante comprende el dominio extracelular de OSMRbeta humano condensado a la cadena pesada de IgG gamma1 (Fc4) (SEC ID NO: 37) con el marcador Glu-Glu (SEC ID NO: 35) en el término C; mientras que el dominio extracelular de zcytR17 se condensó a Fc4 (SEC ID NO: 37) con un marcador His (SEC ID NO: 72) en el término C. Para ambos brazos de hzcytR17 y OSMRbeta humano del heterodímero se genomanipuló un espaciador Gly-Ser de 12 aminoácidos (SEC ID NO: 73) entre la porción extracelular del receptor y el término N-de Fc4.

ES 2 310 660 T3

A. Construcción de OSMRbeta soluble humano/Fc4-CEE

Para la construcción de la porción OSMRbeta/Fc4-CEE soluble humano del heterodímero, la porción extracelular de OSMRbeta humano se aisló usando PCR con los oligos ZC14063 (SEC ID NO: 48) y ZC41557 (SEC ID NO: 74) bajo las siguientes condiciones de reacción PCR: 30 ciclos de 95°C durante 60 seg, 57°C durante 30 seg y 72°C durante 100 seg; y 72°C durante 7 min. Los productos PCR se purificaron usando el kit de purificación PCR QIAquick (Qiagen), digerido con EcoR1 y BglIII (Boerhinger-Mannheim), se separaron por electroforesis en gel y se purificaron usando un kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen).

El casete de expresión, la cadena principal plasmídica y la porción del marcador Fc4-GluGlu de la quimera estuvieron contenidos dentro de un vector plasmídico previamente elaborado internamente. El vector plasmídico se digirió con EcoR1 y BamH1 (Boerhinger-Mannheim), se separó por electroforesis en gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). Los fragmentos digeridos y purificados de OSMRbeta humano y Fc4-CEE que contenían el plásmido se ligaron entre sí usando DNA Ligasa T4 (Life Technologies, Bethesda, MD) empleando métodos de ligadura convencionales. Las minipreparaciones de la ligadura resultante se cribaron para un inserto EcoRI/SmaI del tamaño correcto (772 bp) para el OSMRbeta soluble y las minipreparaciones positivas se secuenciaron para confirmar la precisión de la reacción PCR. Esta nueva construcción del plásmido se denomina pZP9-ONCOMR-Fc4CEE.

B. Construcción de Zcytor17 soluble humano/Fc4-CHIS

Para la construcción de la porción hzcytor17/Fc4-CHIS del heterodímero, la porción extracelular de zcytor17 humano se aisló por digestión de un plásmido que previamente contenía el receptor soluble Zcytor17-Fc4. El plásmido se digirió primero con Sal1 (New England Biolabs, Beverly, MA) después de lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y precipitó etanol. El DNA digerido se trató luego con DNA Polimerasa T4 (Boerhinger-Mannheim), para completar las proyecciones en 5' creadas por la digestión de Sal1, dejando romos los extremos del DNA, tras lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y precipitó etanol. El DNA enromado se digirió luego con BglIII para cortar en el extremo 3'), se separó por electroforesis en gel y se purificó usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El fragmento de DNA resultante, que contenía la secuencia codificante para el dominio extracelular de zcytR17, se ligó a un marcador Fc4-CHIS que contenía el vector de expresión mamífera preparado como se indica a continuación.

El casete de expresión, la cadena principal plasmídica y la porción del marcador Fc4-CHIS de la quimera se contuvieron dentro de un vector plasmídico previamente preparado internamente; este vector plasmídico se digirió con EcoR1 (Boerhinger-Mannheim) y luego la reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y precipitó etanol. El DNA digerido se trató entonces con DNA Polimerasa T4 (Boerhinger-Mannheim), para completar las proyecciones en 5' creadas por la digestión de EcoR1, dejando romos los extremos del DNA, tras lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y precipitó etanol. El DNA enromado se digirió adicionalmente con BarnH1 (Boerhinger-Mannheim) para cortar el extremo 3', se separó por electroforesis en gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). Los fragmentos digeridos y purificados de zcytor17 humano y Fc4-CHIS que contenía el plásmido se ligaron entre sí usando DNA Ligasa T4 (Life Technologies, Bethesda, MD) usando métodos de ligadura convencionales.

Las minipreparaciones de la ligadura resultante se cribaron por PCR, usando el cebador sentido específico de zcytor17 ZC29180 (SEC ID NO: 22) y el cebador antisentido específico de Pc4 ZC29232 (SEC ID NO: 75) con las siguientes condiciones de reacción PCR: 30 ciclos de 94°C durante 60 seg, 68°C durante 150 seg; y 72°C durante 7 min. Un tamaño de producto esperado de 848 bp confirmó el correcto ensamblado del plásmido denominado pZEM228 hzcytor17/Fc4HIS.

Se creó una segunda construcción de zcytor17-Fc4 para usar al generar la proteína del homodímero de células COS. En síntesis, la región codificante para toda la proteína de fusión se aisló por digestión de un plásmido que previamente contenía el receptor soluble Zcytor17-Fc4 con Sal1 (Boerhinger-Mannheim). La reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y precipitó etanol. El DNA digerido se trató luego con DNA Polimerasa T4 (Boerhinger-Mannheim), para completar las proyecciones 5' creadas por la digestión de EcoR1, dejando romos los extremos del DNA, tras lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y precipitó etanol. El DNA enromado se digirió luego adicionalmente con NotI (Boerhinger-Mannheim) para cortar en el extremo 3', se separó por electroforesis en gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). Se digirió un vector de expresión mamífera que contenía un casete de expresión impulsado por CMV para generar extremos compatibles, y los 2 fragmentos se ligaron entre sí. Las minipreparaciones de la ligadura resultante se cribaron por PCR, usando el cebador sentido específico del vector ZC14063 (SEC ID NO: 48) y el cebador antisentido específico de zcytor17 ZC27899 (SEC ID NO: 19) con las siguientes condiciones de reacción PCR: 30 ciclos de 94°C durante 30 seg, 64°C durante 30 seg; 70°C durante 90 seg; y 72°C durante 7 min. Un tamaño de producto esperado de aproximadamente 1000 bp confirmó el ensamblado correcto del plásmido denominado pZP7NX-hzcytor17-Fc4. Este plásmido se transfeció posteriormente a células COS usando Lipofectamine (Gibco/BRL), según las instrucciones del fabricante. Las células se acondicionaron durante 60 horas en DMEM + FBS al 5% (Gibco/BRL), después de lo cual la proteína se purificó en una columna de cromatografía de proteínas G-sepharose 4B y se preparó para bioensayos *in vitro*, por ejemplo, aquellos descritos en esta memoria.

C. Generación de un receptor Zcytor17/OncostatinM humano (OSMRbeta)

Se co-transfectaron aproximadamente 16 µg de cada uno de pZP9-ONCOMR-Fc4CEE y pZEM228 hzcytor17/Fc4HIS en células BHK-570 (ATCC No. CRL-10314), usando lipofectamina (Gibco/BRL), según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron durante 10 días en DMEM + FBS al 5% (Gibco/BRL) que contenía 0,5 mg/ml G418 (Gibco/BRL) y metotrexato 250 nM (MTX)(Sigma, St. Louis, MO) durante 10 días.

La combinación resultante de células doblemente seleccionadas se usó para generar la proteína heterodimérica. Se usaron tres fábricas de células (Nunc, Dinamarca) de esta combinación para generar 10 L de medio condicionado libre de suero. Este medio condicionado se pasó por una columna de 1 ml de proteína A y se eluyó en (10) fracciones de 750 microlitros. Cuatro de estas fracciones que tenían las concentraciones más altas se combinaron y dializaron (valor de corte 10 kD MW) contra PBS. El complejo de proteínas zcytor17/OSMRbeta heterodimérico soluble se aisló de los componentes del medio pasando la combinación por una columna de níquel y lavando la columna con diversas concentraciones de Imidazol. La proteína soluble zcytor17/OSMRbeta se eluyó a concentraciones intermedias de Imidazol, mientras que el homodímero hzcytor17/Fc4HIS se eluyó a concentraciones más altas de Imidazol.

Ejemplo 31

Distribución de tejido de zcytor17 humano en paneles de tejido usando transferencia Northern y PCR

A. Distribución de tejido de zcytor17 humano usando transferencia Northern

Se sondaron transferencias Northern de múltiples tejidos humanos (Transferencias I y II de MTN humano de senda 12, y Transferencia II de MTN del sistema inmunitario humano; MTN endocrino humano, transferencia II de MTN fetal humano, Matriz de Tejido Múltiple Humano) (Clontech) como también transferencias preparadas internamente que contenían diversos tejidos, para determinar la distribución de tejido de la expresión de zcytor17 humano. Las transferencias preparadas internamente incluían mRNA de los siguientes tejidos y líneas celulares: células SK-Hep-1, células THP1, glándula suprarrenal (Clontech); riñón (Clontech), hígado (Clontech e Invitrogen); médula espinal (Clontech), testículo (Clontech), células T CD4+ humanas, células T CD8+ humanas, células T CD19+ humanas, reacción de linfocitos mixta humana (MLR), línea celular THP1 (ATCC No. TIB-202), línea celular U937, línea celular de linfoblastos de ratón p388D1 (ATCC No. CCL-46) con o sin estimulación por Ionomicina; y línea celular de pulmón embrionario humano WI-38 (ATCC No. CRL-2221) con o sin estimulación por Ionomicina.

Se amplió una sonda derivada de PCR de aproximadamente 500 bp para zcytor17 (SEC ID NO: 4) usando los oligonucleótidos ZC28,575 (SEC ID NO: 77) y ZC27,899 (SEC IO NO: 19) como cebadores. La ampliación PCR se llevó a cabo de la siguiente manera: 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 PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa y el producto PCR de aproximadamente 500 bp se purificó como se describe en este documento. La sonda se marcó radiactivamente usando el kit de marcado de cebador aleatorio PRIME IT II™ (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna NUCTRAP™ (Stratagene). Se empleó la solución EXPRESSHYB™ (Clontech) para la prehibridación y como solución de hibridación para las transferencias Northern. La prehibridación se llevó a cabo a 68°C durante 2 horas. La hibridación tuvo lugar durante una noche a 68°C con aproximadamente 1,5X10⁶ cpm/ml de sonda marcada. Las transferencias se lavaron tres veces a temperatura ambiente en 2X SSC, SDS al 0,05%, seguidas de 1 lavado durante 10 minutos en 2X SSC, SDS al 0,1% a 50°C. Se observaron varias bandas tenues después de varios días de exposición. Se observó una transcripción de aproximadamente 9 kb en la tráquea, músculo esquelético y timo; se observó una transcripción de aproximadamente 2 kb en PBL, HPV, U937 y células THP-1; y se observó una transcripción de aproximadamente 1,2 kb en placenta, médula ósea y tiroides, y en células HPV y U937. En todos los tejidos anteriormente mencionados, la intensidad de señal fue tenue. Parecía haber poca expresión en la mayoría de los tejidos, indicando que la expresión de zcytor17 puede depender de la activación de células o tejidos en los que se expresa.

B. Distribución de tejido en paneles de tejido usando PCR

Se cribó un panel de cDNA de tejidos humanos para expresión de zcytor17, usando PCR. El panel se elaboró internamente y contenía 94 muestras de cDNA marathon y cDNA de distintos tejidos y líneas celulares humanos normales y cancerosos que se exponen en la Tabla 13 a continuación. Los cDNA provenían de genotecas internas o los cDNA marathon de preparaciones de RNA internas, Clontech RNA o Invitrogen RNA. Los cDNA marathon se prepararon usando el kit marathon-Ready™ (Clontech, Palo Alto, CA) y se les realizó el control de calidad con los cebadores de clatrina ZC21195 (SEC ID NO: 78) y ZC21196 (SEC ID NO: 79), y luego se diluyeron en base a la intensidad de la banda de clatrina. Para asegurar la calidad de las muestras del panel, se realizaron tres ensayos de control de la calidad (QC): (1) Para evaluar la calidad del RNA utilizado para las genotecas, los cDNA internos se ensayaron para tamaño promedio del inserto por PCR con oligos vectores que eran específicos para las secuencias del vector de una genoteca de cDNA individual; (2) la estandarización de la concentración del cDNA en las muestras del panel se logró empleando métodos PCR convencionales para ampliar alfa tubulina de longitud total o cDNA de G3PDH usando un cebador del oligo vector 5' ZC14,063 (SEC ID NO: 48) y 3' un cebador oligo específico de alfa tubulina ZC17,574 (SEC ID NO: 49) o un cebador oligo específico de 3' G3PDH ZC17,600 (SEC ID NO: 50); y (3) se envió una muestra para secuenciación a fin de controlar la posible contaminación de DNA ribosómico o mitocondrial. El panel tuvo un formato de 96 pocillos que incluía una muestra de control positiva de DNA genómico

ES 2 310 660 T3

humano (Clontech, Palo Alto, CA). Cada pocillo contenía aproximadamente 0,2-100 pg/μl de cDNA. Las reacciones PCR se iniciaron usando los oligos ZC26,358 (SEC ID NO: 80) y ZC26,359 (SEC ID NO: 81), TaKaRa Ex Taq™ (TAKARA Shuzo Co. LTD, Biomedicals Group, Japón) y tinte Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). La ampliación se realizó del siguiente modo: 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 5 66, 3°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguidos de 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos. Se sometieron aproximadamente 10 μl del producto de la reacción PCR a electroforesis en gel de agarosa convencional usando un gel de agarosa al 4%. Se observó el tamaño correcto del fragmento de DNA pronosticado en ganglio linfático, próstata, tiroides, HPV (epitelio de próstata), HPVS (epitelio de próstata seleccionado), tumor de pulmón, reacciones tumorales de útero, junto con la reacción de DNA genómico.

10 El fragmento de DNA para tejido de próstata (2 muestras), HPV (epitelio de próstata), HPVS (epitelio de próstata seleccionado) y genómico se cortó y purificó usando un kit de extracción de gel (Qiagen, Chatsworth, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se confirmaron por secuenciación para mostrar que realmente eran de zcytor17.

15

TABLA 13

Tejido/Línea celular	No muestras	Tejido/Línea celular	No muestras
Glándula suprarrenal	1	Médula ósea	3
Vejiga	1	Cerebro fetal	3
Médula ósea	1	Islote	2
Cerebro	1	Próstata	3
Cuello uterino	1	RPMI#1788 (ATCC# CCL-156)	2
Colon	1	Testículo	4
Cerebro fetal	1	Tiroídes	2
Corazón fetal	1	W138(ATCC#CCL-75)	2
Riñón fetal	1	ARIP (ATCC # CRL-1674 – rata)	1
Hígado fetal	1	HaCat – queratinocitos humanos	1
Pulmón fetal	1	HPV (ATCC # CRL-2221)	1
Músculo fetal	1	Glándula suprarrenal	1
Piel fetal	1	Próstata SM	2
Corazón	2	PMMC seleccionadas de CD3+ estimuladas con lonomicina + PMA	1
K562(ATCC#CCL-243)	1	HPVS (ATCC # CRL-2221) –seleccionadas	1
Riñón	1	Corazón	1
Hígado	1	Glándula pituitaria	1
Pulmón	1	Placenta	2
Ganglio linfático	1	Glándula salival	1
Melanoma	1	HL60 (ATCC # CCL-240)	3
Páncreas	1	Plaqueta	1
Glándula pituitaria	1	HBL-100	1
Placenta	1	Mesangial renal	1
Próstata	1	Célula T	1
Recto	1	Neutrófilo	1
Glándula salival	1	MPC	1
Músculo esquelético	1	Hut-102(ATCC#TIB-162)	1
Intestino delgado	1	Endotelial	1
Médula espinal	1	HepG2 (ATCC # HB-8065)	1
Bazo	1	Fibroblasto	1
Estómago	1	E. Histo	1

ES 2 310 660 T3

Tejido/Línea celular	No muestras	Tejido/Línea celular	No muestras
Testículo	2		
Timo	1		
Tiroides	1		
Tráquea	1		
Útero	1		
Tumor de esófago	1		
Tumor gástrico	1		
Tumor renal	1		
Tumor de hígado	1		
Tumor de pulmón	1		
Tumor de ovario	1		
Tumor rectal	1		
Tumor de útero	1		

C. Análisis de expresión de *zcytR17* por PCR y Northern

La anotación de estos tipos de células y las condiciones de desarrollo que afectan la expresión del receptor son un medio útil de elucidar su función y pronosticar una fuente de ligandos. Con ese fin, se estudiaron por PCR una diversidad de tejidos y tipos celulares. La polimerasa termoestable Advantage II™ (Clontech, La Jolla, CA) se usó con los cebadores de los oligonucleótidos ZC29,180 (SEC ID NO: 22) y ZC29,179 (SEC ID NO: 82) y 1-10 ng de diversos moldes de cDNA mencionados a continuación durante 30 ciclos de ampliación de (94°C, 30 seg.; 66°C, 20 seg.; 68°C, 1 min. 30 seg). Después de esto, se pasó 20% de cada reacción por geles de agarosa al 0,8%, TAE/bromuro de etidio y se visualizó con luz UV. Se asignó luego un puntaje a las muestras en base a la intensidad de la banda. Véase la Tabla 14 a continuación.

TABLA 14

Células y condiciones	Puntaje 0-5
HeLa estimulada con PMA	0
U937	3
MCF-7	0
HuH7	1
Folículo humano	0
HT-29	0
HEPG2	0
HepG2 estimulada con IL6	0
Endotelio dérmico humano	0
Endotelio venoso humano	0
CD4+ humana	0
BEWO	0
CD19+ humana	1
PBMC humana estimulada con PHA, PMA, Ionomicina, IL2, DL4, TNF α 24 horas	0

Células y condiciones	Puntaje 0-5
5 PBMC humana estimulada con LPS, PWM, IFNy, TNF α , 24 horas	0
PBMC humana bajo todas las condiciones indicadas más arriba durante 48 horas	4
10 HUVEC p.2	4
RPMI1788	0
15 TF1	0
Células T de bazo de mono estimuladas con PMA, Ionomicina	0
Epitelio de próstata humano transformado con HPV	5
15 Amígdalas humanas inflamadas	0
HACAT	0
Condrocito humano	1
Sinoviocito humano	1
20 THPI	5
REH	0

25 De las señales PCR positivas fuertes, dos fueron de las líneas celulares de monocitos humanos U937 y THP1.

Estas dos líneas celulares, junto con el epitelio de próstata, se seleccionaron para mayor análisis por transferencia Northern. Los intentos previos de visualizar una transcripción por análisis Northern usando mRNA de diversos tejidos, proporcionaron señales débiles y difusas en el intervalo sorprendentemente grande de 7-10 kb, dificultando la interpretación de los datos. Se preparó un gel de formaldehído/MOPS/agarosa al 0,8% desnaturizante (RNA Methodologies, Farrell, RE Academic Press), y se prepararon 2 μ g de polyA+ mRNA para cada muestra, junto con una escalera de RNA (Life Technologies, Bethesda, MD). El gel se transfirió luego a nylon Hybond (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), se entrecruzó por UV y se hibridó en solución ExpressHyb (Clontech, La olla, CA) a 68°C durante una noche, usando una sonda para zcytR17 humano generada por PCR con los oligos ZC28,575 (SEC ID NO: 77), y ZC27,899 (SEC ID NO: 19), y se marcó con un kit Megaprime 32 P (Amersham). La transferencia Northern se lavó posteriormente con 0,2xSSC+SDS al 0,1% a 65°C durante 15 minutos y se expuso a película durante 7 días con pantallas intensificadoras. Se observó una banda de 5 kb prominente tanto en el epitelio de próstata como en la senda U937, mientras que se observó una banda más tenue en la senda THP1.

40 Para optimizar el cDNA utilizado como sonda de hibridación, se ampliaron por PCR cuatro regiones diferentes de la secuencia humana zcytR17 de longitud total, se marcaron y se hibridaron como se describió anteriormente para transferencia Southern que contenía DNA de genotecas de cDNA genómicas y ampliadas. Las cuatro sondas, aquí designadas sondas A-D, se ampliaron usando los siguientes pares de cebadores: (A) ZC28,575 (SEC ID NO: 77), ZC27,899 (SEC ID NO: 19); (B) ZC27,895 (SEC ID NO: 20), ZC28,917 (SEC ID NO: 83); (C) ZC28,916 (SEC ID NO: 84), ZC28,918 (SEC ID NO: 85); y (D) ZC28,916 (SEC ID NO: 84), ZC29,122 (SEC ID NO: 21). 45 El DNA genómico humano, junto con las genotecas de cDNA ampliadas que demostraron contener zcytR17 por PCR, se digirieron con EcoR1 y Xhol1 para liberar insertos, y se pasaron por duplicado por TAE/agarosa al 0,8%, se desnaturizaron con NaOH 0,5M, NaCl 1,5 M, se transfirieron a Hybond, se entrecruzaron por UV y cada uno se hibridó con una sonda distinta. Se descubrió que la Sonda B tenía la unión menos específica y la señal más fuerte. Por 50 ende, la Sonda B se utilizó para todas las hibridaciones subsiguientes.

55 Dado que las células THP1 son un excelente modelo de monocitos circulantes y expresaron zcytR17 a niveles bajos, se trataron con una diversidad de compuestos en un esfuerzo por aumentar la expresión de zcytR17. Las células se desarrollaron hasta una intensidad de 2e5/ml, se lavaron y se resuspendieron en diversos medios estimulantes, se desarrollaron durante cuatro a treinta horas y se cosecharon para preparaciones de RNA. Cada medio se enriqueció con uno de los siguientes fármacos o pares de citocinas: LPS 2 ug/ml (Sigma Chemicals, St. Louis, MO), hTNF α 2 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hGM-CSF 2 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hIFN- γ 50 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hM-CSF 1 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hIL6 1 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hIL1 β 2 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hIFN γ 50 ng/ml+hIL4 0,5 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hIFN γ 50 ng/ml+hIL10 1 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), PMA 10 ng/ml (Calbiochem, SanDiego, CA) y un control no tratado. Al final del periodo de cultivo, se preparó RNA total usando un kit RNAeasy Midi (Qiagen, Valencia, CA). Se seleccionó Poly A+ RNA del RNA total, usando un kit MPG (CPG, Lincoln Park, NJ). Se pasaron 2 ug de polyA+ RNA de cada condición por geles de formaldehído/MOPS/agarosa, se transfirieron a nylon y se entrecruzaron por UV como se describió antes. Estas transferencias Northern luego se hibridaron, como anteriormente, a la sonda B a 68°C durante una noche, se lavaron bajo condiciones de alta rigurosidad con 0,2XSSC, SDS al 0,1% a 65°C, se expusieron a película durante una noche y luego se expusieron a pantallas de fósforo para cuantificación de señal. Un mRNA dominante de 8 kb, como también una banda relativamente más débil de 2,8 kb, se observaron en todas las sendas. Se observó un aumento de 20 veces en mRNA de zcytR17 en RNA de células tratadas

ES 2 310 660 T3

con hIFN γ durante 30 horas. Este efecto mutó levemente con tratamiento de estimulaciones con IL4. Se observaron aumentos menores de 3 veces en mRNA, en RNA de células tratadas con LPS, TNF α y GM-CSF, mientras que MCSF, IL6, y IL1 β no tuvieron ningún efecto sobre los niveles de mRNA de zcytor17. Estos datos indican una función del receptor de zcytor17 y su ligando en la biología de los macrófagos monocíticos y por extensión en cualquier número de procesos de enfermedad en los que participen estas células.

Ejemplo 32

Distribución de tejido de zcytor17lig humano en paneles de tejido usando transferencia Northern y PCR

Se obtuvo un fragmento de cDNA de zcytor17lig humano usando PCR con cebadores específicos de genes: cebador sentido ZC41438 (SEC ID NO: 93) y cebador antisentido ZC41437 (SEC ID NO: 94) y cDNA de zcytor17lig humano molde (SEC ID NO: 90) Este fragmento se purificó usando métodos convencionales y aproximadamente 25 ng se marcaron con ^{32}P alfa dCTP usando el kit de marcado de cebadores aleatorio Prime-It RmT (Stratagene) y se hibridaron en Ultrahyb, (Ambion) y se utilizaron para exponer pantallas de película/intensificadoras Biomax según las recomendaciones del fabricante en cada caso. Se hibridaron transferencias nuevas, sin uso previo, incluyendo la senda MTN humana 12 de Clontech, MTN II de cerebro humano y MTN IV de cerebro humano, el sistema inmunitario MTN II y la matriz MTE humana II, de Clontech que se hibridaron durante una noche a 42°C por el método Ambion ultrahyb. Los recuentos radiactivos no específicos se eliminaron usando 0,1 SSC/SDS al 0,5% a 55°C. Las transferencias positivas incluían la senda MTN humana 22 (Clontech). De los 12 tejidos examinados, solamente la placenta fue positiva para una transcripción de aproximadamente 1,2 KB.

Ejemplo 33

Construcción de vectores de expresión mamífera que expresan zcytor17lig-CEE humano

A. Construcción de zCytor17Lig-CEE/pZMP21

Se construyó un plásmido de expresión que contenía todo o parte de un polinucleótido que codifica zCytor17Lig-CEE (SEC ID NO: 95) vía recombinación homóloga. El plásmido se denominó zCytor17Lig-CEE/pZMP21.

La construcción de zCytor17Lig-CEE/pZMP21 se logró generando un fragmento zCytor17Lig-CEE, usando ampliación PCR. El molde de DNA utilizado para la producción del fragmento zCytor17Lig-CEE fue zCytor17Lig-pZP7nx. Los cebadores utilizados para la producción del fragmento zCytor17Lig-CEE fueron: (1) ZC41,607 (SEC ID NO: 97) (secuencia sentido), que incluye desde el extremo 5' hasta el extremo 3': 28 bp correspondientes a la secuencia flanqueadora del vector (5' del inserto) y 21 bp correspondientes a la secuencia 5' de zCytor17Lig; y (2) ZC41,605 (SEC ID NO: 98) (secuencia antisentido), que incluye desde el extremo 5' hasta el extremo 3': 37 bp de la secuencia flanqueadora del vector (3' del inserto), 3 bp del codón finalizador, 21 bp que codifican un marcador C-terminal EE y 21 bp correspondientes al extremo 3' de la secuencia zCytor17Lig. El fragmento resultante de la ampliación PCR ya mencionada fue una copia del molde zCytor17Lig con la adición de un marcador C-terminal EE, proporcionando un producto final zCytor17Lig-CEE.

Las reacciones PCR se realizaron de la siguiente manera: A un volumen final de 100 μl se le añadieron: 10 μl de tampón de reacción de Polimerasa Taq 10x con MgCl 15 mM (Gibco), 1 μl de DNA Polimerasa Taq (5 unidades/ μl , Gibco), 3 μl de dNTP 10 mM, 78 μl dH₂O, 3 μl de un stock 20 pmol/ μl del cebador ZC41,607 (SEC ID NO: 97) 3 μl de un stock 20 pmol/ μl del cebador ZC41,605 (SEC ID NO: 98) y 2 μl de un stock 0,13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del molde de DNA zCytor17lig. Se añadió a la mezcla un volumen equivalente a 50 μl de aceite mineral. La reacción se calentó hasta 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto; 55°C durante 2 minutos; 72°C durante 3 minutos; seguidos de una extensión de 10 minutos a 72°C, y se mantuvo a 4°C hasta recoger la reacción.

El plásmido pZMP21 se digirió por restricción con la enzima BglII, se lavó con un kit de purificación PCR Qia-Quick (Qiagen) usando un protocolo microcentrífugo, y se usó para recombinación con el fragmento PCR. El plásmido pZMP21 se construyó a partir de pZMP20, que se construyó a partir de pZP9 (depositado en American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y designado con el No. 98668), con los elementos genéticos de levadura de pRS316 (depositado en American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 y designado con el No. 77145), un elemento IRES de poliovirus, y el dominio extracelular de CDS, truncado en el extremo carboxiterminal del dominio de transmembrana. PZMP21 es un vector de expresión mamífera que contiene un casete de expresión que tiene el promotor MPSV, el intrón peptídico de señal de inmunoglobulina, múltiples sitios de restricción para inserción de secuencias codificantes y un codón finalizador y un terminador de la hormona del crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor SV40, potenciador y origen de replicación, un gen DHFR, el terminador SV40, como también las secuencias URA3 y CEN-ARS necesarias para selección y replicación en *S. cerevisiae*.

Se combinaron independientemente cincuenta microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con 100 ng de plásmido cortado, 5 μl de la mezcla PCR previamente descrita, y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/DNA se electropulsó a 0,75 kV (5 kV/cm), ∞ ohms, 25 μF . A cada cubeta se le habían añadido 600 μl de sorbitol 1,2 M, y la levadura se dispuso en dos placas URA-D en una alícuota de 100 μl

ES 2 310 660 T3

y una alícuota de 300 μ l, y se incubó a 30°C. Después de aproximadamente 72 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una de las placas se resuspendieron en 1 ml H₂O y se centrifugaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 500 μ l de tampón de lisis (Triton X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Los 500 μ l de la mezcla de lisis se añadieron a un tubo Eppendorf 5 que contenía 300 μ l de 600 μ m de esferas de vidrio lavadas con ácido y 300 μ l fenol-cloroformo, se agitó en vórtex durante dos o tres intervalos de 1 minuto, seguidos de una centrifugación de 5 minutos en una máquina centrífuga Eppendorf a velocidad máxima. Se transfirieron 300 microlitros de la fase acuosa a un tubo nuevo, y el DNA precipitó con 600 μ l de etanol al 100% (EtOH), seguido de centrifugación durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de DNA se lavó luego con 500 μ l de EtOH al 70%, seguidos de centrifugación durante 1 minuto a 4°C. Los sedimentos de DNA 10 se resuspendieron en 30 μ l H₂O.

La transformación de células de *E. coli* electrocompetentes (MC1061) se realizó con 5 μ l de la preparación de 15 DNA de levadura y 50 μ l de células MC1061. Las células se electropulsaron a 2,0 kV, 25 μ Fy 400 ohms(Ω). Después de la electroporación, se añadieron 600 μ l SOC (2% Bacto' Tryptone (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 20 0,5% (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSG₄ 10 mM, glucosa 20 mM). Las células de *E. coli* electroporadas se dispusieron en dos placas LB AMP (caldo LB (Lennox) en alícuotas de 200 μ l y a 50 μ l, Bacto Agar 1,8% (Difco), 100 mg/L Ampicillin). Las placas se incubaron boca abajo durante 24 horas a 37°C. Se seleccionaron aleatoriamente tres colonias resistentes a ampicilina y se enviaron para análisis de secuencias del inserto. Se aisló DNA plasmídico a gran escala de un clon confirmado en la secuencia, usando el kit Qiagen Maxi (Qiagen) de acuerdo 25 con las instrucciones del fabricante.

B. Construcción de zCytor17Lig(m)-CEE/pZMP21 de ratón

Se construyó además un plásmido de expresión que contenía todo el polinucleótido que codifica el zCytor17Lig-25 CEE murino (SEC ID NO:104 y SEC ID NO: 105) por recombinación homóloga, usando el método descrito en el Ejemplo 33A anterior. Los cebadores empleados fueron: (1) ZC41643 (SEC ID NO: 106) (directo, sentido 5' a 3') con una superposición de 28 bp 5' del punto de inserción; 21 bp del extremo 5' de zcytor17lig(m) y (2) ZC41641 (SEC ID NO: 107) (inverso, antisentido 5' a 3') con una superposición del vector de 37 bp 3' del punto de inserción; codón finalizador de 3 bp; marcador C-terminal EE de 21 bp; 24 bp del extremo 3' de zCytor17Lig(m)-CEE. El plásmido 30 se denominó zcytor17lig(m)-CEE/pZMP21. La secuencia de polinucleótidos de zcytor17lig(m)-CEE se muestra en la SEC ID NO: 104, y la correspondiente secuencia de polipéptidos se muestra en la SEC ID NO: 105.

Ejemplo 34

35 Transfección y expresión de polipéptidos zcytor17lig-CEE

A. Expresión de zcytor17lig-CEE/pZMP21 humano en células 293T

40 Se expresó ZCytor17Lig-CEE transitoriamente en células 293T (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, ATCC (SD-3515)) para generar la proteína purificada inicial. El día anterior a la transfección, se sembraron células 293T a 6,5x10⁴ células/cm en 30 matraces de cultivo T162 con un volumen total de 30 ml de medio de cultivo (SL7V4 +FBS al 5% + Pen/Estrep al 1%) por matraz. Las células se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C.

45 Se preparó una mezcla de DNA/Liposoma de la siguiente manera: Se llenaron dos tubos cónicos de 50 ml con 25 mL de medio de transfección (SL7V4 +Pen/Estrep al 1%), y se añadieron 1,13 mg de zCytor17Lig-CEE/pZMP21 (Ejemplo 33) a cada uno. Se llenó un conjunto separado de dos tubos cónicos de 50 ml con 22 ml de medio de 50 transfección (anteriormente mencionado), y se añadieron 3 ml de liposomas (Lipofectamine, Gibco) a cada uno. Para cada conjunto de tubos, se añadió un tubo de DNA a un tubo de liposomas y la mezcla de DNA/liposoma se incubó durante 30 minutos. Los dos tubos cónicos de 50 ml que contenían las mezclas de DNA/liposoma se combinaron (aproximadamente 100 ml) y se añadieron 300 ml de medio de transfección.

55 Los 30 matraces de las células 293T se decantaron, se lavaron 1x con aproximadamente 15 ml de PBS, y se les añadieron 12,5 ml de mezcla diluida de DNA/liposoma a cada matraz. Los matraces se incubaron durante 3 horas a 37°C. Después del periodo de incubación, se añadieron 25 ml de medio de cultivo (ya mencionado) a cada matraz de T162. El medio de transfección se recogió después de aproximadamente 96 horas y se usó para purificación de 60 proteínas (Ejemplo 35).

B. Expresión de zcytor17lig-CEE/pZMPP21 humano en células BHK

60 La proteína zCytor17Lig de longitud total se produjo en células BHK transfectadas con zCytor17Lig-CEE/pZMP21 (véase el Ejemplo 33 anterior). Las células BHK 570 (ATCC CRL-10314) se dispusieron en matraces de cultivo de tejido T75 y se dejaron desarrollar hasta aproximadamente 50 a 70% confluencia a 37°C, 5% CO₂, en medio de desarrollo (SL7V4, FBS al 5%, pen/estrep al 1%). Las células luego se transfectaron con zCytor17Lig-CEE/pZMP21 por transfección mediada por liposomas (usando LipofectamineTM; Life Technologies), en medio libre de suero (SF) (SL7V4). El plásmido (16 μ g) se diluyó en tubos de 1,5 ml hasta un volumen final total de 640 μ l con medio SF. Se mezclaron 65 35 microlitros de la mezcla de lípidos con 605 μ l de medio SF, y la mezcla resultante se incubó aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron entonces 5 microlitros de medio SF a la mezcla de DNA/lípido. Las

ES 2 310 660 T3

células se enjuagaron una vez con 10 ml de PBS, el PBS se decantó y se añadió la mezcla DNA:lípido. Las células se incubaron a 37°C durante cinco horas, luego se añadieron 15 ml de medio (SL7V4, FBS al 5%, pen/estrep al 1%) a cada placa. Las placas se incubaron a 37°C durante una noche, y al día siguiente la mezcla de DNA/lípido se reemplazó con medio de selección (SL7V4, FBS al 5%, pen/estrep al 1%, 1 μ M metotrexato). Aproximadamente 10 días después de la transfección, se tripsinizaron las colonias resistentes al metotrexato del matraz de transfección T75, y las células se combinaron, se dispusieron en matraces T-162 y se transfirieron a un cultivo a gran escala.

C. Expresión de *zcytor17lig-CEE(m)/pZMP21* de ratón en células 293T

10 Se expresó *zcytor17lig(m)-CEE* de ratón transitoriamente en células 293T, como se describió en el Ejemplo 34^a, y el medio de cultivo se usó para purificación de proteínas (Ejemplo 35).

Ejemplo 35

Purificación de *Zcytor17lig-CEE* en células 293T

15 A menos que se indique lo contrario, todas las operaciones se realizaron a 4°C. Se usó el siguiente procedimiento para purificar *Zcytor17lig* tanto de ratón como humano que contenía marcadores C-terminales Glu-Glu (EE) (SEC 20 ID NO: 103). Se purificó el medio condicionado de células 293T que expresaban *Zcytor17lig-CEE* (Ejemplo 34). Se determinaron las concentraciones de la proteína diana del medio condicionado vía análisis SDS-PAGE y transferencia Western con el anticuerpo anti-EE.

25 Una columna de 5,5 ml de anti-EE Poros 50 A (PE BioSystems, Framingham, MA) (preparada como se describió anteriormente) se vertió en una columna de vidrio Waters AP-1, de 1 cm x 7 cm (Waters, Milford, MA). La columna se llenó y equilibró con un BioCad Sprint (PE BioSystems, Framingham, MA) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4. El medio condicionado se ajustó con NaCl hasta, 0,3 M y el pH se ajustó hasta 7,2. El medio condicionado se cargó luego a la columna durante una noche con un caudal de aproximadamente 3 ml/minuto. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna (CV) de PBS a pH 7,4, y nuevamente se lavó con 3 CV 5X Sigma PBS a pH 7,4. Se eluyó gradualmente con acetato 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 2,5 a 3 ml/minuto. Los tubos de la fracción contenían 1 ml base Tris (sin ajuste de pH) para neutralizar la elución inmediatamente. La columna se lavó nuevamente por 2 CV con 5X Sigma PBS, pH 7,4 para neutralizar la columna, y luego se equilibró en PBS (pH 7,4). Se recogieron fracciones de 2 ml durante toda la cromatografía de elución y se vigiló la absorbancia a 280 y 215 nM; el pasaje y los lavados combinados también se conservaron y analizaron. Las fracciones pico de la elución ácida y 5X 30 PBS se analizaron para la proteína diana por tinción de Plata SDS-PAGE y transferencia Western con el anticuerpo primario anti-EE y el anticuerpo secundario, HRP antirratón conjugado. Las fracciones de elución ácida de interés se combinaron y concentraron de 38 ml a 0,8 ml usando un concentrador giratorio con un valor de corte del peso molecular de 5000 Dalton. (Millipore, Bedford, MA) según las instrucciones del fabricante.

40 Para separar *Zcytor17lig-CEE* del material agregado y de cualquier otra proteína co-purificadora contaminante, las fracciones concentradas combinadas se sometieron a cromatografía de exclusión de tamaño en una columna de 1,6 x 60 cm (120 ml) Superdex 75 (Pharmacia, Piscataway, NJ) equilibrada y cargada en PBS a un caudal de 1,0 ml/min usando un BioCad Sprint. Se recogieron fracciones de 3 ml en toda la cromatografía y se vigiló la absorbancia a 280 y 215 nM. Las fracciones pico se caracterizaron por tinción de plata SDS-PAGE, y se combinaron solamente las fracciones más puras. Este material representó la proteína *Zeytor17lig-CEE* purificada.

50 En geles SDS-PAGE teñidos con plata, azul Coomassie y transferencias Western, el *Zcytor17lig-CEE* fue una banda principal. La concentración de la proteína del material purificado se realizó por análisis BCA (Pierce, Rockford, IL) y la proteína se dividió en alícuotas y se conservó a -80°C según procedimientos convencionales.

Para preparar PorosA50 anti-EE, se lavó un volumen de lecho de 65 ml de Poros A50 (PE Biosystems) con 100 ml de agua y luego trietanolamina 0,1 M, pH 8,2 (TEA, ICN, Aurora, Ohio), Na₂SO₄ 1M, pH 8,8 que contenía azida de sodio al 0,02%, usando una unidad de filtro con matraces a vacío. La solución de anticuerpo monoclonal EE, a una concentración de 2 mg/ml en un volumen de 300 ml, se mezcló con la resina lavada en un volumen de 250 ml. Despues de una incubación de una noche a temperatura ambiente, el anticuerpo no unido se eliminó lavando la resina con 5 volúmenes de TEA 200 mM, Na₂SO₄ 1M, pH 8,8 que contenía azida de sodio al 0,02%, como se describió precedentemente. La resina se resuspendió en 2 volúmenes de TEA, Na₂SO₄ 1 M, pH 8,8 que contenían azida de sodio al 0,02%, y se transfirió a un recipiente adecuado. Se añadieron 3 ml de 25 mg/ml (68 mM) Disuccinimidilsuberato (en DMSO provisto por Pierce, Rockford, IL) y la solución se incubó durante tres horas a temperatura ambiente. Los sitios no específicos en la resina se bloquearon luego incubando durante 10 min a temperatura ambiente con 5 volúmenes de etanolamina 20 mM (Sigma, St. Louis, MO) en TEA 200 mM, pH 8,8 usando la unidad de filtro de matraces a vacío. La resina se lavó con PBS, pH 7,4, seguido de Glicina 0,1 M, pH 3 y luego se neutralizó con 10X PBS. Despues de lavar con agua destilada, la resina anti-EE Poros-A 50 acoplada final se conservó a 4°C en etanol al 20%.

Ejemplo 36

*Secuenciación N-terminal de Zcytor17lig de ratón y humano*5 *A. Secuenciación N-terminal de Zcytor17lig humano*

Se llevó a cabo una secuenciación automática convencional de polipéptidos N-terminal (degradación Edman) usando reactivos de Applied Biosystems. El análisis de la secuencia N-terminal se realizó en un Sistema Secuenciador de Proteínas Modelo 494 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). El análisis de los datos se efectuó con el Sistema de Análisis de Datos de Secuenciación de Proteínas, Modelo 610GA, versión 2.1a (Applied Biosystems).

10 Se proporcionó una muestra de zcytor17lig-CEE humano purificado (Ejemplo 35). La muestra se cargó a un filtro de fibra de vidrio preparado para secuenciación n-terminal. El filtro de fibra de vidrio se preparó pre-cicladólo con Biobrene™.

15 El análisis de la secuencia N-terminal del polipéptido zcytor17lig humano segregado no verificó el sitio de escisión pronosticado de la secuencia de señal, pero resultó en un comienzo maduro en el residuo 27(Leu) de la SEC ID NO: 2 de la secuencia del precursor zcytor17lig humano.

20 *B. Secuenciación N-terminal de Zcytor17lig de ratón*

Se llevó a cabo una secuenciación automática convencional de polipéptidos N-terminal (degradación Edman) usando reactivos de Applied Biosystems. El análisis de la secuencia N-terminal se realizó en un Sistema Secuenciador de Proteínas Modelo 494 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). El análisis de los datos se efectuó con el Sistema de Análisis de Datos de Secuenciación de Proteínas, Modelo 610GA, versión 2.1a (Applied Biosystems).

25 Se proporcionó una muestra de zcytor17lig-CEE de ratón purificado capturada en esferas de Proteína G Sepharose/anti-EE (Ejemplo 35). Las esferas se dispusieron en un tampón de muestra SDS PAGE reductor y en agua hirviendo antes de llevar a cabo el análisis SDS PAGE, usando un sistema SDS PAGE Novex (4-12% Bis-Tris MES NuPAGE; Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El gel se electrotransfirió a una membrana Novex PVDF (Invitrogen), y se tiñó con azul de Coomassie (Sigma, St. Louis, MO) usando métodos convencionales. Se efectuaron las correspondientes transferencias Western anti-EE para identificar la banda zcytor17lig para secuenciación de la proteína N-terminal. El anticuerpo conjugado con HRP de IgG anti-EE de ratón utilizado se produjo internamente.

30 El análisis de la secuencia N-terminal del polipéptido zcytor17lig de ratón segregado verificó el sitio de escisión pronosticado de la secuencia de señal, resultando en un comienzo maduro en 31 (Ala) en referencia a la SEC ID NO: 11 y a la SEC ID NO: 91 de la secuencia precursora de zcytor17lig de ratón.

Ejemplo 37

40 *Ensayo de unión de células Cos*

Se usó un ensayo de unión para ensayar la unión del zcytor17lig a receptores que comprenden el receptor zcytor17, como por ejemplo el receptor zcytor17 o los receptores heterodímeros y trímeros que comprenden el receptor zcytor17 (p. ej., zcytor17/OSMR, zcytor17/WSX-1 o zcytor17/OSMR/WSX-1, u otras subunidades receptoras de citocinas de Clase I). El DNA plasmídico del receptor Zcytor17 se transfeció en células COS y las células COS transfectadas se emplearon para evaluar la unión del zcytor17lig a los receptores que comprenden el receptor zcytor17, como se describe a continuación.

45 *A. Transfección de células COS*

50 La transfección de células COS se realizó de la siguiente manera: Se mezclan 800 ng del DNA plasmídico del receptor en las siguientes combinaciones: pZp7pX/zcytor17 solo; pZp7Z/WSX-1 solo; pZp7NX/OSMR solo; pZp7pX/zcytor17 + pZp7NX/OSMR; pZp7pX/zcytor17 + pZp727WSX-1; pZp7NX/OSMR + pZpTZAVSX-1; pZp7pX/zcytor17 + pZp7NX/OSMR + pZp7Z/WSX-1) y 4 ul Lipofectamine™ en 80 ul medio DMEM libre de suero (55 mg piruvato de sodio, 146 mg L-glutamina, 5 mg transferrina, 2,5 mg insulina, 1 µg selenio y 5 mg fetuina en 500 ml DMEM), se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se añaden 320 µl de medio DMEM libre de suero. A esto se le añade una mezcla de 400 µl a 2x10⁵ células COS/pocillos de una placa de cultivo de 12 pocillos (recubiertos con fibronectina) y se incuba durante 5 horas a 37°C. Se añaden 500 ul de medio DMEM FBS al 20% (100 ml FBS, 55 mg piruvato de sodio y 146 mg L-glutamina en 500 ml DMEM), y se incuba durante una noche.

55 *B. Ensayo de unión*

60 El ensayo de unión se realizó de la siguiente manera: se eliminan las células del medio con PBS + BSA al 0,1%, y luego las células se bloquean durante 60 minutos con la misma solución. Las células se incuban durante 1 hora en PBS + BSA al 0,1% con 1,0 ug/ml proteína purificada con zcytor17ligCEE. Las células luego se lavan con + BSA al 0,1% y se incuban durante otra hora con anticuerpo anti-GluGlu de ratón diluido 1:1000. Las células se vuelven a lavar con PBS + BSA al 0,1%, después se incuban durante 1 hora con anticuerpo conjugado con HRP antirratón de cabra diluido 1:200.

ES 2 310 660 T3

La unión positiva se detectó con reactivo de fluoresceína tiramida diluido 1:50 en tampón de dilución (kit NEN) y se incubó durante 4-6 minutos, y se lavó con PBS + BSA al 0,1%. Las células se fijaron durante 15 minutos con formaldehído al 1,8% en PBS, luego se lavaron con PBS + BSA al 0,1%. Las células se conservaron con medio Vectashield Mounting (Vector Labs Burlingame, CA) diluido 1:5 en PBS. Las células se visualizaron usando un filtro 5 FITC en un microscopio fluorescente.

Se detectó unión positiva para las células transfectadas con zcytor17 solamente, zcytor17+OSMRbeta, zcytor17+WSX-1 y zcytor17+OSMRbeta+WSX-1. No se detectó unión para las células transfectadas con WSX-1 + OSMRbeta, con OSMRbeta solamente o con WSX-1 solamente.

10 Ejemplo 38

El zcytor17lig de ratón activa el receptor zcytor17/OSMRbeta de ratón en el ensayo de luciferasa

15 A. Clonación de zcytor17 de ratón de longitud total y OSMRbeta de ratón para expresión

Se cribó una genoteca de cDNA de testículos de ratón para un clon de longitud total de zcytoR17 de ratón. La genoteca se dispuso a 65.500 cfu/placa en 24 placas LB + Amp. Las siembras del filtro se prepararon usando Hybond N. (Amersham-Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) en un total de aproximadamente 1,6 millones de colonias. 20 Los filtros se marcaron con una aguja caliente para orientación y luego se desnaturizaron durante 6 minutos en NaOH 0,5 M y Tris-HCl 1,5 M, pH 7,2. Los filtros se neutralizaron luego en NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M, pH 7,2 durante 6 minutos. El DNA se fijó a los filtros usando un entrecruzador de UV (Stratalinker®, Stratagene, La Jolla, CA) a 1200 julios. Se dejó secar los filtros durante una noche a temperatura ambiente.

25 Al día siguiente, los filtros se prelavaron a 65°C en tampón de prelavado de 0,25X SSC, SDS al 0,25% y EDTA 1 mM. Los residuos celulares se eliminaron manualmente usando Kimwipes® (Kimberly-Clark), y la solución se cambió 3 veces durante un periodo de 1 hora. Los filtros se secaron al aire y se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso. Los filtros luego se prehibridaron durante aproximadamente 3 horas a 63°C en 20 ml de solución de hibridación ExpressHyb™ (Clontech, Palo Alto, CA).

30 Se generó la Sonda B (Ejemplo 31) por PCR del molde de zcytoR17 humano, usando los cebadores de oligonucleótidos ZC27,895 (SEC ID NO: 20) y ZC28,917 (SEC ID NO: 83), y se marcó radiactivamente con ³²P, empleando un kit comercialmente disponible (Megaprime DNA Labeling System; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) según las instrucciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna Stratagene™ (columna NucTrap®; 35 Stratagene, La Jolla, CA). La sonda se desnaturizó a 100°C durante 15 min y se añadió a ExpressHyb™. Los filtros se hibridaron en 15 ml de solución de hibridación que contenía 1,6 x 10⁶ cpm/ml de sonda a 63°C durante una noche. Los filtros se lavaron a 55°C en 2X SSC, SDS al 0,1% y EDTA 1 mM, y se expusieron a película de rayos X a -80°C durante 4 1/2 días. Se escogieron trece positivos de las placas como tapones, y se dispuso 1 ml en tubos LB +amp de 1,7 ml. Los tubos se dejaron a 4°C durante una noche. Estos 13 positivos se sometieron a otras dos tandas de purificación. Las placas terciarias se desarrollaron excesivamente a 37°C después de tomar las siembras del filtro, y las 40 colonias sencillas se recogieron y enviaron a secuenciación. Se determinó que tres de éstas contenían la secuencia del ortólogo de ratón de zcytoR17.

45 Además, se generó un producto PCR usando cDNA de CTLL-2 como molde y los oligonucleótidos ZC38,239 (SEC ID NO: 108) y ZC38,245 (SEC ID NO: 109) como cebadores. CTLL-2 es una línea celular de linfocitos T citotóxica de ratón (ATCC No. TIB-214). Esta reacción PCR se llevó a cabo de la siguiente forma: 1 ciclo a 95°C durante 1 minuto, 30 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 68°C durante 3 minutos, luego 68°C durante 10 minutos; impregnación a 4°C. La reacción PCR usó aproximadamente 0,5 ng de cDNA, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 µl de mezcla de polimerasa Advantage II (ClonTech). Aproximadamente 6% del producto PCR se usó como 50 molde en una nueva reacción PCR, como anteriormente, excepto que con los oligonucleótidos ZC38,239 (SEC ID NO: 108) y ZC38,238 (SEC ID NO: 110). Esta reacción PCR se llevó a cabo del siguiente modo: 30 ciclos a 94°C durante 45 segundos, 65°C durante 45 segundos, 72°C durante 1 minuto, luego 72°C durante 7 minutos; impregnación a 10°C. La mayor parte de la reacción PCR se cargó a un gel de agarosa al 1,0% y la banda predominante se cortó a aproximadamente 360 bp, el fragmento de DNA se eluyó y se realizó la secuenciación de DNA.

55 La secuencia del polinucleótido zcytor17 de ratón se muestra en la SEC ID NO: 111, y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID NO: 112. Además, se muestra una forma soluble truncada del polinucleótido zcytor17 de ratón en la SEC ID NO: 113, y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID NO: 114.

60 Para obtener cDNA de OSMRbeta de longitud total de ratón se aislaron los productos PCR 5' y 3' y se unieron usando un sitio BamHI interno. Los cebadores PCR se diseñaron usando la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 119 e incluyen los sitios de restricción EcoRI y XbaI para fines de clonación. La secuencia de ácido nucleico de OSMRbeta de ratón genómico se muestra en la SEC ID NO: 119, en donde la secuencia codificante abarca los residuos 65 780 a 3692 que codifican un polipéptido de 970 aminoácidos OSMRbeta de ratón, que se muestra en la SEC ID NO: 120. Una secuencia de ácido nucleico degenerada, que codifica el polipéptido de la SEC ID NO: 120, se muestra en la SEC ID NO: 121.

ES 2 310 660 T3

- Se generó un producto PCR 5' usando una genoteca de cDNA de 3T3-L1 (adipocitos de ratón diferenciados) interna como molde y los oligonucleótidos ZC41,764 (SEC ID NO: 115) y ZC41,598 (SEC ID NO: 116) como cebadores. Esta reacción PCR 5' se realiza de la siguiente manera: 30 ciclos a 95°C durante 45 segundos, 55°C durante 45 segundos, 72°C durante 1 minuto 30 segundos, luego 72°C durante 7 minutos; impregnación a 4°C. La reacción PCR utilizó 5 aproximadamente 3 µg de plásmido preparado a partir de la genoteca de cDNA, 20 pmoles de cada oligonucleótido y cinco unidades de DNA polimerasa Pwo (Roche). Aproximadamente 90% del producto PCR 5' se digirió con EcoRI y BamHI y se purificó en gel en un gel de agarosa al 1,0%. La banda de aproximadamente 1446 bp se cortó y usó para ligadura (véase a continuación).
- 10 Se generó un producto PCR 3' usando una genoteca de cDNA interna de placenta de ratón como molde, y los oligonucleótidos ZC41,948 (SEC ID NO: 117) y ZC41,766 (SEC ID NO: 118) como cebadores. Esta reacción PCR 3' se realizó de la siguiente manera: 30 ciclos a 95°C durante 45 segundos, 55°C durante 45 segundos, 72°C durante 1 minuto 30 segundos, luego 72°C durante 7 minutos; impregnación a 4°C. La reacción PCR usó aproximadamente 3 µg de plásmido preparado a partir de la genoteca de cDNA, 20 pmoles de cada oligonucleótido y cinco unidades de 15 DNA polimerasa (Roche). Aproximadamente 90% del producto PCR 3' se digirió con BamHI y XbaI, y se purificó en gel sobre un gel de agarosa al 1,0%. La banda de aproximadamente 2200 bp se cortó y usó para ligadura junto con el producto PCR 5' (ya descrito) al vector de expresión pZP-5Z digerido con EcoRI y XbaI. La ligadura de tres partes se efectuó con el fragmento anterior de 5' EcoRI a BamHI, el fragmento de 3' BamHI a XbaI y el vector de expresión pZP-5Z digerido con EcoRI y XbaI. Esto generó un plásmido pZP-5Z que contenía cDNA de longitud 20 total para OSMRbeta de ratón (nucleótidos 780 a 3692 de la SEC ID NO: 119), designado pZP-5Z/OSMRbeta. El cDNA OSMRbeta de ratón de longitud total en pZP5Z/OSMRbeta tiene dos inserciones de aminoácidos de la SEC ID NO: 120. Hay una duplicación del aminoácido Glicina en la posición 370 y una duplicación del aminoácido Ácido Glutámico en la posición 526. El plásmido pZP-5Z es un vector de expresión mamífera que contiene un casete de expresión que tiene el promotor CMV, múltiples sitios de restricción para inserción de secuencias codificantes y un 25 terminador de la hormona del crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de resistencia a zeocina y el terminador SV40.

Los transformantes resultantes se secuenciaron para confirmar la secuencia de cDNA OSMRbeta de ratón.

30 **B. Construcción de líneas celulares BaF3/KZ134/zcytor17m, BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam, BHK/KZ134/zcytor17m y BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam**

Se transfecaron las líneas celulares estables BaF3/KZ134 y BHK/KZ134 (Ejemplo 20) con un plásmido de 35 expresión que codifica zcytor17 de ratón de longitud total, pZP-7P/zcytor17m (Ejemplo 38A), para crear células BaF3/KZ134/zcytor17m y BHK/KZ134/zcytor17m, respectivamente. El plásmido de expresión de OSMRbeta de ratón, pZP-5Z/OSMRbetam (Ejemplo 38A), se transfeció luego a estas células para crear las líneas celulares BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam y BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam, respectivamente. Los métodos fueron los descritos en el Ejemplo 4, con la excepción de que BaF3/KZ134/zcytor17m y BHK/KZ134/zcytor17m se seleccionaron 40 con, además de Geneticina, 2 ug/ml puromicina, mientras que BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam y BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam se seleccionaron con, además de Geneticina, 2 ug/ml puromicina y 200 ug/ml zeocina.

Los clones se diluyeron, se dispusieron en placas y se seleccionaron usando técnicas convencionales. Los clones 45 se criaron por el ensayo de luciferasa (véase Ejemplo 20) usando medio condicionado de zcytor17lig ratón o proteína zcytor17lig de ratón purificada (Ejemplo 35) como inductor. Se seleccionaron los clones con la respuesta de luciferasa más alta (vía luciferasa STAT) y el fondo más bajo. Se seleccionaron líneas celulares transfectantes estables.

50 **C. El zcytor17lig de ratón activa el receptor zcytor17 de ratón en el ensayo de luciferasa de BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam o BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam**

Las líneas celulares se colocaron en placas para los ensayos de luciferasa descritos en el Ejemplo 20 anterior. Se evaluó la activación STAT de las células BaF3/KZ134/Zcytor17m, BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam, BHK/KZ134/zcytor17m o BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam usando (1) medio condicionado de células BHK570 transfectadas con el zcytor17lig humano (Ejemplo 7), (2) medio condicionado de células BHK570 transfectadas con el 55 zcytor17lig de ratón (Ejemplo 18), (3) zcytor17lig de ratón y humano purificado (Ejemplo 35), y (4) medio libre de mIL-3 para medir la respuesta control del medio únicamente. Los ensayos de luciferasa se realizaron como se describió en el Ejemplo 20.

Los resultados de este ensayo confirman la respuesta del indicador STAT de las células BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam y BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam al zcytor17lig de ratón, en comparación con las células BaF3/KZ134/zcytor17m, las células BHK/KZ134/zcytor17m o las células no transfectadas BaF3/K2134 o control BHK/KZ134, y demuestran que la respuesta es mediada por los receptores zcytor17/OSMRbeta de ratón. Los resultados también muestran que el zcytor17lig humano no activa el ensayo del indicador STAT a través del complejo receptor de ratón.

ES 2 310 660 T3

Ejemplo 39

Unión de zcytor17lig humano a zcytor17 y zcytor17/OSMRbeta por citometría de flujo

5 La biotinilación de zcytor17L humano se realizó de la siguiente manera: se combinaron 100 μ L de zcytor17 a 5,26 mg/mL con 30 μ L de 10 mg/mL EZ-link Sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce, Rockford, IL) disueltos en ddH₂O. Esta solución se incubó en un eje oscilante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la biotinilación, la solución se dializó en PBS usando un casete de diáfiltración Slide-A-Lyzer.

10 Para ensayar las propiedades de unión del zcytor17lig humano a diferentes combinaciones de receptores, ambas células BHK y BAF3 se transfecaron con plásmidos de expresión usando técnicas convencionales conocidas en el campo. Estos plásmidos se transfecaron a ambas líneas celulares en las siguientes combinaciones: zcytor17 solo, OSMRbeta solo, y zcytor17 y OSMRbeta. La transfección se realizó como se detalló anteriormente. Se usaron células BHK y BAF3 no transfecadas como controles. Las células se tiñeron por FACS de la siguiente manera: se tiñeron células 2E5 con: 2,0/ μ g/mL, 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1,0 ng/mL, 100 pg/mL, 10 pg/mL, 1,0 pg/mL de zcytor17L biotinilado o se dejaron sin teñir durante 30 minutos sobre hielo en tampón FACS (PBS + BSA al 2% + NHS al 2% (Gemini) + NGS al 2%). Las células se lavaron 1,5 veces y luego se tiñeron con SA-PE (Jackson Immuno Laboratories) a 1:250 durante 30 minutos sobre hielo. Las células se lavaron luego 1,5 veces con tampón FACS, se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron por FACS en un BD FACSCaliber usando el software CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

15 Ambas células BHK y BAF3 demostraron que el zcytor17lig se unía tanto a zcytor17 solo como combinado con OSMRbeta, donde la unión al heterodímero zcytor17/OSMRbeta era levemente más fuerte. No se observó unión en ninguna de las líneas celulares que expresaban OSMRbeta solo. El zcytor17lig se unió en un modo dependiente de la 20 concentración. Los valores de intensidad fluorescente media (MFI) para la unión de BHK se exponen en la Tabla 15.

TABLA 15

zcytor17 μ g/mL	2,0	0,100	0,010	0,001	0,0001	0,00001	0,000001	0,0
BHK C17+OSMRbeta	3780	2126	328	53	17	15	14	13
BHK-C17	3032	1600	244	39	16	15	14	15
BHK-OSMRbeta	13	X	X	X	X	X	X	0
BHK-WT	15	14	13	X	X	X	X	13

zcytor17 μ g/mL	10,0	3,33	1,11	0,37	0,12	0,04	0,00
BAF3-C17-fOSMRbeta	531	508	489	441	364	247	7
BAF3-OSMRbeta	6	5	5	5	5	5	11
BAF3-WT	13	13	12	12	12	12	13

zcytor17 μ g/mL	100,0	10,0	1,0	0,0
BAF3-C17	347	72	17	7

Ejemplo 40

Ánálisis de matriz de expresión génica de células tratadas con Zcytor17lig humano

60 Se aisló RNA de células A549 tratadas con zcytor17lig humano, células SK-LU-1 tratadas con zcytor17lig y células control no tratadas, usando el kit RNeasy Midi (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante.

ES 2 310 660 T3

El perfil de expresión génica de las células tratadas con zcytor17lig y de las células control respectivas se llevó a cabo usando matrices de expresión de cDNA de la serie GEArray Q (SuperArray Inc., Bethesda, MD). Las matrices de expresión de cDNA de la serie Q contienen hasta 96 fragmentos de cDNA asociados con una vía biológica específica, o genes con funciones o características estructurales similares. La comparación de matrices de células tratadas y células control permite una determinación del aumento y la disminución de genes específicos. El marcado, la hibridación y detección de sondas se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La detección de señal quimiluminiscente y los datos de adquisición se llevaron a cabo en una estación de trabajo Lumi-Imager (Roche, Indianapolis, IN). Los datos de imágenes resultantes se analizaron usando el software ImageQuant 5.2 (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ) y GEArray Analyzer 1.2 (SuperArray Inc., Bethesda, MD).

10 El análisis de los resultados de las matrices de receptor e interleucina humana de la serie Q HS-014N demostró, después de la normalización, un incremento aproximado de 4,7 veces la señal de 2L13RA2 en las células SK-LU-1 humanas tratadas con zcytor17lig y un incremento aproximado de 2,2 veces en la señal de EL13RA2 en las células A549 humanas tratadas con 2cytor17lig.

15 Estos resultados indican que el zcytor17lig aumentó significativamente BU3RA2 en las células SK-LU-1 y A549. Ambas son líneas celulares consolidadas derivadas de carcinomas pulmonares humanos (Blobel *et al.*, *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*, 1984; 45(4):407-29). Más específicamente, A549 se caracteriza como una línea celular epitelial de pulmón humano (Lin, *et al.*, *J Pharm Pharmacol.*, 2002 Sep; 54(9): 1271-8; Martinez *et al.*, *Toxicol Sci.*, 2002 Oct; 69(2):409-23).

20 Se ha demostrado que la interleucina 13 (IL13), una citocina segregada por linfocitos T activados, es necesaria y suficiente para la expresión de asma alérgica y para uso en modelos experimentales de asma, que incluyen hipersensibilidad de las vías respiratorias, incorporación de eosinófilos y superproducción mucosa (Wills-Karp *et al.*, *Science*, 1998; 282:2258-2261). Se ha demostrado que la neutralización selectiva de IL13 alivia el fenotipo del asma (Gruening *et al.*, *Science*, 1998; 282:2261-2263). También se ha publicado que la IL13 está implicada en el incremento de la expresión del gen de mucina MUC8 en el epitelio de pólipos nasales humanos y en el epitelio nasal cultivado (Kimm *et al.*, *Acta Otolaryngol.*, 2002; Sep; 122(6):638-643; Seong *et al.*, *Acta Otolaryngol.*, 2002; Jun; 122(4):401-407). MUC8, una importante mucina glucoproteína de las vías respiratorias, desempeña una función en la patogenia de la hipersecreción mucosa en sinusitis crónica con pólipos (Seong *et al.*, *Acta Otolaryngol.*, 2002; Jun; 122(4): 401-407).

25 Funcionalmente, la IL-13 se señala a través de un complejo receptor que consiste en la cadena alfa-1 del receptor de interleucina 13 (IL13RA1) y el receptor IL-4 alfa (IL4RA) (Daines y Hershey, *J Biol Chem.*, 2002; 22(12): 10387-10393). También se ha demostrado que el receptor de interleucina 13 alfa-2 (IL13RA2) se une a IL-13 con gran afinidad, pero por sí mismo (Daines y Hershey, *J Biol Chem.*, 2002; 22(12): 10387-10393). Este receptor carece, no obstante, del dominio citoplasmático necesario para la señalización y, en consecuencia, se considera un receptor engañoso. Se ha demostrado que IL13RA2 es predominantemente una molécula intracelular que puede movilizarse rápidamente desde almacenamientos intracelulares y expresarse superficialmente después del tratamiento celular con interferón (IFN)-gamma. La expresión superficial de IL13RA2 después del tratamiento con IFN-gamma no implica la síntesis de proteínas y produce señalización IL13 disminuida (Daines y Hershey, *J Biol Chem.*, 2002; 22(12):10387-10393).

30 Los resultados de los análisis de matrices de expresión génica para zcytor17lig indican que la acción de zcytor17lig es nueva para aquella de IFN-gamma en el sentido que el tratamiento con zcytor17lig de las líneas celulares derivadas del epitelio pulmonar produjeron un aumento significativo de la expresión del gen IL13RA2. Por lo tanto, el tratamiento de zcytor17lig puede ser beneficioso en casos en los que se deseé un incremento a largo plazo de la expresión de IL13RA2 y una disminución de IL13, como en asma, hiperactividad de las vías respiratorias (AHR) y regulación de mucina, incluyendo sinusitis crónicas con pólipos.

35

Ejemplo 41

Ratones transgénicos con zcytor17lig murino

40

45 Para evaluar los efectos *in vivo* de la sobreexpresión de zcytor17lig, se generaron múltiples fundadores de ratones transgénicos que expresan la forma murina del gen, impulsados por dos promotores diferentes: el promotor específico de linfocitos E μ /lck, y el promotor ubicuo, EFl α (Ejemplo 22). Los niveles de proteína en el suero oscilan entre aproximadamente 20-300 ng/ml. El promotor E μ /lck generó ratones con niveles más altos de proteína en suero que aquéllos de los ratones transgénicos de EFl α -zcytor17lig.

50 Los ratones transgénicos con zcytor17lig desarrollaron un fenotipo de piel alrededor de las 4-8 semanas de vida. La piel de los ratones transgénicos se tornó "encrespada", con piloerección evidente y alopecia leve a extensa, usualmente en el lomo, los laterales del torso y alrededor de los ojos. Este fenotipo se encontró coherentemente en ratones con niveles detectables de la proteína zcytor17lig en el suero. Entre los fundadores, se observó un índice de 100% incidencia entre ratones que expresaban el gen promovido por E μ /lck, y 50% incidencia en ratones transgénicos EFl α -zcytor17lig, lo que se correlacionó bien con los niveles relativos de zcytor17lig detectados en el suero. La piel transgénica pareció ser prurítica, según lo evidenciado por la conducta de rascado de los ratones, algunas veces lo su-

ficientemente excesiva como para inducir excoriación y lesiones de la piel, que por lo general se infectaba (con por lo menos *Staphylococcus aureus*). Los ratones se identificaron originalmente con marcadores metálicos en la oreja, pero en la mayoría de los casos, los propios ratones se quitaron los marcadores de la oreja a la fuerza. Esto por lo general provocó daño extenso al oído externo. Estas orejas lastimadas no cicatrizaron correctamente, según lo reflejado en 5 presencia de pústulas y costra de larga duración, y una herida penetrante, extensa, que se manifestó en muchos de los animales, detrás y entre las orejas. Algunos de los ratones transgénicos también presentaron heridas con escaras en los hombros y en el cuello. Las lesiones de la piel se observaron en un subconjunto de los animales y, en general, se desarrollaron en áreas de piel en las que ya se había manifestado alopecia, y a menudo se exacerbaron por la conducta de rascado de los animales.

10 Se usó análisis RT-PCR cuantitativo en tiempo real para detectar transcripciones de RNA de zcytor17lig en muestras de piel transgénicas (pero no en muestras no transgénicas), donde la piel transgénica con $E\mu/lck$ expresó más RNA de zcytor17lig que la piel de ratones transgénicos con $EFla-zcytor17lig$. Los genes que codifican las subunidades receptoras de zcytor17, zcytor17 y OSM-Rbeta se expresaron en la piel de ratones no transgénicos y transgénicos con 15 zcytor17lig.

20 Un examen de los tejidos linfoides de un subconjunto de los fundadores transgénicos de $E\mu/lck$ por citometría de flujo reveló un incremento significativo en la proporción de células T activadas en el bazo y los ganglios linfáticos de estos ratones. Dos de los cuatro ratones analizados tenían ganglios linfáticos cervicales extensamente agrandados, 25 posiblemente debido a la presencia de lesiones en el cuello. Se observó un aumento sutil en el peso del bazo y un aumento leve de los monocitos y neutrófilos circulantes en la sangre de los ratones transgénicos. No hubo ningún aumento en una diversidad de citocinas ensayadas, ni hubo cambios en los niveles de amiloide A en el suero circulante de estos ratones. Los efectos sobre las células inmunitarias en los ratones transgénicos pueden ser un resultado directo o indirecto del zcytor17lig, o son efectos secundarios de las lesiones en la piel.

25 Se realizó la histopatología de muchos tejidos distintos de la piel, incluyendo hígado, timo, bazo, riñón y testículos, y no se observaron anomalías significativas en estos órganos. El análisis de la piel transgénica, no obstante, reveló una serie de alteraciones, que variaban en gran medida dependiendo de la fuente y ubicación de la piel (p. ej., normal, sin pelo o con lesiones). En muchos casos, las orejas de los ratones transgénicos presentaban epidermis engrosada 30 en comparación con los controles no transgénicos (p. ej., aproximadamente 4 capas frente a 2 capas), y los tejidos subyacentes contenían cantidades bajas a moderadas de células inflamatorias, que eran principalmente mononucleares con neutrófilos ocasionales. La epidermis del abdomen pareció levemente engrosada multifocalmente en los ratones transgénicos, pero no hubo un incremento obvio de células inflamatorias en el subcutis o la dermis subyacente. En las 35 porciones sin pelo de la piel de estos ratones, se observaron folículos de pelo dilatados que contenían algunos sedimentos pero sin el tallo del pelo (p. ej., pelos desprendidos de las raíces). En las áreas lesionadas, hubo un engrosamiento extenso de la epidermis (acantosis), aumento de queratina en la superficie de la piel (hiperqueratosis), úlceras diseminadas de distintos tamaños y cantidades significativas de células inflamatorias en la dermis (principalmente neutrófilos, 40 con cantidades variables de macrófagos y linfocitos). La dermis también contenía numerosos mastocitos que rodeaban las lesiones. Algunos de los tallos de pelo en las áreas lesionadas de la piel transgénica estaban en la etapa activa (anágeno), en contraste con muchos de los tallos de pelo en áreas "normales" que estaban en la etapa de involución (catágeno) a inactiva (telógeno).

45 El fenotipo de los ratones transgénicos con zcytor17lig se asemeja en alto grado a aquel de pacientes con dermatitis atópica (AD), y de modelos de ratones de AD. La AD es una enfermedad inflamatoria crónica común que se caracteriza por citocinas hiperactivadas del subconjunto de linfocitos T cooperadores 2 (Th2). Zcytor17lig es expresado preferencialmente por células Th2 versus Th1, lo que sustenta incluso más esta comparación. Si bien se desconoce la etiología exacta de la AD, se han implicado múltiples factores, incluyendo respuestas inmunitarias de Th2 hiperactiva, autoinmunidad, infecciones, alergenos y predisposición genética. Las características clave de la enfermedad incluyen xerosis (sequedad de la piel), prurito (comezón de la piel), conjuntivitis, lesiones inflamatorias de la piel, infección 50 por *Staphylococcus aureus*, eosinofilia sanguínea elevada, elevación de IgE e IgG1 en suero, y dermatitis crónica con infiltración de células T, mastocitos, macrófagos y eosinófilos. Se ha reconocido que la colonización o infección con *S. aureus* exacerbaba la AD y perpetúa la cronicidad de esta enfermedad de la piel.

55 La AD por lo general se observa en pacientes con asma y rinitis alérgica, y es frecuentemente la manifestación inicial de enfermedad alérgica. Aproximadamente 20% de la población de países occidentales sufre de estas enfermedades alérgicas, y la incidencia de la AD en países desarrollados está ascendiendo por razones desconocidas. La AD típicamente comienza en la infancia y con frecuencia puede persistir en la adolescencia y la adultez. Los tratamientos actuales contra la AD incluyen corticosteroides tópicos, ciclosporina A oral, inmunosupresores sin corticosteroides tales como tacrolimus (FK506 en forma de ungüento) e interferón-gamma. A pesar de la diversidad de tratamientos 60 para la AD, los síntomas de muchos pacientes no mejora, o tienen reacciones adversas a los medicamentos, lo que requiere la búsqueda de otros agentes terapéuticos más eficaces.

65 Las células epiteliales, que expresan el receptor heterodimérico para zcytor17lig (zcytoR17 y OSM-Rbeta), están ubicadas en los sitios (p. ej., piel, intestino, pulmón, etc.) de entrada de alergenos al organismo e interactúan junto con las células dendríticas (células que presentan antígenos profesionales) *in situ*. Las células dendríticas cumplen una función importante en la patogenia de las enfermedades alérgicas, y el zcytor17lig puede interactuar con su receptor en las células epiteliales de piel y pulmón e influenciar las respuestas inmunitarias de estos órganos. El Zcytor17lig y su receptor o receptores pueden, por lo tanto, contribuir a la patogenia de enfermedades alérgicas tales como la AD

ES 2 310 660 T3

y el asma. Asimismo, el fenotipo de ratones transgénicos con zcytor17lig indica que este ligando puede desempeñar una función en la cicatrización de heridas, ya que los ratones parecen incapaces de reparar el daño de las orejas, y a menudo presentan lesiones a largo plazo en el lomo y los laterales. Un antagonista de zcytor17lig podría, en consecuencia, representar un agente terapéutico viable para éstas y otras indicaciones.

5

Ejemplo 42

10 *Ensayo de luciferasa en líneas celulares epiteliales transformadas humanas vía infección transitoria con un gen indicador STAT/SRE adenovírico*

15 Se sembró una gran variedad de líneas celulares epiteliales transformadas humanas (véase Tabla 16 a continuación) en placas de 96 pocillos con fondo plano a 10.000 célula/pocillo en medio de desarrollo regular, según lo especificado para cada tipo de célula. Al día siguiente, las células se infectaron con un constructo indicador de adenovirus, KZ136, a una multiplicidad de infección de 5000. El indicador KZ136 contiene los elementos STAT, además de un elemento de respuesta sérico. El volumen total fue 100 μ l/pocillo, usando DMEM enriquecido con L-glutamina 2 mM (GibcoBRL), piruvato de sodio 1 mM (GibcoBRL) y 1x complemento de Insulina-Transferrina-Selenio (GibcoBRL) (en lo sucesivo denominado medio libre de suero). Las células se cultivaron durante toda la noche.

20 25 Al día siguiente, el medio se eliminó y se reemplazó con 100 μ l de medio de inducción. El medio de inducción fue zcytor17lig humano diluido en medio libre de suero a 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml y 1,56 ng/ml. Se usó un control positivo de FBS al 20% para validar el ensayo y asegurar que la infección por adenovirus fuese exitosa. Las células se indujeron durante 5 horas, tras las cuales se aspiró el medio. Las células se lavaron luego en 50 μ l/pocillo de PBS, y posteriormente se lisaron en 30 μ l/pocillo de 1X tampón de lisis celular (Promega). Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, 25 μ l/pocillo del lisado se transfirieron a placas de 96 pocillos de color blanco opaco. Las placas se leyeron luego en el luminómetro, usando una integración de 5 segundos con 40 μ l/pocillo inyección de sustrato de luciferasa (Promega).

30 Los resultados revelaron la capacidad de múltiples líneas celulares epiteliales de responder a zcytor17lig, como se muestra en la Tabla 16 a continuación.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

Tabla 16

Línea celular	Especie	Tejido	Morfología	Enfermedad	Inducción doble
A549	Humana	Pulmón	Epitelial	Carcinoma	2x
Sk-Lu-1	Humana	Pulmón	Epitelial	Adenocarcinoma	6x
WI-38	Humana	Pulmón embrionario	Fibroblasto		Negativa
MRC-5	Humana	Pulmón	Fibroblasto		Negativa
DV145	Humana	Próstata	Epitelial	Carcinoma	10x
PZ-HPV-7	Humana	Próstata	Epitelial	Transformado con HPV	5x
PC-3	Humana	Próstata	Epitelial	Adenocarcinoma	Negativa
U20S	Humana	Hueso	Epitelial	Osteosarcoma	15,5x
SaOS2	Humana	Hueso	Epitelial	Osteosarcoma	22x
MG-63	Humana	Hueso	Fibroblasto	Osteosarcoma	Negativa
143B	Humana	Hueso	Fibroblasto	Osteosarcoma	3,5x
HOS	Humana	Hueso	Fibroblasto y Epitelial	Osteosarcoma	8x
TRBMeC	Humana	Médula ósea vascular	Epitelial		2x
HT144	Humana	Piel	Fibroblasto	Melanoma	5x
C32	Humana	Piel		Melanoma	Negativa
Sk-Mel-2	Humana	Piel		Melanoma	2,7x
WM-115	Humana	Piel		Melanoma	2x

ES 2 310 660 T3

Línea celular	Especie	Tejido	Morfología	Enfermedad	Inducción doble
HCT-116	Humana	Colon	Epitelial		Negativa
HT-29	Humana	Colon	Epitelial	Carcinoma	Negativa
CaCo2	Humana	Colon	Epitelial	Carcinoma	3x
HBL-100	Humana	Mama	Epitelial	Adenocarcinoma	1,5x
ME-180	Humana	Útero	Epitelial		Negativa
HeLa299	Humana	Útero	Epitelial	Carcinoma	Negativa
SK-N-SH	Humana	Cerebro	Epitelial	Adenocarcinoma	Negativa
U138 MG	Humana	Cerebro	Poligonal	Neuroblastoma	Negativa
HepG2	Humana	Hígado	Epitelial	Glioblastoma	Negativa
Hígado Chang	Humana	Hígado	Epitelial	Carcinoma	Negativa
Sk-Hep-1	Humana	Hígado	Epitelial		4x
Int 407	Humana	Intestino	Epitelial	Adenocarcinoma	Negativa
3a-Sub E	Humana	Placenta			Negativa

ES 2 310 660 T3

Ejemplo 43

Producción de citocinas por líneas celulares epiteliales humanas cultivadas con zcytor17lig humano

5 Se criaron líneas celulares epiteliales de enfermedades humanas (A549, carcinoma epitelial pulmonar humano; SkLu1, adenocarcinoma epitelial pulmonar humano; DU145, carcinoma epitelial de próstata humano; PZ-HPV-7, epitelio de próstata humano transformado por HPV; U2OS, osteosarcoma epitelial óseo humano) para producción de citocinas en respuesta a zcytor17lig *in vitro*. Estas líneas celulares tienen tanto zcytor17 como OSMR-beta, identificados por RT-PCR, y responden al zcytor17lig humano cuando se ensayan con el constructo indicador de luciferasa de adenovirus, KZ136 (Ejemplo 42). La producción de citocinas de estas líneas celulares se determinó en respuesta a zcytor17lig humano en una serie de tres experimentos.

A. Producción de citocinas por líneas celulares epiteliales de enfermedades humanas cultivadas con zcytor17lig humano

15 Se dispusieron células a una densidad de $4,5 \times 10^5$ células por pocillo en una placa de 6 pocillos (Costar) y se cultivaron en medio de crecimiento respectivo. Las células se cultivaron con reactivos de ensayo; 100 ng/mL zcytor17lig, 10 ng/mL Interferón gamma (IFN gamma) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/mL Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF alfa) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/mL IL-1beta (R&D Systems, Minneapolis, MN) o 20 100 ug/mL Lipopolisacárido (LPS) (Sigma). Se cosecharon los sobrenadantes a 24 y 48 horas y se ensayaron para citocinas; GM-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Macrófagos), IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1 (Proteína 1 Quimioatrayante de Macrófagos) y TNFa. Se usaron los kits Multiplex Antibody Bead de BioSource International (Camarillo, CA) para medir las citocinas en las muestras. Los ensayos se leyeron en un instrumento Luminex-100 (Luminex, Austin, TX) y los datos se analizaron usando el software MasterPlex (MiraiBio, Alameda, CA). La producción 25 de citocinas (pg/mL) para cada línea celular en las muestras de 24 horas se muestra en la Tabla 17 a continuación.

TABLA 17

		A549	SkLu1	DU145	U2OS	PZ-HPV-7
30	GM-CSF					
	pg/mL					
35	zcytor17L	18,80	10,26	16,19	13,26	14,10
	IFN-g	16,19	13,36	11,56	16,26	11,81
40	IL-1b	104,60	126,44	76,77	338,25	27,32
	TNFa	106,67	33,20	58,50	107,09	33,79
45	LPS	17,64	10,62	11,81	25,47	18,34
	control	14,81	8,56	13,26	21,67	13,96
50	IL-1b pg/mL					
		A549	SkLu1	DU145	U2OS	PZ-HPV-7
55	zcytor17L	26,90	30,17	28,77	29,07	28,00
	IFN-g	29,07	35,33	21,96	26,90	26,73
60	IL-1b	1332,88	1256,17	979,02	1107,35	998,60
	TNFa	31,11	33,28	35,33	31,24	25,66
	LPS	33,28	28,77	29,07	31,11	31,24
65	control	28,77	28,77	26,73	31,24	29,07

ES 2 310 660 T3

IL-6 pg/mL

		A549	SkLul	DUI45	U2OS	PZ-HPV-7
5	zcyor17L	20,09	26,89	193,05	19,37	17,30
	IFN-g	17,52	33,64	217,58	27,02	17,63
10	IL-1b	175,44	5920,19	2375,29	304,08	18,44
	TNF α	354,16	1002,51	1612,17	103,58	18,33
	LPS	18,06	35,65	162,18	22,42	17,30
15	control	17,63	27,80	71,23	19,32	17,19

IL-8 pg/mL

		A549	SkLul	DUI45	U2OS	PZ-HPV-7
20	zcyor17L	86,33	150,81	150,61	45,92	6,81
	IFN-g	24,07	72,82	163,31	81,78	1,35
25	IL-1b	1726,24	4083,12	4407,79	5308,83	124,17
	TNF α	3068,68	3811,75	2539,39	3324,02	69,65
30	LPS	20,28	167,13	230,39	115,08	7,95
	control	14,92	109,78	107,27	93,44	9,49

MCP-1 pg/mL

		A549	SkLul	DUI45	U2OS	PZ-HPV-7
40	zcyor17L	8,97	187,29	26,84	105,15	7,20
	IFN-g	7,30	267,99	27,05	88,68	7,71
	IL-1b	8,11	8039,84	88,78	3723,81	4,70
45	TNF α	8,50	7100,37	153,26	3826,80	2,80
	LPS	9,40	185,83	22,65	61,62	5,61
50	control	8,16	167,93	13,68	47,78	5,61

TNF α pg/mL

		A549	SkLul	DUI45	U2OS	PZ-HPV-7
55	zcyor17L	16,23	17,52	16,67	15,80	17,09
	IFN-g	15,80	17,09	15,80	16,65	15,80
60	IL-1b	16,66	17,09	15,80	17,95	16,23
	TNF α	1639,92	1648,83	2975,07	1348,33	3554,82
	LPS	16,87	15,80	15,37	17,09	17,52
65	control	16,23	15,80	15,80	17,09	16,66

ES 2 310 660 T3

Todas las líneas celulares ensayadas produjeron GM-CSF e IL-8 en respuesta a la estimulación con las citocinas control IL-1b y TNFa. La mayoría de las líneas celulares produjo IL-6 y MCP-1 en respuesta a la estimulación con IL-1b y TNFa. Zcytor17lig estimuló la producción de IL-6 en la línea celular DU145, en comparación con el control (193 pg/mL versus 71 pg/mL). Zcytor17lig estimuló 3 de 5 líneas celulares para producir IL-8 con el mayor efecto 5 observado en las células A549 (quíntuple), y menor producción de IL-5 en células U2OS por 2 veces. Hubo un leve efecto sobre la producción de MCP-1 por parte de las células DU145 y U2OS cuando se cultivaron con zcytor17lig.

B. Producción de citocinas por líneas celulares epiteliales normales cultivadas con zcytor17lig humano

10 Además de líneas celulares epiteliales humanas, se ensayaron células epiteliales humanas normales (NHBE, Clonetech). Las células se dispusieron a una densidad de 1×10^5 células por pocillo en una placa de 24 pocillos, y se cultivaron con reactivos de ensayo; 1000 ng/mL, 100 ng/mL y 10 ng/mL zcytor17lig (A760F), 10 ng/mL TNFa, 10 ng/mL OSM, 10 ng/mL IFNa, 10 ng/mL TGFb o 10 ng/mL Linfotactina. Se cosecharon los sobrenadantes a 24 y 48 15 horas, y se ensayaron para citocinas; IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1a, RANTES y Eotaxina. Las citocinas se ensayaron como se describió previamente. La producción de citocinas (pg/mL) para cada línea celular en las muestras de 48 horas se muestra a continuación en la Tabla 18.

TABLA 18

20

IL-6 pg/ml

		A549	DU145	SkLul	U2OS	NHBE
25	r17L 1000ng/ml	24,5	56,3	32,1	25,2	64,5
	r17IL 100ng/ml	25,0	65,0	31,0	25,4	50,2
30	r17L 10ng/ml	24,8	51,8	30,2	25,3	54,3
	TNFa	272,9	355,4	437,5	36,1	299,3
	OSM	26,4	73,5	112,4	25,6	80,4
35	IFNa	24,6	109,3	33,7	26,4	52,4
	TGFb	24,4	102,6	42,7	27,8	268,9
40	control	24,5	36,3	29,9	25,2	47,9

IL-8 pg/ml

		A549	DU145	SkLul	U2OS	NHBE
45	r17L 1000ng/ml	35,0	243,3	45,6	18,6	402,0
	r17IL 100ng/ml	31,0	290,7	40,1	21,3	296,0
50	r17L 10ng/ml	30,4	240,4	33,4	18,9	361,8
	TNFa	2809,3	2520,9	1385,2	784,9	1486,3
	OSM	37,8	60,6	68,0	22,5	494,6
55	IFNa	18,9	315,3	39,5	33,1	231,6
	TGFb	9,9	77,5	19,6	88,9	246,9
60	control	10,9	238,0	38,0	39,7	315,8

65

ES 2 310 660 T3

MCP-1 pg/ml

		A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
5	r17L 1000ng/ml	nd	nd	149,1	81,0	nd
	r17IL 100ng/ml	nd	nd	130,6	81,9	nd
	r17L 10ng/ml	nd	nd	111,7	49,1	nd
10	TNF α	nd	22,1	2862,6	1104,7	nd
	OSM	nd	17,2	448,2	85,8	nd
15	IFN α	nd	nd	131,7	10,5	nd
	TGF β	nd	1,7	54,5	27,6	nd
	control	nd	nd	113,0	1,7	nd

nd = no detectado

Las células DU145 produjeron IL-6 en respuesta a zcytor17lig, repitiendo los resultados previos del Ejemplo 43A. No obstante, solamente A549 y U2OS tuvieron respuestas de IL-8 similares a las observadas en el Ejemplo 43A. Las células SkLu1 y U2OS produjeron ambas MCP-1 en respuesta a zcytor17lig. La producción de citocinas por células NHBE fue marginal comparada con los controles.

C. Producción de citocinas por líneas celulares epiteliales de enfermedades humanas co-cultivadas con zcytor17lig humano y IFN gamma

Las células se dispusieron a una densidad de 2×10^5 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se co-cultivaron con 10 ng/mL IFN gamma +/- zcytor17lig a 100 ng/mL, 10 ng/mL o 1 ng/mL. Los sobrenadantes se recogieron a 24 y 48 horas y se ensayaron para IL-8 y MCP-1, como se describió anteriormente. La producción de citocinas (pg/mL) para cada línea celular en las muestras de 24 horas se muestra en la Tabla 19 a continuación.

35

TABLA 19

GL-8 pg/ml MCP-1 pg/ml

40	A549	10ng/mL IFNg+100ng/mL			
		r17L	86,7	nd	
		10ng/mL IFNg+10ng/mL r17L	75,1	nd	
		10ng/mL IFNg+1 ng/mL r17L	63,6	nd	
		10ng/ml IFNg	35,4	nd	
45	DU145	control	36,6	nd	
		10ng/mL IFNg+100ng/mL			
		r17L	102,3	nd	
		10ng/mL IFNg+10ng/mL r17L	92,9	nd	
		10ng/mL IFNg+1 ng/mL r17L	79,9	nd	
50	SkLu1	10ng/ml IFNg	70,7	nd	
		control	79,4	nd	
		10ng/mL IFNg+100ng/mL			
		r17L	152,2	604,9	
		10ng/mL IFNg+10ng/mL r17L	194,4	870,7	
55	U2OS	10ng/mL IFNg+1 ng/mL r17L	138,7	585,4	
		10ng/ml IFNg	170,8	652,6	
		control	203,0	292,3	
		10ng/mL IFNg+100ng/mL			
		r17L	106,8	357,0	
60	U2OS	10ng/mL IFNg+10ng/mL r17L	108,2	347,7	
		10ng/mL IFNg+1 ng/mL r17L	109,9	293,3	
		10ng/ml IFNg	118,8	159,8	
		control	146,8	7,0	

ES 2 310 660 T3

Las células A549 produjeron IL-8 en respuesta a zcytor17lig, no obstante, no hubo efecto de las células co-cultivadas con la adición de IFN gamma. Las células U2OS produjeron 20 veces más MCP-1 cuando se cultivaron con IFNg y 50 veces más MCP-1 cuando se cultivaron con IFK gamma + zcytor17lig.

5

Ejemplo 44

Efectos de Zcytor17lig sobre la incorporación de 3 H-TdR a células DU145 de carcinoma epitelial de próstata

10 Se sembraron células en grupos de tejido de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de 25.000/pocillo en medio de desarrollo MEM (Life Technologies) enriquecido con glutamina, piruvato, aminoácidos no esenciales (Life Technologies) y suero bovino fetal al 10% (Hyclone). A confluencia (24 horas después), las células se transfirieron a un medio de detención del desarrollo, sustituyendo suero por BSA al 0,1% (Life Technologies). Después de 48 horas para lograr la sincronización celular, el medio se reemplazó con medio nuevo. Luego, se añadió zcytor17lig recombinante humano (reactivo de ensayo) a distintas concentraciones (entre 0,24 y 60 ng/mL) (véase Tabla 16 a continuación), para ensayar el efecto de la proteína sobre la replicación de DNA basal. Algunos pocillos recibieron FBS al 2,5% (Hyclone) además de zcytor17lig, con el fin de ensayar el efecto de la proteína en niveles elevados de incorporación de TdR. Se usaron FBS al 10% y 20 ng/ml Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas-BB (PDGF-BB) (R&D) como control positivo.

20

Dieciocho horas después de la adición de zcytor17lig y el resto de los reactivos de ensayo, las células se pulsaron con 250 nCi/mL [3 H]-timidina (NEN) durante 4 horas. Después del pulso de 4 horas, se desechó el medio y se añadieron 100 μ L de solución de tripsina (Life Technologies) a cada pocillo para desalojar las células. La radiactividad incorporada por DU145 se determinó cosechando las células con un cosechador de células Packard Filtermate 196 y 25 contando la etiqueta incorporada, usando un contador de centelleos para microplacas Packard TopCount NXT.

30 Como se puede observar en la Tabla 20 a continuación, zcytor17lig indujo la incorporación de timidina en células quiescentes (en BSA al 0,1%) en un modo dependiente de la concentración. Este efecto alcanzó 2,5 veces el control BSA a la concentración más alta utilizada, 60 ng/mL. Además, este efecto de zcytor17lig también fue detectable cuando la incorporación inicial se elevó por adición de FBS al 2,5% (en esta serie como mitógeno tan potente como FBS al 10%). Estos resultados, por ende, indican que bajo condiciones basales y estimuladas, el zcytor17lig puede actuar como factor mitogénico para las células de carcinoma DU145.

35 La Tabla 16 muestra los efectos de zcytor17lig en la incorporación de timidina por células DU145. Los resultados se expresan en cpm/pocillo, y los números son la desviación estándar de la media de pocillos triplicados.

TABLA 20

40

	<u>0,1% BSA</u>	<u>2,5% FBS</u>
BSA Control	1139 \pm 336	4228 \pm 600
Zcytor17lig (0,24ng/mL)	1430 \pm 136	4894 \pm 1037
Zcytor17lig (0,74ng/mL)	1657 \pm 32	5038 \pm 810
Zcytor17lig (2,22ng/mL)	1646 \pm 57	5162 \pm 808
Zcytor17lig (6,67ng/mL)	2226 \pm 189	6385 \pm 1613
Zcytor17lig (20ng/mL)	2168 \pm 108	5880 \pm 1085
Zcytor17lig (60ng/mL)	2512 \pm 111	6165 \pm 417
PDGF-BB (20ng/mL)	4094 \pm 202	1927 \pm 360

65

ES 2 310 660 T3

Ejemplo 45

*Expresión de huzcytor17lig en *E. coli**

5 A. Construcción del vector de expresión pRFS01 que expresa el polipéptido de fusión huzcytor17Lig/MBP-6H

Se construyó un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codifica un huzcytor17lig condensado C-terminalmente a la Proteína de Unión a Maltosa (MBP), vía recombinación homóloga. El polipéptido de fusión contiene una porción MBP de aproximadamente 388 aminoácidos N-terminal condensada al huzcytor17Lig descrito en la presente memoria. Se aisló un fragmento de cDNA de huzcytor17lig usando el método PCR como se describe en esta memoria. Se usaron dos cebadores en la producción del fragmento zcytor17lig en una reacción PCR convencional: (1) uno contenía 40 bp de la secuencia flanqueadora del vector y 20 bp correspondientes al término amino del huzcytor17lig, y (2) el otro contenía 40 bp del extremo 3' correspondientes a la secuencia flanqueadora del vector y 20 bp correspondientes al término carboxilo del huzcytor17lig. Se pasaron 2 microlitros de la reacción PCR de 100 μ L por un gel de agarosa al 1,0% con 1 x tampón TBE para análisis, y se observó el fragmento de peso molecular esperado. La reacción PCR restante se combinó con el segundo tubo de PCR y precipitó con 400 μ L de etanol absoluto. El DNA precipitado se usó para recombinación en el vector receptor cortado SmaI pTAP98 para producir el constructo que codifica la fusión MBP-huzcytor17lig, como se describe a continuación.

20 El vector pTAP98 se construyó usando recombinación homóloga de levadura. Se recombinaron 100 nanogramos de pMAL-c2 cortado con EcoR1, con 1 μ g pRS316 cortado con Pvu1, 1 μ g enlazador, y se combinó 1 μ g pRS316 cortado con Scal/EcoR1 en una reacción PCR. Los productos PCR se concentraron vía precipitación de etanol al 100%. La cepa de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*), SF838-9Da, se combinó con 10 μ L de una mezcla que contenía aproximadamente 1 μ g del producto PCR de huzcytor17lig (anterior) y 100 ng de vector pTAP98 digerido con SmaI, y se electroporó a 0,75 kV, 25 μ F y 10 ohms. La mezcla de reacción resultante se dispuso en placas URA-D y se incubó a 30°C.

Después de 48 horas, se seleccionaron los transformantes de levadura Ura+ de una de las placas. Se aisló DNA y se transformó en células de *E. coli* electrocompetentes (p. ej., MC1061, Casadaban *et. al.* *J. Mol Biol.* 138, 179-207). Las células de *E. coli* resultantes se dispusieron en placas MM/CA +AMP, 100 mg/L placas (Pryor y Leiting, *Protein Expression and Purification* 10:309-319, 1997) usando procedimientos convencionales. Se cosecharon cuatro clones individuales de las placas y se inocularon en MM/CA con 100 μ g/ml Ampicilina durante dos horas a 37°C. Se indujo un mililitro de cada cultivo con TPTG 1 mM. Aproximadamente 2-4 horas después, se mezclaron 250 μ L de cada cultivo inducido con 250 μ L esferas de vidrio lavadas con ácido y 250 μ L tampón Thorner con 5% β ME y tinte (8M urea, Tris 100 mM pH7,0, glicerol al 10%, EDTA 2 mM, SDS al 5%). Las muestras se agitaron en vórtex durante un minuto y se calentaron hasta 65°C durante 10 minutos. Se cargaron 20 microlitros de cada muestra por senda en un gel PAGE 4%-12% PAGE (NOVEX). Los geles se pasaron por tampón IXMES. Los clones positivos se designaron pRPS01 y se sometieron a análisis de secuencias.

40 Se usó un microlitro de DNA de secuenciación para transformar la cepa de células de *E. coli* electrocompetentes MC1061. Las células se electropulsaron a 2,0 kV, 25 uF y 400 ohms. Después de la electroporación, las células se rescataron en 0,6 ml SOC y se desarrollaron en placas LB+Amp a 37°C durante una noche, con 100 mg/L Ampicilina. Se indujeron cuatro cultivos con IPTG y se criaron para positivos como se describió anteriormente. Los clones positivos se expandieron para purificación de proteína de la proteína de fusión huzcytor17lig/MBP-6H, usando técnicas convencionales.

B. Purificación de huzcytor17Lig/MBF-6H por fermentación de *E. coli*

50 A menos que se indique otra cosa, todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C. El siguiente procedimiento se usó para purificar el polipéptido huzcytor17Lig/MBP-6H recombinante. Se construyeron células de *E. coli* que contenían el constructo pRPS01 y que expresaban huzcytor17Lig/MBP-6H, usando métodos de biología molecular convencionales, y se cultivaron en 50,0 g/L SuperBroth II (12 g/L Casien, 24 g/L extracto de levadura, 11,4 g/L fosfato de di-potasio, 1,7 g/L fosfato de mono-potasio; Becton Dickenson, Cockeysville, MD), 5 g/L glicerol y 5 mL/L sulfato de magnesio 1M. Se cosecharon 20 gramos de células y se congelaron para purificación de proteínas.

55 Las células descongeladas se resuspendieron en 500 mL tampón de equilibrio Amylose (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0). Se usó un sistema de ruptura de células de prensa francesa (Constant Systems Ltd., Warwick, Reino Unido) con una temperatura regulada a -7°C hasta -10°C y 30K PSI para lisar las células. Las células resuspendidas se ensayaron para ruptura por lecturas A_{600} antes y después de los ciclos en la prensa francesa. La suspensión celular procesada se sedimentó a 10.000G durante 30 minutos para eliminar los residuos celulares, y el sobrenadante se cosechó para purificación de proteínas.

60 Se vertieron 25 ml de columna de resina Amylose (New England Biolabs, Beverly, MA) (preparada como se describe a continuación) a una columna de vidrio Bio-Rad, 2,5 cm D x 10 cm H. La columna se llenó y equilibró por gravedad con 10 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrio Amylose. El sobrenadante celular procesado se cargó en lotes a la resina Amylose durante una noche con oscilación. La resina se retornó a la columna Bio-Rad y se lavó con 10 CV de tampón de equilibrio Amylose por gravedad. La columna se eluyó con -2 CV de tampón de elución Amylose (tampón de equilibrio Amylose + maltosa 10 mM, Fluka Biochemical, Suiza) por gravedad. Se

ES 2 310 660 T3

recogieron diez fracciones de 5 mL durante el perfil de elución y se ensayaron para Absorbancia a 280 y 320 nM. La resina Amylose se regeneró con 1 CV de H₂O destilada, 5 CV de SDS al 0,1% (p/v), 5 CV de H₂O destilada, 5 CV de tampón de equilibrio Amylose y finalmente 1 CV de tampón de almacenamiento Amylose (tampón de equilibrio Amylose + azida de sodio al 0,02%). La columna regenerada se conservó a 4°C.

5 Las fracciones del perfil de elución de interés se combinaron y dializaron en una cámara de diálisis de 10K (Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemicals) contra 4 x 4L PBS pH 7,4 (Sigma) durante un periodo de tiempo de 8 horas para eliminar los contaminantes de bajo peso molecular, intercambio de tampones y desalación. Después de la diálisis, el material cosechado representó el polipéptido hzcytor17Lig/MBP-6H purificado. El polipéptido hzcytor17Lig/MBP-6H purificado se esterilizó en filtro y se analizó por tinción Coomassie de SDS-PAGE para un producto de peso molecular adecuado. La concentración del polipéptido hzcytor17Lig/MBP-6H se determinó por análisis BCA en 1,28 mg/mL.

15 Ejemplo 46

Anticuerpo policlonal de zcytor17lig humano

A. Preparación y purificación

20 Los anticuerpos policlonales se prepararon inmunizando 2 conejos blancos hembra de Nueva Zelanda con la proteína recombinante purificada hzcytor17L/MBP-6H (Ejemplo 45). Los conejos recibieron cada uno una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 200 µg de proteína purificada en Adyuvante de Freund Completo seguida por inyecciones IP de refuerzo de 100 µg de proteína en Adyuvante de Freund Incompleto cada tres semanas. Siete a diez días 25 después de la administración de la segunda inyección de refuerzo (3 inyecciones totales), se extrajo sangre de los animales y se recogió el suero. Los animales luego recibieron refuerzos y se les extrajo sangre cada tres semanas.

30 El suero de conejo específico de hzcytor17L/MBP-6H se pre-adsorbió de anticuerpos anti-MBP usando una columna de proteína CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), que se preparó utilizando 10 mg de proteína de fusión MBP recombinante purificada no específica por gramo de CNBr-SEPHAROSE. Los anticuerpos policlonales específicos de hzcytor17L/MBP-6H-se purificaron por afinidad a partir de suero de conejo pre-adsorbido usando una columna de proteína CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), que se preparó utilizando 10 mg de la proteína recombinante purificada de antígenos específica hzcytor17L/MBP-6H. Tras la purificación, los anticuerpos policlonales se dializaron con 4 cambios de 20 veces el volumen de PBS del anticuerpo durante un periodo de por lo menos 8 horas. Los anticuerpos específicos de Hzcytor17-Ligando se caracterizaron por ELISA, usando 500 ng/ml de las 35 proteínas recombinantes purificadas hzcytor17L/MBP-6H o hzcytor17L-CEE producidas en un sistema de expresión de baculovirus como dianas de anticuerpo. El límite inferior de detección (LLD) del anticuerpo de afinidad anti-hzcytor17L/MBP-6H de conejo fue 100 pg/ml en su antígeno recombinante purificado hzcytor17L/MBP-6H y 500 pg/ml en hzcytor17L-CEE recombinante purificado producido en un sistema de expresión de baculovirus.

B. Análisis SDS-PAGE y transferencia Western del anticuerpo ZcytoR17lig MBF-6H antihumano de conejo

40 Se ensayó anticuerpo ZcytoR17lig MBF-6H antihumano de conejo por análisis SDS-PAGE (NuPage 4-12%, Invitrogen, Carlsbad, CA) con el método de tinción coomassie y transferencia Western, usando IgG-HRP anticonejo de cabra. Se sometió la proteína purificada zcytor17lig humana y de ratón (200-25 ng) a electroforesis, usando una minicelda Invitrogen Novex's Xcell II, y se transfirió a nitrocelulosa (0,2 mm; Invitrogen, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente, usando un módulo de transferencia Novex's Xcell agitando de acuerdo con las instrucciones provistas en el manual del instrumento. La transferencia se realizó a 300 mA durante una hora en un tampón que contenía base Tris 25 mM, glicina 200 mM y metanol al 20%. El filtro se bloqueó luego con tampón Western A (preparado internamente, 50 Tris 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, pH 8,0, Igpal CA-630 al 0,05%, NaCl 150 mM y gelatina al 0,25%) durante una noche con oscilación moderada a 4°C. La nitrocelulosa se enjuagó rápidamente, luego el zcytoR17lig MBF-6H antihumano de conejo (1:1000) se añadió al tampón Western A. La transferencia se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente con oscilación moderada. La transferencia se enjuagó 3 veces durante 5 minutos cada vez en Western A, luego se añadió anticuerpo IgG HRP anticonejo de cabra (1:5000) en un tampón Western A. La transferencia se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con oscilación moderada. La transferencia se enjuagó 3 veces durante 5 minutos cada vez en Western A, luego se enjuagó rápidamente en H₂O. La transferencia se reveló usando reactivos de sustrato quimiluminiscentes disponibles en el mercado (reactivos de transferencia Western ECL 1 y 2 mezclados con reactivos 1:1; obtenidos de Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) y la transferencia se expuso a película de rayos x durante un máximo de 5 minutos.

60 El zcytor17lig humano purificado pareció ser una banda tan grande como de aproximadamente 30 kDa y una banda más pequeña de aproximadamente 20 kDa bajo condiciones reducidas. El zcytor17lig de ratón no fue detectado por el anticuerpo zcytor17lig antihumano de conejo.

ES 2 310 660 T3

Ejemplo 47

Efectos de Zcytor17lig sobre la adhesión de monocitos U937 a una monocapa de células endoteliales de médula ósea transformadas (TRBMEC)

5 Se sembraron células endoteliales de médula ósea transformadas (TRBMEC) en grupos de tejido de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de 25.000/pocillo en medio M131 (Cascade Biologics) enriquecido con Complemento de Desarrollo Microvascular (MVGS) (Cascade Biologics). A confluencia (24 horas después), las células se transfirieron a M199 (Gibco-Life Technologies) enriquecido con suero bovino fetal al 1% (Hyclone). Se añadió zcytor17lig recombinante humano (reactivo de ensayo) a diversas concentraciones (entre 0,4 y 10 ng/mL) (véase Tabla 21 a continuación), para ensayar el efecto de la proteína sobre las interacciones de células endoteliales-células inmunitarias que resultaban en adhesión. Algunos pocillos recibieron 0,3 ng/ml Factor de Necrosis Tumoral (TNFalfa R&D Systems), una conocida citocina antiinflamatoria, además de zcytor17lig, para ensayar un efecto de la proteína sobre las células endoteliales bajo condiciones inflamatorias. Se usó TNFalfa a 0,3 ng/ml solo como control positivo y la concentración usada representa aproximadamente 70% del efecto de TNFalfa máximo en este sistema, es decir, no induce adherencia máxima de células U937 (una línea celular de tipo monocito humano) al endotelio. Por esta razón, esta estructura puede detectar tanto el aumento como la disminución de los efectos del TNFalfa. Los niveles basales de adhesión, tanto con como sin TNFalfa, se usaron como línea basal para evaluar el efecto de los reactivos de ensayo.

10 20 Después de incubar durante una noche las células endoteliales con los reactivos de ensayo (ligando zcytor17 ± TNFalfa), las células U937, teñidas con 5 μ M marcador fluorescente Calcein-AM (Molecular Probes), se suspendieron en RPMI 1640 (sin rojo fenol) enriquecido con FBS al 1% y se dispusieron en placas a 100.000 células/pocillo en una monocapa TRBMEC enjuagada. Los niveles de fluorescencia en longitudes de onda de excitación/emisión de 485/538 nm (lectora de microplacas Molecular Devices, aplicación CytoFluor) se midieron 30 minutos más tarde, antes y 25 después de enjuagar el pocillo tres veces con RPMI 1640 tibio (sin rojo fenol), para eliminar U937 no adherentes. Se usaron niveles de fluorescencia pre-enjuague (total) y pos-enjuague (específicos de adherencia) para determinar el porcentaje de adherencia (adherencia neta/total neto x 100 = % adherencia).

30 35 40 45 Como se puede observar en la Tabla 21 a continuación, zcytor17lig, cuando se añadió solo, afectó la adherencia basal de las células U937 a las monocapas endoteliales en el intervalo de concentración utilizado (un incremento de menos de 2 veces, $p < 0,01$ por prueba ANOVA). Por sí mismo, el control positivo, 0,3 ng/mL TNFalfa, aumentó la adherencia de células U937 desde 5,8% basal a 35% (6 veces). En presencia de TNFalfa, el zcytor17lig se sinergizó con el TNFalfa y potenció más la adhesión de las células U937 en un modo dependiente de la concentración entre 0,4 y 10 ng/mL ($p < 0,01$ por prueba ANOVA). A 10 ng/mL, el zcytor17lig potenció el efecto del TNFalfa por 62%. Estos resultados indican que el zcytor17lig puede ser, por sí mismo, un agente proinflamatorio. El Zcytor17lig fue capaz de sinergizarse con concentraciones sub-máximas de TNFalfa para aumentar la adherencia de monocitos a las células endoteliales. Estos resultados también muestran que las células endoteliales, especialmente cuando se exponen a citocinas proinflamatorias como el TNFalfa, son un probable tejido diana de acción de zcytor17lig. La consecuencia del ligando zcytor17 en las células endoteliales puede ser la elevación de la adhesión de monocitos o macrófagos a un sitio de actividad proinflamatoria. Los monocitos y macrófagos activados son importantes en muchas enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, la inhibición de adhesiones de monocitos/macrófagos puede proporcionar un fundamento terapéutico para antagonistas del ligando zcytor17. Estos datos respaldarían el uso de antagonistas del ligando zcytor17 para el tratamiento de enfermedades pulmonares, enfermedades vasculares, autoinmunidad, metástasis tumorales, enfermedades que implican reacciones alérgicas, cicatrización de heridas y enfermedades de la piel que incluyen contacto, dermatitis alérgica o no alérgica y psoriasis, y enfermedad inflamatoria de los intestinos. La Tabla 21 muestra los efectos de zcytor17lig sobre la adhesión de monocitos U937 a monocapas endoteliales TRBMEC. Los resultados se expresan en porcentaje de adhesión y los números son la desviación estándar de la media de pocillos triplicados.

50

TABLA 21

	Basal	0,3ng/mL TNFalfa
55	Basal	5,8±1,2
	Zcytor17lig 0,4ng/mL	9±0,7
	Zcytor17lig 1,1ng/mL	10,4±0,8
60	Zcytor17lig 3,3ng/mL	7,9±1,7
	Zcytor17lig 10ng/mL	9,5±0,5

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de residuos aminoácido que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de residuos aminoácido seleccionada del grupo de:

- 10 (a) el polipéptido que se muestra desde los residuos 38 (Val) hasta 152 (Leu), como se muestra en la SEC ID NO: 2;
- (b) el polipéptido que se muestra desde los residuos 27 (Leu) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2;
- 15 (c) el polipéptido que se muestra desde los residuos 24 (Ser) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2; y
- (d) el polipéptido que se muestra desde los residuos 1 (Met) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2.

20 2. Un polipéptido aislado según la reivindicación 1, en el que los residuos aminoácido 72, 133 y 147 son cisteína.

3. Un polipéptido aislado según la reivindicación 1, en el que el polipéptido se une al receptor zcytor17, como se muestra en la SEC ID NO: 5 o en la SEC ID NO: 71.

25 4. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo de:

- 30 (a) residuos aminoácido 38-52 de la SEC ID NO: 2;
- (b) residuos aminoácido 83-98 de la SEC ID NO: 2;
- (c) residuos aminoácido 104-117 de la SEC ID NO: 2;
- (d) residuos aminoácido 137-152 de la SEC ID NO: 2;
- 35 (e) residuos aminoácido 38-52 de la SEC ID NO: 11;
- (f) residuos aminoácido 33-38 de la SEC ID NO: 2;
- (g) residuos aminoácido 35-40 de la SEC ID NO: 2;
- 40 (h) residuos aminoácido 53-58 de la SEC ID NO: 2;
- (i) residuos aminoácido 54-59 de la SEC ID NO: 2;
- (j) residuos aminoácido 129-134 de la SEC ID NO: 2;
- 45 (k) residuos aminoácido 34-39 de la SEC ID NO: 11;
- (l) residuos aminoácido 46-51 de la SEC ID NO: 11;
- 50 (m) residuos aminoácido 101-105 de la SEC ID NO: 2;
- (n) residuos aminoácido 113-118 de la SEC ID NO: 2;
- (o) residuos aminoácido 114-119 de la SEC ID NO: 2;
- 55 (p) residuos aminoácido 126-131 de la SEC ID NO: 2;
- (q) residuos aminoácido 158-162 de la SEC ID NO: 2;

60 o que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de los aminoácidos 85-98, 104-118, 131-136, 141-157, 157-162 ó 158-163 de la SEC ID NO: 11.

65 5. Una proteína de fusión que comprende por lo menos cuatro polipéptidos, en la que el orden de los polipéptidos desde el término N hasta el término C es:

un primer polipéptido que comprende los residuos aminoácido 38-52 de la SEC ID NO: 2;

ES 2 310 660 T3

un primer espaciador de 6-27 residuos aminoácido;

un segundo polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionados del grupo de:

- 5 (a) residuos aminoácido de hélice B de IL-2 de la SEC ID NO: 168;
- (b) residuos 65-83 de hélice B de IL-4 de la SEC ID NO: 164;
- (c) residuos 73-86 de hélice B de IL-3 de la SEC ID NO: 102;
- 10 (d) residuos 72-81 de hélice B de GM-CSF de la ID NO: 166; y
- (e) residuos aminoácido 83-98 de la SEC ID NO: 2;

15 un segundo espaciador de 5-11 residuos aminoácido;

un tercer polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionada del grupo de:

- 20 (a) residuos 102-116 de hélice C de IL-2 de la ID NO: 162;
- (b) residuos 94-118 de hélice C de IL-4 de la SEC ID NO: 164;
- (c) residuos 91-103 de hélice C de IL-3 de la SEC ID NO: 102;
- 25 (d) residuos 85-103 de hélice C de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y
- (e) residuos aminoácido 104-117 de la SEC ID NO: 2;

30 un tercer espaciador de 3-29 residuos aminoácido; y

un cuarto polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionados del grupo de:

- 35 (a) residuos 134-149 de hélice D de IL-2 de la SEC ID NO: 162 ;
- (b) residuos 123-141 de hélice D de IL-3 de la SEC ID NO: 102;
- (c) residuos 133-151 de hélice D de IL-4 de la SEC ID NO: 164;
- 40 (d) residuos 120-131 de hélice D de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y
- (e) residuos aminoácido 137-152 de la SEC ID NO: 2.

45 6. Una proteína de fusión que comprende por lo menos cuatro polipéptidos, en la que el orden de los polipéptidos desde el término N hasta el término C es:

un primer polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionados del grupo que consiste en:

- 50 (a) residuos 27-48 de hélice A de IL-2 de la SEC ID NO: 162;
- (b) residuos 30-42 de hélice A de IL-4 de la SEC ID NO: 164;
- (c) residuos 35-45 de hélice A de IL-3 de SEC ID NO: 102;
- 55 (d) residuos 30-44 de hélice A de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y
- (e) residuos aminoácido 38-52 de la SEC ID NO: 2;

60 un primer espaciador de 6-27 residuos aminoácido;

un segundo polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionados del grupo de:

- 65 (a) residuos de hélice B de IL-2 de la SEC ID NO: 168;
- (b) residuos 65-83 de hélice B de IL-4 de la SEC ID NO: 164;
- (c) residuos 73-86 de hélice B de IL-3 de la SEC ID NO: 102;

ES 2 310 660 T3

- (d) residuos 72-81 de hélice B de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y
- (e) residuos aminoácido 83-98 de la SEC ID NO: 2;

5 un segundo espaciador de 5-11 residuos aminoácido;

un tercer polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionados del grupo de:

- (a) residuos 102-116 de hélice C de IL-2 de la SEC ID NO: 162;
- (b) residuos 94-118 de hélice C de IL-4 de la SEC ID NO: 164;
- (c) residuos 91-103 de hélice C de IL-3 de la SEC ID NO: 102;
- (d) residuos 85-103 de hélice C de GM-CSF de la SEC ID NO: 166; y
- (e) residuos aminoácido 104-117 de la SEC ID NO: 2;

15 un tercer espaciador de 3-29 residuos aminoácido; y

20 un cuarto polipéptido que comprende los residuos aminoácido 137-152 de la SEC ID NO: 2.

25 7. Una proteína de fusión según la reivindicación 6, en la que el cuarto polipéptido comprende los residuos aminoácido 137-152 de la SEC ID NO: 2.

30 8. Una molécula de polinucleótidos aislada que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que consiste en una secuencia de residuos aminoácido que es por lo menos 90% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de:

- (a) el polipéptido que se muestra desde los residuos 38 (Val) hasta 152 (Leu), como se muestra en la SEC ID NO: 2;
- (b) el polipéptido que se muestra desde los residuos 27 (Leu) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2;
- (c) el polipéptido que se muestra desde los residuos 24 (Ser) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2; y
- (d) el polipéptido que se muestra desde los residuos 1 (Met) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2.

45 9. Una molécula de polinucleótidos aislada según la reivindicación 8, en la que los nucleótidos se seleccionan del grupo de:

- (a) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID NO: 1 desde el nucleótido 139 hasta el nucleótido 483;
- (b) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID NO: 1 desde el nucleótido 106 hasta el nucleótido 519;
- (c) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID NO: 1 desde el nucleótido 97 hasta el nucleótido 519; y
- (d) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID NO: 1 desde el nucleótido 28 hasta el nucleótido 519, o

55 en la que dichos nucleótidos codifican un polipéptido según la reivindicación 4.

10. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente unidos:

- (a) un promotor de transcripción;
- (b) un segmento de DNA que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de residuos aminoácido seleccionados del grupo de:
 - (i) residuos aminoácido 38-52 de la SEC ID NO: 2;
 - (ii) residuos aminoácido 83-98 de la SEC ID NO: 2;

ES 2 310 660 T3

- (iii) residuos aminoácido 104-117 de la SEC ID NO: 2;
- (iv) residuos aminoácido 137-152 de la SEC ID NO: 2;

5 o que consiste en un polinucleótido aislado según la reivindicación 8; y

- (c) un terminador de transcripción.

10 11. Una célula cultivada que comprende un vector de expresión según la reivindicación 10.

12. Un método para producir un polipéptido, que comprende cultivar una célula según la reivindicación 11, bajo condiciones en las que se expresa el segmento de DNA; y recuperar el polipéptido codificado por el segmento de DNA.

15 13. Un método para producir un anticuerpo que se une a un polipéptido según la reivindicación 1, en el que el polipéptido inoculado se selecciona del grupo de:

- (a) un polipéptido que consiste en 9 a 141 aminoácidos, en donde el polipéptido es idéntico a una secuencia contigua de residuos aminoácido en la SEC ID NO: 2 desde el aminoácido número 24 (Ser) hasta el aminoácido número 164 (Thr);
- (b) un polipéptido según la reivindicación 1;
- (c) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 desde el aminoácido número 38 hasta el 52;
- (d) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 desde el aminoácido número 83 hasta el 98;
- (e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 desde el aminoácido número 104 hasta el 117;
- (f) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 desde el aminoácido número 137 hasta el 152;
- (g) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 desde el aminoácido número 38 hasta el 152;
- (h) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 desde el aminoácido número 24 hasta el 164;
- (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 desde el aminoácido número 27 hasta el 164;
- (j) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 desde el aminoácido número 38 hasta el 52;
- (k) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 desde el aminoácido número 85 hasta el 98;
- (l) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 desde el aminoácido número 104 hasta el 118;
- (m) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 desde el aminoácido número 141 hasta el 157;
- (n) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 desde el aminoácido número 38 hasta el 157;
- (o) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 desde el aminoácido número 24 hasta el 163;
- (p) un polipéptido que comprende los residuos aminoácido 54-59, 129-134, 53-58, 35-40 ó 33-38 de la SEC ID NO: 2 o los residuos aminoácido 34-39, 46-51, 131-136, 158-163 ó 157-162 de la SEC ID NO 11, en donde se ignoran los residuos enterrados G, S y T y los residuos expuestos H, Y y W; y

65 en donde el polipéptido genera una respuesta inmunitaria para producir el anticuerpo;

y aislar el anticuerpo del animal.

ES 2 310 660 T3

14. Un anticuerpo obtenible por el método de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo se une a un polipéptido de la SEC ID NO: 2 o de la SEC ID NO: 11.
- 5 15. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que se muestra en la SEC ID NO: 2 o en la SEC ID NO: 11, o a un polipéptido que comprende una secuencia de residuos aminoácido seleccionados del grupo de:
- 10 (a) el polipéptido que se muestra desde los residuos 38 (Val) hasta 152 (Leu), como se muestra en la SEC ID NO: 2;
- 15 (b) el polipéptido que se muestra desde los residuos 27 (Leu) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2;
- (c) el polipéptido que se muestra desde los residuos 24 (Ser) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2; y
- (d) el polipéptido que se muestra desde los residuos 1 (Met) hasta 164 (Thr), como se muestra en la SEC ID NO: 2.
- 20 16. Un anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo de: (a) un anticuerpo policlonal, (b) un anticuerpo monoclonal murino, (c) un anticuerpo humanizado derivado de (b), (d) un fragmento de anticuerpo, y (e) un anticuerpo monoclonal humano.
- 25 17. Un anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende además un radionúcleo, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimiluminiscente, marcador peptídico, partícula magnética, fármaco o toxina.
- 30 18. Un anticuerpo según la reivindicación 15 para reducir la inflamación por un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 35 19. Uso de un anticuerpo según la reivindicación 15 para la fabricación de un medicamento para uso en un método para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero que presenta dicha inflamación, comprendiendo el método:
- 40 (1) determinar el nivel de una molécula inflamatoria;
- (2) administrar dicho medicamento;
- (3) determinar un nivel pos-administración de la molécula inflamatoria;
- 45 (4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria de la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria de la etapa (3), en donde la falta de incremento o una disminución del nivel de la molécula inflamatoria es indicativo de la supresión de una respuesta inflamatoria.
- 50 20. Un método para detectar la presencia de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en una muestra biológica, que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, según la reivindicación 15, en donde el contacto se realiza bajo condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la muestra biológica, y
- (b) detectar cualquier anticuerpo unido o fragmento de anticuerpo unido.
- 55 21. Un método para inhibir la proliferación o diferenciación de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas inducida por un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende cultivar células de médula ósea o sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de un anticuerpo según la reivindicación 15, suficiente para reducir la proliferación o diferenciación de las células hematopoyéticas en la médula ósea o sangre periférica, según lo comparado con células de médula ósea o sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor soluble de citocinas.
- 60 22. Un método según la reivindicación 21, en el que las células hematopoyéticas y los progenitores de células hematopoyéticas son células linfoides.
- 65 23. Un método según la reivindicación 22, en el que las células linfoides son macrófagos o células T.

ES 2 310 660 T3

24. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la fabricación de un medicamento de uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 5 (1) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno presente en dicho mamífero;
- (2) administrar dicho medicamento;
- (3) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno en dicho mamífero; y
- 10 (4) comparar el nivel del antígeno o patógeno de la etapa 1 con el nivel del antígeno o patógeno de la etapa 3, en donde un cambio en el nivel es indicativo de la estimulación de una respuesta inmunitaria.

15 25. Uso según la reivindicación 24, en el que dicho método comprende además:

- (5) readministrar dicho medicamento;
- (6) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno en dicho mamífero; y
- 20 (7) comparar el nivel de antígeno o patógeno de la etapa 1 con el nivel de antígeno o patógeno de la etapa 6, en donde un cambio en el nivel es indicativo de la estimulación de una respuesta inmunitaria.

25 26. Un método para expansión de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas que comprende cultivar células de médula ósea o sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de un polipéptido según las reivindicaciones 1-4, suficiente para producir un incremento en el número de células linfoides en las células de médula ósea o sangre periférica, según lo comparado con células de médula ósea o sangre periférica cultivadas en ausencia de dicho polipéptido.

30 27. Un método según la reivindicación 26, en el que las células hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides.

35 28. Un método según la reivindicación 27, en el que las células linfoides son células monocíticas, macrófagos o células T.

29. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para la fabricación de un medicamento para uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno, comprendiendo dicho método:

- 40 (1) determinar el nivel de un anticuerpo específico de antígenos o patógenos;
- (2) administrar dicho medicamento;
- (3) determinar un nivel pos-administración de anticuerpo específico del antígeno o patógeno;
- (4) comparar el nivel de anticuerpo de la etapa (1) con el nivel de anticuerpo de la etapa (3), en donde un incremento en el nivel de anticuerpo es indicativo de la estimulación de una respuesta inmunitaria.

50 30. Un método para detectar la presencia de RNA que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

- 55 (a) poner en contacto una sonda de ácido nucleico bajo condiciones de hibridación con (i) moléculas de RNA de ensayo aisladas de la muestra biológica, o (ii) moléculas de ácido nucleico sintetizadas de moléculas de RNA aisladas, en donde la sonda tiene una secuencia de nucleótidos que comprende o bien una porción de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9, o su complemento, y
- (b) detectar la formación de híbridos de la sonda de ácido nucleico y las moléculas de RNA de ensayo o las moléculas de ácido nucleico sintetizadas, en donde la presencia de los híbridos indica la presencia de RNA que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la muestra biológica.

65 31. Un método *in vitro* o *ex vivo* para destruir células cancerosas, que comprende producir un polipéptido por un método según la reivindicación 12; y formular el polipéptido en un vehículo farmacéuticamente aceptable; y exponer una muestra de tejido o una muestra biológica que contiene células cancerosas al polipéptido; en donde el polipéptido destruye las células.

ES 2 310 660 T3

32. Uso de un polipéptido producido por un método según la reivindicación 12 para la fabricación de un medicamento para destruir células cancerosas.
- 5 33. Un método según la reivindicación 31 o un uso según la reivindicación 32, en el que el polipéptido se conjuga además a una toxina.
- 10 34. Uso de un antagonista de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para la fabricación de un medicamento para tratar a un mamífero afectado por una enfermedad inflamatoria, en el que el antagonista es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 15.
- 15 35. Uso según la reivindicación 34, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica.
36. Uso según la reivindicación 35, en el que la enfermedad inflamatoria crónica se selecciona del grupo de:
- 20 (a) enfermedad inflamatoria de los intestinos;
- (b) colitis ulcerosa;
- (c) enfermedad de Crohn;
- (d) dermatitis atópica;
- (e) eczema; y
- 25 (f) psoriasis.
37. Uso según la reivindicación 34, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda.
- 30 38. Uso según la reivindicación 37, en el que la enfermedad inflamatoria aguda se selecciona del grupo de:
- 35 (a) endotoxemia;
- (b) septicemia;
- (c) síndrome de choque tóxico; y
- (d) enfermedad infecciosa.
- 40 39. Uso según la reivindicación 34, en el que en anticuerpo comprende además un radionúcleo enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimiluminiscente, marcador peptídico, partícula magnética, fármaco o toxina.
- 45 40. Un método para detectar inflamación en un paciente, que comprende:
- 50 incubar una muestra de tejido o una muestra biológica de un paciente con un anticuerpo según la reivindicación 15, bajo condiciones en las que el anticuerpo se une a su polipéptido complementario en la muestra de tejido o muestra biológica;
- 55 visualizar el anticuerpo unido en la muestra de tejido o muestra biológica; y
- comparar los niveles de anticuerpo unido en la muestra de tejido o muestra biológica del paciente con una muestra de tejido o muestra biológica normal de control,
- 60 en donde un incremento en el nivel de anticuerpo unido a la muestra de tejido o muestra biológica del paciente en relación a la muestra de tejido o muestra biológica normal de control es indicativo de inflamación en el paciente.
- 65 41. Un método para detectar inflamación en un paciente, que comprende:
- 70 marcar un polinucleótido que comprende por lo menos 14 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO: 1 o el complemento de la SEC ID NO: 1;
- 75 incubar una muestra de tejido o muestra biológica de un paciente con dicho polinucleótido marcado, bajo condiciones en las que el polinucleótido se hibridará a la secuencia de polinucleótidos complementaria;

ES 2 310 660 T3

visualizar el polinucleótido marcado en la muestra de tejido o muestra biológica; y

- comparar el nivel de hibridación del polinucleótido marcado en la muestra de tejido o muestra biológica del paciente con una muestra de tejido o muestra biológica normal de control, en donde un incremento en la hibridación del polinucleótido marcado a la muestra de tejido o muestra biológica del paciente, en relación a la muestra de tejido o muestra biológica normal de control, es indicativo de inflamación en el paciente.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

	1	15 16	30 31	45	
1 zcytor171ig	---	ASHTLPVRLLRP	SDOVQKIVEELQSL	KMILLKD--VEEKGV	40
2 mzcytor171ig	---	ATCSLSFGAPIS	KEDLRTTIDLLKQES	QDLYNNSIKQASGM	42
3 mIL-3		ASISGRDTHRLTRTL	NCS-SIVKEIIGKL-	--PEP----ELKT--	35
4 hIL-3		APMTQTTPLKTSW-V	NCS-NMIDEIITHLK	QPPLP--LLDFNNLN	41
	46	60 61	75 76	90	
1 zcytor171ig	LVSQNYTLPCLSPDA	QPPNNIHSPAIRAYL	KTIRQLDNKSVIDEI		85
2 mzcytor171ig	SADESIQLPCFSLDR	EALTNISVIIAHLEK	VKVLSE-NTVDTSWV		86
3 mIL-3	DDEGPSLRNKS---	----	-FRRVNLSKFV	ESQGEVDPEDRYVIK	71
4 hIL-3	GEDQQILMENN---	-----	RRPNILEAFN	RAVKSL--QNASAIE	75
	91	105 106	120 121	135	
1 zcytor171ig	IEHLDKLIFQDAPET	NISVPTDTHE--CK	RFILTISQQFSECMD		127
2 mzcytor171ig	IRWLTNISCFNPLNL	NISVPGNTDESYDCK	VFVLTVLKQFSNCMA		131
3 mIL-3	SNLQKLNCCLPTSAN	DSALPGVFIRDLD--	DFRKRLRFYMVH-LN		113
4 hIL-3	SILKNLLPCLPLATA	APTRHPIHIKQGDWN	EFRRKLTFY---LK		116
	136	150 151	165 166	180	
1 zcytor171ig	LALKSLTSGAQOATT				142
2 mzcytor171ig	ELOQAKDNNTTC				141
3 mIL-3	DLETVLTSRPPQFAS	GSVSPNRGTVEC			140
4 hIL-3	TLENA---QAQQTT	LSLAIF			133

FIG. 1

ES 2 310 660 T3

ZCYTOR	MASHSGPSTSVLFLFCCLGGWLASHTLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSLSKMILKD--VEE	10	20	30	40	50	
M17RL-	MI FHTGTTKPTLVLLCCIGTWLATCSLSFGAPISKEDLRTTIDLLKQESQDLYNNYSIKQ	10	20	30	40	50	
		60	70	80	90	100	110
ZCYTOR	EKGVLVSONYTLPCLS PDAQPPNNIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDE-IIEHLDKLIFQ	10	20	30	40	50	
M17RL-	ASGMSADESIQLPCFSLDREALTNI--SVIIAHLEKVKVLS ENTVDTSWVIRWLTNISCF	10	20	30	40	50	
		60	70	80	90	100	110
ZCYTOR	DAPETNISVPTDTHE---CKRFLITISQQFSECM-DLALKSLTSGAQQT	10	20	30	40	50	60
M17RL-	NPLNLNISVPGNTDESYDCKVFVLTVLKQFSNCMAELQAKDNTTC	10	20	30	40	50	60
		120	130	140	150	160	170
ZCYTOR	DAPETNISVPTDTHE---CKRFLITISQQFSECM-DLALKSLTSGAQQT	10	20	30	40	50	60
M17RL-	NPLNLNISVPGNTDESYDCKVFVLTVLKQFSNCMAELQAKDNTTC	10	20	30	40	50	60

FIG. 2

ES 2 310 660 T3

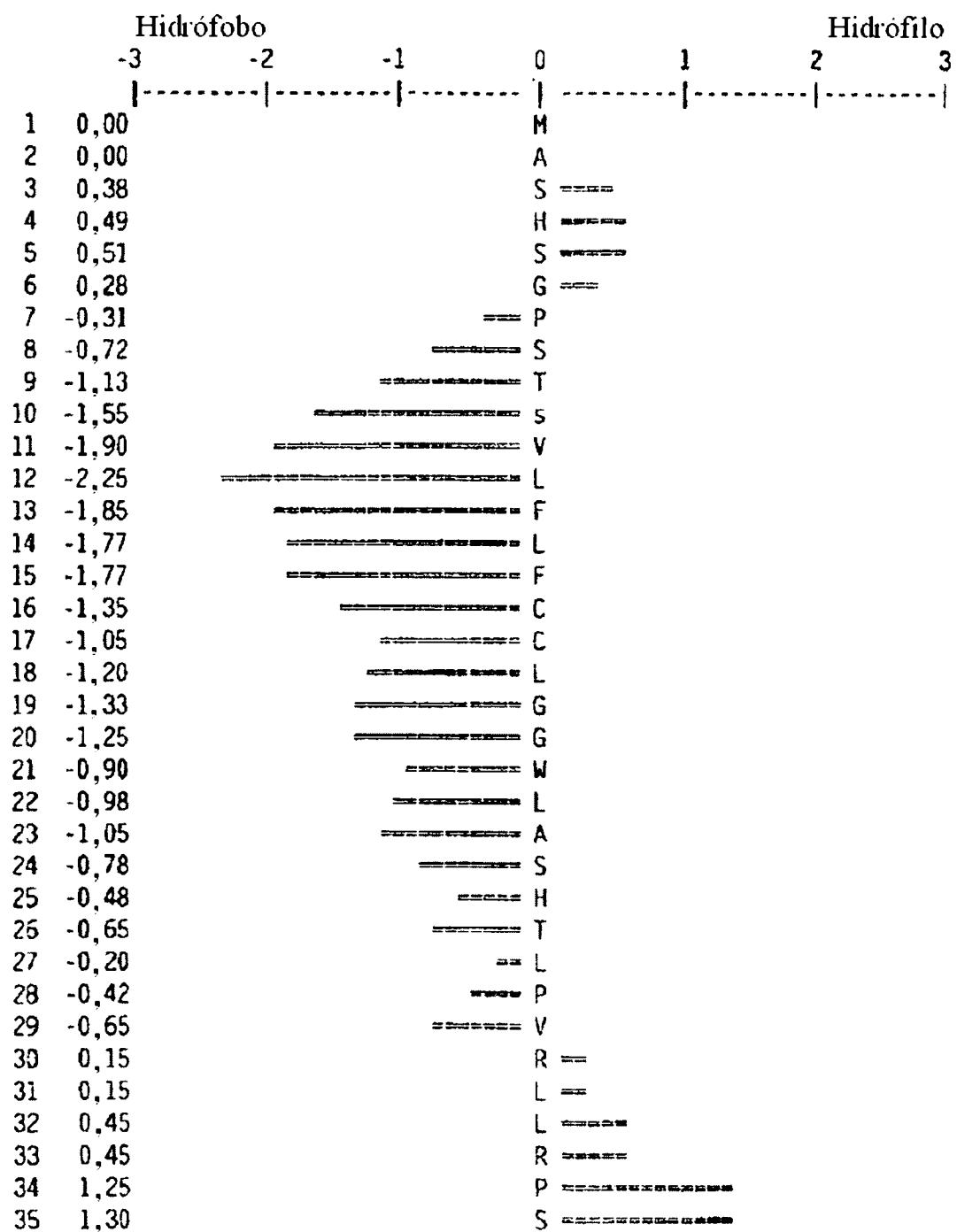


FIG. 3A

ES 2 310 660 T3

36	0,83	D	=====
37	1,33	D	=====
38	0,98	V	=====
39	0,23	Q	--
40	0,23	K	--
41	0,98	I	=====
42	0,65	V	=====
43	0,18	E	--
44	0,53	E	=====
45	0,48	L	=====
46	0,03	Q	
47	0,03	S	
48	0,12	L	-
49	-0,22	-- S	
50	-0,57	---- K	
51	0,23	M	--
52	0,68	L	=====
53	-0,07	- L	
54	0,65	K	=====
55	1,45	D	=====
56	2,25	V	=====
57	2,25	E	=====
58	1,75	E	=====
59	1,75	E	=====
60	0,95	K	=====
61	0,20	G	--
62	-0,25	-- V	
63	-0,72	---- L	
64	-0,68	---- V	
65	-0,42	--- S	
66	-0,18	-- Q	
67	-0,23	-- N	
68	-0,28	--- Y	
69	-0,48	---- T	
70	-0,82	===== L	
71	-0,78	===== P	
72	-0,72	===== C	
73	0,08	L	-
74	0,00	S	

FIG. 3B

ES 2 310 660 T3

75	0,20	P	—
76	0,50	D	=====
77	0,45	A	=====
78	0,48	Q	=====
79	0,02	P	
80	-0,20	— P	
81	-0,32	— N	
82	-0,27	— N	
83	-0,27	— I	
84	-0,38	— H	
85	-0,72	— S	
86	0,08	P	—
87	0,08	A	—
88	-0,35	I	—
89	-0,65	R	—
90	-0,07	A	—
91	0,17	Y	—
92	-0,63	L	—
93	-0,05	K	
94	0,37	T	—
95	0,37	I	—
96	0,37	R	—
97	0,47	Q	—
98	1,27	L	=====
99	0,82	D	=====
100	0,53	N	=====
101	0,53	K	=====
102	0,53	S	=====
103	1,00	V	=====
104	0,20	I	—
105	-0,15	D	—
106	0,60	E	=====
107	0,82	I	=====
108	0,02	I	
109	0,02	E	
110	0,82	H	=====
111	0,82	L	=====
112	0,02	D	

FIG. 3C

ES 2 310 660 T3

113	-0,32	---	K
114	0,02	L	
115	0,02	I	
116	-0,57	=====	F
117	-0,27	==	Q
118	0,53	D	---
119	0,88	A	=====
120	0,88	P	=====
121	0,08	E	=
122	0,22	T	-
123	-0,03	N	
124	-0,53	I	
125	-0,53	S	
126	-0,07	V	-
127	0,17	P	-
128	0,43	T	=====
129	1,18	D	=====
130	1,02	T	=====
131	1,58	h	=====
132	1,58	E	=====
133	1,23	C	=====
134	0,62	K	=====
135	-0,18	R	==
136	-0,58	F	=====
137	-1,38	I	=====
138	-1,83	L	=====
139	-1,38	t	=====
140	-1,05	I	=====
141	-1,17	S	=====
142	-0,55	Q	=====
143	0,25	Q	---
144	0,03	F	
145	-0,22	S	=====
146	0,25	E	---
147	0,37	C	=====
148	0,23	M	---
149	-0,57	D	=====
150	0,10	L	-

FIG. 3D

ES 2 310 660 T3

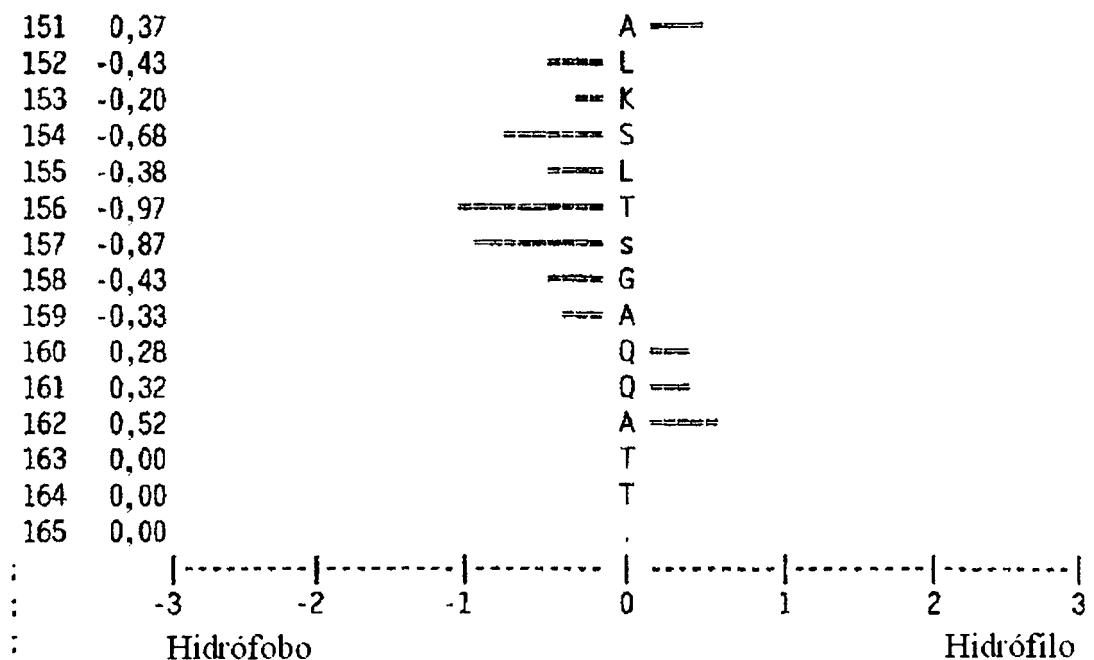


FIG. 3E

ES 2 310 660 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics Inc.
5 <120> NUEVO LIGANDO DE CITOQUINA ZCYTOR17
<130> 02-01PC
<150> US 60/350, 325
<151> 2002-01-18
10 <150> US 60/375.323
<151> 2002-04-25
<150> US 60/435.315
<151> 2002-12-19
15 <160> 168
<170> FastSEQ para Windows, Versión 3.0
<210> 1
20 <211> 904
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*
<220>
25 <221> CDS
<222> (28)...(519)

<400> 1
30

ctgaagctgg cttgtcttc tctgcc atg gcc tct cac tca ggc ccc tcg acg 54
Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

1 5

5	tct gtg ctc ttt ctg ttc tgc tgc ctg gga ggc tgg ctg gcc tcc cac Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His 10 15 20 25	102
10	acg ttg ccc gtc cgt tta cta cga cca agt gat gat gta cag aaa ata Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile 30 35 40	150
15	gtc gag gaa tta cag tcc ctc tcg aag atg ctt ttg aaa gat gtg gag Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu 45 50 55	198
20	gaa gag aag ggc gtg ctc gtg tcc cag aat tac acg ctg ccg tgt ctc Glu Glu Lys Gly Val Leu Val Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu 60 65 70	246
25	agc cct gac gcc cag ccg cca aac aac atc cac agc cca gcc atc ccg Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg 75 80 85	294
30	gca tat ctc aag aca atc aga cag cta gac aac aaa tct gtt att gat Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp 90 95 100 105	342
35	gag atc ata gag cac ctc gac aaa ctc ata ttt caa gat gca cca gaa Glu Ile Ile Glu His Leu Asp Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu 110 115 120	390
40	aca aac att tct gtg cca aca gac acc cat gaa tgt aaa cgc ttc atc Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile 125 130 135	438
45	ctg act att tct caa cag ttt tca gag tgc atg gac ctc gca cta aaa Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys 140 145 150	486
50	tca ttg acc tct gga gcc caa cag gcc acc act taaggccatc tttcccttc 539 Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln Gln Ala Thr Thr 155 160	
55	ggattggcag gaacttaagg agcctaaaa agatgaccga cagctaagtg tggaaactct 599	
60	gccgtgattc cttaagtaca ttttccat gaataatctc agggaccctt catatggct 659 agtcccgaga gggctgagat gtgaattgtt gattacctt gaaaaacatt agtttttgt 719 tattatgtttt ggtattttatg gaatgtttt cttctgcagg cttaagtctt acttattata 779 ccctcgtgag ggtgggaggt ggcagctatg ttaattttt gatattttt gtactaagag 839 ttgtcaatgc tccctggggg agccctcgga atctattaa taaatttat tgaatttttc 899 tcata	904

65

<210> 2

<211> 164

ES 2 310 660 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 2

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

<210> 3

40 <211> 492

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Polinucleótido degenerado de SEQ ID NO: 2 de zcytor17lig humano

<221> característica miscelánea

<222> (1)...(492)

50 <223> n = A,T,C o G

<400> 3

	atggcnwsnc	aywsnggncc	nwsnacnwsn	gtnytnyy	tnttytgytg	yytngnggn	60
55	tggytngcnw	sncayacnyt	nccngtnmgn	ytnytnmgn	cnwsngayga	ygtncaraar	120
	athtngarg	arytncarws	nytrwsnaar	atgytnytna	argaygtnga	rgargaraar	180
	ggngtnytn	tnwsncaraa	ytayacnyt	ccntgyytwn	snccngaygc	ncarccncn	240
	aayaayathc	aywsncngc	nathmgngcn	tayytnaraa	cnathmgnca	rytngayaay	300
60	aarwsngttna	thgaygarat	hathgarcay	ytngayaary	tnathttyca	rgaygcncn	360
	garacnaaya	thwsngtncc	nacngayacn	caygartgya	armgnattyat	hytnacnath	420
	wsncarcart	tywsngartg	yatggayytn	gcnytnaarw	snytnacnws	ngngcncar	480
	cargcnacna	cn					492

65

<210> 4

ES 2 310 660 T3

ES 2 310 660 T3

5	ttc agc ctg gca gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc Phe Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val 30 35 40	628
10	tac tac tat agg aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu 45 50 55 60	676
15	acc agt tat acc cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa Thr Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu 65 70 75	724
20	aaa cat gat aat tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct Lys His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala 80 85 90	772
25	tcg tgc tct ttt ttc ctt cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc Ser Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr 95 100 105	820
30	att gag gtg gaa gct gaa aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg Ile Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met 110 115 120	868
35	aca tac tgg aga tta gag aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att Thr Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile 125 130 135 140	916
40	ttc cgt gtg aaa cca gtt ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa Phe Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu 145 150 155	964
45	tgg ata aag cct gag ttg gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca Trp Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr 160 165 170	1012
50	ctt cga ttc agg aca gtc aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc Leu Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe 175 180 185	1060
	gct aag aac cgt aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg Ala Lys Asn Arg Lys Asn Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Ile Gly Leu	1108

ES 2 310 660 T3

	190	195	200	
5	cag cct ttt aca gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag Gln Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu 205 210 215 220			1156
10	tca aag ttc tgg agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag Ser Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu 225 230 235			1204
15	gaa gaa gct cca tgt ggc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct Glu Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala 240 245 250			1252
20	gag gcg gat gga aga agg cca gtc cgg ttg tta tgg aag aag gca aga Glu Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg 255 260 265			1300
25	gga gcc cca gtc cta gag aaa aca ctt ggc tac aac ata tgg tac tat Gly Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr 270 275 280			1348
30	cca gaa agc aac act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag Pro Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln 285 290 295 300			1396
35	cag ctt gaa ctg cat ctg gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att Gln Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Ser Phe Trp Val Ser Met Ile 305 310 315			1444
40	tct tat aat tct ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca Ser Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro 320 325 330			1492
45	gct att caa gaa aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc Ala Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys 335 340 345			1540
50	gtt gct gag gac cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac Val Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp 350 355 360			1588
55	gtg aac act tgg atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc			1636

60

65

ES 2 310 660 T3

	Val Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro		
365	370	375	380
5	acc acc ctt tcc tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc Thr Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile		1684
	385	390	395
10	cag caa gat aaa tta aaa cct ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat Gln Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr		1732
	400	405	410
15	cca atg ttg cat gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat Pro Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr		1780
	415	420	425
20	gcc aaa gaa ggc gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac Ala Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn		1828
	430	435	440
25	att ggc gtg aag acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt Ile Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser		1876
	445	450	455
30	460		
30	gag aga aag ggt atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa Glu Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu		1924
	465	470	475
35	490		
35	ggt gga aaa gga ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac Gly Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr		1972
	480	485	
40	495	500	505
40	505		
45	510	515	520
45	520		
50	525	530	535
50	535	540	
55			
60			

ES 2 310 660 T3

5	ggt gga ggc ctt ctt att ctc att atc ctg aca gtg gca tat ggt ctc Gly Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu 545 550 555	2164
10	aaa aaa ccc aac aaa ttg act cat ctg tgt tgg ccc acc gtt ccc aac Lys Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn 560 565 570	2212
15	cct gct gaa agt agt ata gcc aca tgg cat gga gat gat ttc aag gat Pro Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp 575 580 585	2260
20	aag cta aac ctg aag gag tct gat gac tct gtg aac aca gaa gac agg Lys Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg 590 595 600	2308
25	atc tta aaa cca tgt tcc acc ccc agt gac aag ttg gtg att gac aag Ile Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys 605 610 615 620	2356
30	ttg gtg gtg aac ttt ggg aat gtt ctg caa gaa att ttc aca gat gaa Leu Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu 625 630 635	2404
35	gcc aga acg ggt cag gaa aac aat tta gga ggg gaa aag aat ggg act Ala Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr 640 645 650	2452
40	aga att ctg tct tcc tgc cca act tca ata taagtgtgga ctaaaatgcg Arg Ile Leu Ser Ser Cys Pro Thr Ser Ile 655 660	2502
45	agaaaagggtgt cctgtggct atgcaaatta gaaaggacat gcagagttt ccaactagga 2562 agactgaatc tggggccca agagaaccat ctctgaagac tggtatgtg gtctttcca 2622 cacatggacc acctacggat gcaatctgta atgcatgtgc atgagaagtc tgttattaag 2682 tagagtgtga aaacatggtt atggtaatag gaacagctt taaaatgcct ttgtatttgg 2742 gcctticata caaaaaagcc ataataccat ttcatgtaa tgctataactt ctataactatt 2802 ttcatgtaat actatacic tatactattt tcgtataata ctatacttct atactatttt 2862 catgtaaatac tatacttcta tattaaagtt itacccacic a 2903	
50	<210> 5 <211> 662 55 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
60		

ES 2 310 660 T3

<400> 5

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

60

65

ES 2 310 660 T3

	Leu	Gly	Lys	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Ile	Pro	Ala	Ile	Gln	Glu	
5									325						330		335
	Lys	Ser	Phe	Gln	Cys	Ile	Glu	Val	Met	Gln	Ala	Cys	Val	Ala	Glu	Asp	
									340						345		350
10	Gln	Leu	Val	Val	Lys	Trp	Gln	Ser	Ser	Ala	Leu	Asp	Val	Asn	Thr	Trp	
									355						360		365
	Met	Ile	Glu	Trp	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Ser	Glu	Pro	Thr	Thr	Leu	Ser	
									370						375		380
15	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Gln	Gln	Asp	Lys	
									385						390		395
	Leu	Lys	Pro	Phe	Trp	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	Met	Leu	His	
									405						410		415
20	Asp	Lys	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	Lys	Glu	Gly	
									420						425		430
	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Glu	Thr	Lys	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Val	Lys	
									435						440		445
25	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Glu	Arg	Lys	Gly	
									450						455		460
	Ile	Ile	Cys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Gly	
									465						470		475
30	Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Tyr	Gly	Leu	Glu	Ser	
									485						490		495
	Leu	Lys	Arg	Lys	Thr	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Val	Met	Ala	Ser	Thr	Ser	
									500						505		510
35	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Asn	Phe	Lys	Thr	Leu	Ser	Phe	
									515						520		525
	Ser	Val	Phe	Glu	Ile	Ile	Leu	Ile	Thr	Ser	Leu	Ile	Gly	Gly	Leu		
									530						535		540
40	Leu	Ile	Leu	Ile	Ile	Leu	Thr	Val	Ala	Tyr	Gly	Leu	Lys	Lys	Pro	Asn	
									545						550		555
	Lys	Leu	Thr	His	Leu	Cys	Trp	Pro	Thr	Val	Pro	Asn	Pro	Ala	Glu	Ser	
									565						570		575
45	Ser	Ile	Ala	Thr	Trp	His	Gly	Asp	Asp	Phe	Lys	Asp	Lys	Leu	Asn	Leu	
									580						585		590
	Lys	Glu	Ser	Asp	Asp	Ser	Val	Asn	Thr	Glu	Asp	Arg	Ile	Leu	Lys	Pro	
									595						600		605
50	Cys	Ser	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Leu	Val	Ile	Asp	Lys	Leu	Val	Val	Asn	
									610						615		620
	Phe	Gly	Asn	Val	Leu	Gln	Glu	Ile	Phe	Thr	Asp	Glu	Ala	Arg	Thr	Gly	
									625						630		635
55	Gln	Glu	Asn	Asn	Leu	Gly	Gly	Glu	Lys	Asn	Gly	Thr	Arg	Ile	Leu	Ser	
									645						650		655
60	Ser	Cys	Pro	Thr	Ser	Ile											

660

65 <210> 6

<211> 2964

ES 2 310 660 T3

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

5 <221> CDS

<222> (13)...(2949)

<400> 6

10

gaattcgcca cc atg gct cta ttt gca gtc ttt cag aca aca ttc ttc tta 51
 Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu
 1 5 10

15

aca ttg ctg tcc ttg agg act tac cag agt gaa gtc ttg gct gaa cgt 99
 Thr Leu Leu Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg
 15 20 25

20

tta cca ttg act cct gta tca ctt aaa gtt tcc acc aat tct acg cgt 147
 Leu Pro Leu Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg
 30 35 40 45

25

cag agt ttg cac tta caa tgg act gtc cac aac ctt cct tat cat cag 195
 Gln Ser Leu His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln
 50 55 60

30

gaa ttg aaa atg gta ttt cag atc cag atc agt agg att gaa aca tcc 243
 Glu Leu Lys Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser
 65 70 75

35

aat gtc atc tgg gtg ggg aat tac agc acc act gtg aag tgg aac cag 291
 Asn Val Ile Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Val Lys Trp Asn Gln
 80 85 90

40

gtt ctg cat tgg agc tgg gaa tct gag ctc cct ttg gaa tgt gcc aca 339
 Val Leu His Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr
 95 100 105

45

cac ttt gta aga ata aag agt ttg gtg gac gat gcc aag ttc cct gag 387
 His Phe Val Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

	110	115	120	125	
5	cca aat ttc tgg agc aac tgg agt tcc tgg gag gaa gtc agt gta caa Pro Asn Phe Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln 130 135 140				435
10	gat tct act gga cag gat ata ttg ttc gtt ttc cct aaa gat aag ctg Asp Ser Thr Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu 145 150 155				483
15	gtg gaa gaa ggc acc aat gtt acc att tgt tac gtt tct agg aac att Val Glu Glu Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile 160 165 170				531
20	caa aat aat gta tcc tgt tat ttg gaa ggg aaa cag att cat gga gaa Gln Asn Asn Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu 175 180 185				579
25	caa ctt gat cca cat gta act gca ttc aac ttg aat agt gtg cct ttc Gln Leu Asp Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe 190 195 200 205				627
30	att agg aat aaa ggg aca aat atc tat tgt gag gca agt caa gga aat Ile Arg Asn Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn 210 215 220				675
35	gtc agt gaa ggc atg aaa ggc atc gtt ctt ttt gtc tca aaa gta ctt Val Ser Glu Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu 225 230 235				723
40	gag gag ccc aag gac ttt tct tgt gaa acc gag gac ttc aag act ttg Glu Glu Pro Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu 240 245 250				771
45	cac tgt act tgg gat cct ggg acg gac act gcc ttg ggg tgg tct aaa His Cys Thr Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys 255 260 265				819
50	caa cct tcc caa agc tac act tta ttt gaa tca ttt tct ggg gaa aag Gln Pro Ser Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys 270 275 280 285				867
55	aaa ctt tgt aca cac aaa aac tgg tgt aat tgg caa ata act caa gac				915

60

65

ES 2 310 660 T3

	Lys Leu Cys Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp			
	290	295	300	
5	tca caa gaa acc tat aac ttc aca ctc ata gct gaa aat tac tta agg		963	
	Ser Gln Glu Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg			
	305	310	315	
10	aag aga agt gtc aat atc ctt ttt aac ctg act cat cga gtt tat tta		1011	
	Lys Arg Ser Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu			
	320	325	330	
15	atg aat cct ttt agt gtc aac ttt gaa aat gta aat gcc aca aat gcc		1059	
	Met Asn Pro Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala			
	335	340	345	
20	atc atg acc tgg aag gtg cac tcc ata agg aat aat ttc aca tat ttg		1107	
	Ile Met Thr Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu			
	350	355	360	365
25	tgt cag att gaa ctc cat ggt gaa gga aaa atg atg caa tac aat gtt		1155	
	Cys Gln Ile Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val			
	370	375	380	
30	tcc atc aag gtg aac ggt gag tac ttc tta agt gaa ctg gaa cct gcc		1203	
	Ser Ile Lys Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala			
	385	390	395	
35	aca gag tac atg gcg cga gta cgg tgt gct gat gcc agc cac ttc tgg		1251	
	Thr Glu Tyr Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp			
	400	405	410	
40	aaa tgg agt gaa tgg agt ggt cag aac ttc acc aca ctt gaa gct gct		1299	
	Lys Trp Ser Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala			
	415	420	425	
45	ccc tca gag gcc cct gat gtc tgg aga att gtg agc ttg gag cca gga		1347	
	Pro Ser Glu Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly			
	430	435	440	445
50	aat cat act gtg acc tta ttc tgg aag cca tta tca aaa ctg cat gcc		1395	
	Asn His Thr Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala			
	450	455	460	
55				
60				
65				

ES 2 310 660 T3

5	aat gga aag atc ctg ttc tat aat gta gtt gta gaa aac cta gac aaa Asn Gly Lys Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys 465 470 475	1443
10	cca tcc agt tca gag ctc cat tcc att cca gca cca gcc aac agc aca Pro Ser Ser Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr 480 485 490	1491
15	aaa cta atc ctt gac agg tgt tcc tac caa atc tgc gtc ata gcc aac Lys Leu Ile Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn 495 500 505	1539
20	aac agt gtg ggt gct tct cct gct tct gta ata gtc atc tct gca gac Asn Ser Val Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp 510 515 520 525	1587
25	ccc gaa aac aaa gag gtt gag gaa gaa aga att gca ggc aca gag ggt Pro Glu Asn Lys Glu Val Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly 530 535 540	1635
30	gga ttc tct ctg tct tgg aaa ccc caa cct gga gat gtt ata ggc tat Gly Phe Ser Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr 545 550 555	1683
35	gtt gtg gac tgg tgt gac cat acc cag gat gtg ctc ggt gat ttc cag Val Val Asp Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln 560 565 570	1731
40	tgg aag aat gta ggt ccc aat acc aca agc aca gtc att agc aca gat Trp Lys Asn Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp 575 580 585	1779
45	gct ttt agg cca gga gtt cga tat gac ttc aga att tat ggg tta tct Ala Phe Arg Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser 590 595 600 605	1827
50	aca aaa agg att gct tgt tta tta gag aaa aaa aca gga tac tct cag Thr Lys Arg Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln 610 615 620	1875
55	gaa ctt gct cct tca gac aac cct cac gtc ctg gtg gat aca ttg aca Glu Leu Ala Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr 625 630 635	1923
60		

ES 2 310 660 T3

5	tcc cac tcc ttc act ctg agt tgg aaa gat tac tct act gaa tct caa Ser His Ser Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln 640 645 650	1971
10	cct ggt ttt ata caa ggg tac cat gtc tat ctg aaa tcc aag gcg agg Pro Gly Phe Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg 655 660 665	2019
15	cag tgc cac cca cga ttt gaa aag gca gtt ctt tca gat ggt tca gaa Gln Cys His Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu 670 675 680 685	2067
20	tgt tgc aaa tac aaa att gac aac ccg gaa aag gca ttg att gtg Cys Cys Lys Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val 690 695 700	2115
25	gac aac cta aag cca gaa tcc ttc tat gag ttt ttc atc act cca ttc Asp Asn Leu Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe 705 710 715	2163
30	act agt gct ggt gaa ggc ccc agt gct acg ttc acg aag gtc acg act Thr Ser Ala Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr 720 725 730	2211
35	ccg gat gaa cac tcc tcg atg ctg att cat atc cta ctg ccc atg gtt Pro Asp Glu His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val 735 740 745	2259
40	ttc tgc gtc ttg ctc atc atg gtc atg tgc tac ttg aaa agt cag tgg Phe Cys Val Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp 750 755 760 765	2307
45	atc aag gag acc tgt tat cct gac atc cct gac cct tac aag agc agc Ile Lys Glu Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser 770 775 780	2355
50	atc ctg tca tta ata aaa ttc aag gag aac cct cac cta ata ata atg Ile Leu Ser Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met 785 790 795	2403
55	aat gtc agt gac tgt atc cca gat gct att gaa gtt gta agc aag cca Asn Val Ser Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro	2451

60

65

ES 2 310 660 T3

	800	805	810	
5	gaa ggg aca aag ata cag ttc cta ggc act agg aag tca ctc aca gaa Glu Gly Thr Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu 815 820 825			2499
10	acc gag ttg act aag cct aac tac ctt tat ctc ctt cca aca gaa aag Thr Glu Leu Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys 830 835 840 845			2547
15	aat cac tct ggc cct ggc ccc tgc atc tgt ttt gag aac ttg acc tat Asn His Ser Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr 850 855 860			2595
20	aac cag gca gct tct gac tct ggc tct tgt ggc cat gtt cca gta tcc Asn Gln Ala Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser 865 870 875			2643
25	cca aaa gcc cca agt atg ctg gga cta atg acc tca cct gaa aat gta Pro Lys Ala Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val 880 885 890			2691
30	cta aag gca cta gaa aaa aac tac atg aac tcc ctg gga gaa atc cca Leu Lys Ala Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro 895 900 905			2739
35	gct gga gaa aca agt ttg aat tat gtg tcc cag ttg gct tca ccc atg Ala Gly Glu Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met 910 915 920 925			2787
40	ttt gga gac aag gac agt ctc cca aca aac cca gta gag gca cca cac Phe Gly Asp Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His 930 935 940			2835
45	tgt tca gag tat aaa atg caa atg gca gtc tcc ctg cgt ctt gcc ttg Cys Ser Glu Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu 945 950 955			2883
50	cct ccc ccg acc gag aat agc agc ctc tcc tca att acc ctt tta gat Pro Pro Pro Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp 960 965 970			2931
55	cca ggt gaa cac tac tgc taaccagcac tcgag			2964
	Pro Gly Glu His Tyr Cys 975			
60	<210> 7			
	<211> 979			
	<212> PRT			
65	<213> <i>Homo sapiens</i>			

ES 2 310 660 T3

<400> 7

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

55

60

65

ES 2 310 660 T3

	260	265	270
5	Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys Lys Leu Cys		
	275	280	285
	Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp Ser Gln Glu		
	290	295	300
10	Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg Lys Arg Ser		
	305	310	315
	Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu Met Asn Pro		
	325	330	335
15	Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile Met Thr		
	340	345	350
	Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys Gln Ile		
	355	360	365
20	Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val Ser Ile Lys		
	370	375	380
	Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr		
	385	390	395
25	Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys Trp Ser		
	405	410	415
	Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro Ser Glu		
	420	425	430
30	Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn His Thr		
	435	440	445
	Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn Gly Lys		
	450	455	460
35	Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro Ser Ser		
	465	470	475
	Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile		
	485	490	495
40	Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val		
	500	505	510
	Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn		
	515	520	525
45	Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Gly Phe Ser		
	530	535	540
	Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp		
	545	550	555
50	Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn		
	565	570	575
	Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg		
	580	585	590
55	Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg		
	595	600	605

60

65

ES 2 310 660 T3

	Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala			
5	610	615	620	
	Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser			
	625	630	635	640
	Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe			
	645	650	655	
10	Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His			
	660	665	670	
	Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys			
	675	680	685	
15	Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu			
	690	695	700	
	Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala			
20	705	710	715	720
	Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu			
	725	730	735	
	His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val Phe Cys Val			
25	740	745	750	
	Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Ile Lys Glu			
	755	760	765	
	Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser			
30	770	775	780	
	Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met Asn Val Ser			
	785	790	795	800
35	Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro Glu Gly Thr			
	805	810	815	
	Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu Thr Glu Leu			
	820	825	830	
40	Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys Asn His Ser			
	835	840	845	
	Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr Asn Gln Ala			
	850	855	860	
45	Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser Pro Lys Ala			
	865	870	875	880
	Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val Leu Lys Ala			
	885	890	895	
50	Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro Ala Gly Glu			
	900	905	910	
	Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met Phe Gly Asp			
	915	920	925	
55	Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His Cys Ser Glu			
	930	935	940	
	Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu Pro Pro Pro			
60	945	950	955	960
	Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp Pro Gly Glu			
	965	970	975	
65	His Tyr Cys			

ES 2 310 660 T3

<210> 8
 <211> 2657
 <212> DNA
 5 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CDS
 10 <222> (133)....(2040)
 <400> 8

15 cgaggcggc ctgccgggt gttcgctt cccgttgcgc cctcggcgc tgtacccaga 60
 gctcgaagag gagcagcgcg gccgcgcgaa cccggcaagg ctgggcccga ctcggggctc 120
 ccgagggacg cc atg cgg gga ggc agg ggc gcc cct ttc tgg ctg tgg ccg 171
 Met Arg Gly Arg Gly Ala Pro Phe Trp Leu Trp Pro
 20 1 5 10

ctg ccc aag ctg gcg ctg ctc ctg ttg tgg gtg ctt ttc cag cgg 219
 Leu Pro Lys Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Trp Val Leu Phe Gln Arg
 25 15 20 25

acg cgt ccc cag ggc agc gcc ggg cca ctg cag tgc tac gga gtt gga 267
 Thr Arg Pro Gln Gly Ser Ala Gly Pro Leu Gln Cys Tyr Gly Val Gly
 30 30 35 40 45

ccc ttg ggc gac ttg aac tgc tcg tgg gag cct ctt ggg gac ctg gga 315
 Pro Leu Gly Asp Leu Asn Cys Ser Trp Glu Pro Leu Gly Asp Leu Gly
 35 50 55 60

gcc ccc tcc gag tta cac ctc cag agc caa aag tac cgt tcc aac aaa 363
 Ala Pro Ser Glu Leu His Leu Gln Ser Gln Lys Tyr Arg Ser Asn Lys
 40 65 70 75

acc cag act gtg gca gtg gca gcc gga cgg agc tgg gtg gcc att cct 411
 Thr Gln Thr Val Ala Val Ala Ala Gly Arg Ser Trp Val Ala Ile Pro
 45 80 85 90

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

5	cg g gaa cag ctc acc atg tct gac aaa ctc ctt gtc tgg ggc act aag Arg Glu Gln Leu Thr Met Ser Asp Lys Leu Leu Val Trp Gly Thr Lys 95 100 105	459
10	gca ggc cag cct ctc tgg ccc ccc gtc ttc gtg aac cta gaa acc caa Ala Gly Gln Pro Leu Trp Pro Pro Val Phe Val Asn Leu Glu Thr Gln 110 115 120 125	507
15	atg aag cca aac gcc ccc cgg ctg ggc cct gac gtg gac ttt tcc gag Met Lys Pro Asn Ala Pro Arg Leu Gly Pro Asp Val Asp Phe Ser Glu 130 135 140	555
20	gat gac ccc ctg gag gcc act gtc cat tgg gcc cca cct aca tgg cca Asp Asp Pro Leu Glu Ala Thr Val His Trp Ala Pro Pro Thr Trp Pro 145 150 155	603
25	tct cat aaa gtt ctg atc tgc cag ttc cac tac cga aga tgt cag gag Ser His Lys Val Leu Ile Cys Gln Phe His Tyr Arg Arg Cys Gln Glu 160 165 170	651
30	gc g gcc tgg acc ctg ctg gaa cc g gag ctg aag acc ata ccc ctg acc Ala Ala Trp Thr Leu Leu Glu Pro Glu Leu Lys Thr Ile Pro Leu Thr 175 180 185	699
35	cct gtt gag atc caa gat ttg gag cta gcc act ggc tac aaa gtg tat Pro Val Glu Ile Gln Asp Leu Glu Leu Ala Thr Gly Tyr Lys Val Tyr 190 195 200 205	747
40	ggc cgc tgc cgg atg gag aaa gaa gag gat ttg tgg ggc gag tgg agc Gly Arg Cys Arg Met Glu Lys Glu Glu Asp Leu Trp Gly Glu Trp Ser 210 215 220	795
45	ccc att ttg tcc ttc cag aca cc g cct tct gct cca aaa gat gtg tgg Pro Ile Leu Ser Phe Gln Thr Pro Pro Ser Ala Pro Lys Asp Val Trp 225 230 235	843
50	gta tca ggg aac ctc tgt ggg acg cct gga gga gag gaa cct ttg ctt Val Ser Gly Asn Leu Cys Gly Thr Pro Gly Gly Glu Pro Leu Leu 240 245 250	891
55	cta tgg aag gcc cca ggg ccc tgt gtg cag gtg agc tac aaa gtc tgg Leu Trp Lys Ala Pro Gly Pro Cys Val Gln Val Ser Tyr Lys Val Trp 255 260 265	939

60

65

ES 2 310 660 T3

5	ttc tgg gtt gga ggt cgt gag ctg agt cca gaa gga att acc tgc tgc Phe Trp Val Gly Gly Arg Glu Leu Ser Pro Glu Gly Ile Thr Cys Cys 270 275 280 285	987
10	tgc tcc cta att ccc agt ggg gcg gag tgg gcc agg gtg tcc gct gtc Cys Ser Leu Ile Pro Ser Gly Ala Glu Trp Ala Arg Val Ser Ala Val 290 295 300	1035
15	aac gcc aca agc tgg gag cct ctc acc aac ctc tct ttg gtc tgc ttg Asn Ala Thr Ser Trp Glu Pro Leu Thr Asn Leu Ser Leu Val Cys Leu 305 310 315	1083
20	gat tca gcc tct gcc ccc cgt agc gtg gca gtc agc agc atc gct ggg Asp Ser Ala Ser Ala Pro Arg Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Ala Gly 320 325 330	1131
25	agc acg gag cta ctg gtg acc tgg caa ccg ggg cct ggg gaa cca ctg Ser Thr Glu Leu Leu Val Thr Trp Gln Pro Gly Pro Gly Glu Pro Leu 335 340 345	1179
30	gag cat gta gtg gac tgg gct cga gat ggg gac ccc ctg gag aaa ctc Glu His Val Val Asp Trp Ala Arg Asp Gly Asp Pro Leu Glu Lys Leu 350 355 360 365	1227
35	aac tgg gtc cgg ctt ccc cct ggg aac ctc agt gct ctg tta cca ggg Asn Trp Val Arg Leu Pro Pro Gly Asn Leu Ser Ala Leu Leu Pro Gly 370 375 380	1275
40	aat ttc act gtc ggg gtc ccc tat cga atc act gtg acc gca gtc tct Asn Phe Thr Val Gly Val Pro Tyr Arg Ile Thr Val Thr Ala Val Ser 385 390 395	1323
45	gct tca ggc ttg gcc tct gca tcc tcc gtc tgg ggg ttc agg gag gaa Ala Ser Gly Leu Ala Ser Ala Ser Ser Val Trp Gly Phe Arg Glu Glu 400 405 410	1371
50	tta gca ccc cta gtg ggg cca acg ctt tgg cga ctc caa gat gcc cct Leu Ala Pro Leu Val Gly Pro Thr Leu Trp Arg Leu Gln Asp Ala Pro 415 420 425	1419
55	cca ggg acc ccc gcc ata gcg tgg gga gag gtc cca agg cac cag ctt Pro Gly Thr Pro Ala Ile Ala Trp Gly Glu Val Pro Arg His Gln Leu	1467
60		
65		

ES 2 310 660 T3

	430	435	440	445	
5	cga ggc cac ctc acc cac tac acc ttg tgt gca cag agt gga acc agc Arg Gly His Leu Thr His Tyr Thr Leu Cys Ala Gln Ser Gly Thr Ser	450	455	460	1515
10	ccc tcc gtc tgc atg aat gtg agt ggc aac aca cag agt gtc acc ctg Pro Ser Val Cys Met Asn Val Ser Gly Asn Thr Gln Ser Val Thr Leu	465	470	475	1563
15	cct gac ctt cct tgg ggt ccc tgt gag ctg tgg gtg aca gca tct acc Pro Asp Leu Pro Trp Gly Pro Cys Glu Leu Trp Val Thr Ala Ser Thr	480	485	490	1611
20	atc gct gga cag ggc cct ggt ccc atc ctc cgg ctt cat cta cca Ile Ala Gly Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ile Leu Arg Leu His Leu Pro	495	500	505	1659
25	gat aac acc ctg agg tgg aaa gtt ctg cca ggc atc cta ttc ttg tgg Asp Asn Thr Leu Arg Trp Lys Val Leu Pro Gly Ile Leu Phe Leu Trp	510	515	520	1707
30	ggc ttg ttc ctg ttg ggg tgt ggc ctg agc ctg gcc acc tct gga agg Gly Leu Phe Leu Leu Gly Cys Gly Leu Ser Leu Ala Thr Ser Gly Arg	530	535	540	1755
35	tgc tac cac cta agg cac aaa gtg ctg ccc cgc tgg gtc tgg gag aaa Cys Tyr His Leu Arg His Lys Val Leu Pro Arg Trp Val Trp Glu Lys	545	550	555	1803
40	gtt cct gat cct gcc aac agc agt tca ggc cag ccc cac atg gag caa Val Pro Asp Pro Ala Asn Ser Ser Ser Gly Gln Pro His Met Glu Gln	560	565	570	1851
45	gta cct gag gcc cag ccc ctt ggg gac ttg ccc atc ctg gaa gtg gag Val Pro Glu Ala Gln Pro Leu Gly Asp Leu Pro Ile Leu Glu Val Glu	575	580	585	1899
50	gag atg gag ccc ccg ccg gtt atg gag tcc tcc cag ccc gcc cag gcc Glu Met Glu Pro Pro Val Met Glu Ser Ser Gln Pro Ala Gln Ala	590	595	600	1947
55	acc gcc ccg ctt gac tct ggg tat gag aag cac ttc ctg ccc aca cct				1995

60

65

ES 2 310 660 T3

Thr Ala Pro Leu Asp Ser Gly Tyr Glu Lys His Phe Leu Pro Thr Pro
 610 615 620

5 gag gag ctg ggc ctt ctg ggg ccc ccc agg cca cag gtt ctg gcc 2040
 Glu Glu Leu Gly Leu Leu Gly Pro Pro Arg Pro Gln Val Leu Ala
 625 630 635

10 tgaaccacac gtctggctgg gggctgccag ccaggctaga gggatgctca tgcaggttgc 2100
 accccagtcc tggattagcc ctcttgatgg atgaagacac tgaggactca gagaggctga 2160
 gtcacttacc tgaggacacc cagccaggca gagctggat tgaaggaccc ctatagagaa 2220
 gggcttggcc cccatggga agacacggat ggaaggtgga gcaaaggaaa atacatgaaa 2280
 tttagagtggt cagctgcctg caaaaatctg ttccgctgtt acagaactga atttggaccc 2340
 cagcacagtg gctcacgcct gtaatcccag cactttggca ggccaagggtg gaaggatcac 2400
 tttagagctag gagtttgaga ccagcctggg caatatacgca agacccctca ctacaaaaat 2460
 20 aaaaacatcaa aaacaaaaac aattagctgg gcatgtatggc acacacctgt agtccgagcc 2520
 acttgggagg ctgaggtggg aggatcggtt gagcccagga gttcgaagct gcagggacct 2580
 ctgattgcac cactgcactc caggctgggt aacagaatga gaccttatct caaaaataaa 2640
 caaactaata aaaagca 2657

25 <210> 9
 <211> 636
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

ES 2 310 660 T3

	Leu Glu Ala Thr Val His Trp Ala Pro Pro Thr Trp Pro Ser His Lys			
5	145	150	155	160
	Val Leu Ile Cys Gln Phe His Tyr Arg Arg Cys Gln Glu Ala Ala Trp			
	165	170	175	
	Thr Leu Leu Glu Pro Glu Leu Lys Thr Ile Pro Leu Thr Pro Val Glu			
10	180	185	190	
	Ile Gln Asp Leu Glu Leu Ala Thr Gly Tyr Lys Val Tyr Gly Arg Cys			
	195	200	205	
	Arg Met Glu Lys Glu Glu Asp Leu Trp Gly Glu Trp Ser Pro Ile Leu			
15	210	215	220	
	Ser Phe Gln Thr Pro Pro Ser Ala Pro Lys Asp Val Trp Val Ser Gly			
	225	230	235	240
	Asn Leu Cys Gly Thr Pro Gly Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu Trp Lys			
20	245	250	255	
	Ala Pro Gly Pro Cys Val Gln Val Ser Tyr Lys Val Trp Phe Trp Val			
	260	265	270	
	Gly Gly Arg Glu Leu Ser Pro Glu Gly Ile Thr Cys Cys Cys Ser Leu			
25	275	280	285	
	Ile Pro Ser Gly Ala Glu Trp Ala Arg Val Ser Ala Val Asn Ala Thr			
	290	295	300	
	Ser Trp Glu Pro Leu Thr Asn Leu Ser Leu Val Cys Leu Asp Ser Ala			
30	305	310	315	320
	Ser Ala Pro Arg Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Ala Gly Ser Thr Glu			
	325	330	335	
	Leu Leu Val Thr Trp Gln Pro Gly Pro Gly Glu Pro Leu Glu His Val			
35	340	345	350	
	Val Asp Trp Ala Arg Asp Gly Asp Pro Leu Glu Lys Leu Asn Trp Val			
	355	360	365	
	Arg Leu Pro Pro Gly Asn Leu Ser Ala Leu Leu Pro Gly Asn Phe Thr			
40	370	375	380	
	Val Gly Val Pro Tyr Arg Ile Thr Val Thr Ala Val Ser Ala Ser Gly			
	385	390	395	400
	Leu Ala Ser Ala Ser Ser Val Trp Gly Phe Arg Glu Glu Leu Ala Pro			
45	405	410	415	
	Leu Val Gly Pro Thr Leu Trp Arg Leu Gln Asp Ala Pro Pro Gly Thr			
	420	425	430	
	Pro Ala Ile Ala Trp Gly Glu Val Pro Arg His Gln Leu Arg Gly His			
50	435	440	445	
	Leu Thr His Tyr Thr Leu Cys Ala Gln Ser Gly Thr Ser Pro Ser Val			
	450	455	460	
	Cys Met Asn Val Ser Gly Asn Thr Gln Ser Val Thr Leu Pro Asp Leu			
55	465	470	475	480
	Pro Trp Gly Pro Cys Glu Leu Trp Val Thr Ala Ser Thr Ile Ala Gly			
60				

ES 2 310 660 T3

	485	490	495
5	Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ile Leu Arg Leu His Leu Pro Asp Asn Thr		
	500	505	510
	Leu Arg Trp Lys Val Leu Pro Gly Ile Leu Phe Leu Trp Gly Leu Phe		
	515	520	525
10	Leu Leu Gly Cys Gly Leu Ser Leu Ala Thr Ser Gly Arg Cys Tyr His		
	530	535	540
	Leu Arg His Lys Val Leu Pro Arg Trp Val Trp Glu Lys Val Pro Asp		
	545	550	555
15	Pro Ala Asn Ser Ser Ser Gly Gln Pro His Met Glu Gln Val Pro Glu		
	565	570	575
	Ala Gln Pro Leu Gly Asp Leu Pro Ile Leu Glu Val Glu Glu Met Glu		
	580	585	590
20	Pro Pro Pro Val Met Glu Ser Ser Gln Pro Ala Gln Ala Thr Ala Pro		
	595	600	605
	Leu Asp Ser Gly Tyr Glu Lys His Phe Leu Pro Thr Pro Glu Glu Leu		
	610	615	620
25	Gly Leu Leu Gly Pro Pro Arg Pro Gln Val Leu Ala		
	625	630	635

30 <210> 10
<211> 755
<212> DNA
<213> *Mus musculus*
35 <220>
<221> CDS
<222> (1)...(489)

40

45

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

<400> 10

5	atg atc ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys 1 5 10 15	48
10	tgt ata gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro 20 25 30	96
15	ata tcg aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu 35 40 45	144
20	tct cag gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met 50 55 60	192
25	tca gca gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu 65 70 75 80	240
30	gca tta acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys 85 90 95	288
35	gtg ttg agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu 100 105 110	336
40	aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro 115 120 125	384
45	gga aat act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val 130 135 140	432
50	tta aag cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn 145 150 155 160	480
55	act aca tgc tgagtatgg gggggggggg ggtgcagtgt cctcagcagt Thr Thr Cys	529
60	<210> 11 <211> 163 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>	
65		

ES 2 310 660 T3

<400> 11

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

<210> 12

<211> 489

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Polinucleótido degenerado de SEQ ID NO: 11 de zcytor17lig de ratón

<221> característica miscelánea

<222> (1)...(489)

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

45

<400> 12

50 atgathttgc ayaacnggnac nacnaarccn acnytngtny tnytntgytg yathggncn 60
tggtytngcna cmtgywsnyt nwsnttygggn gcnccnathw snaargarga yytrmggnacn 120
acnathgagayy tnytnaarca rgarwsncar gayytntaya ayaaytayws nathaarcar 180
gcnwsnggna tgwsngcnga ygarwsnath carytnccnt gyttywsnyt ngaymgngar 240
gcnytnacna ayathwsngt nathathgcn cavytngara argtnaargt nytrwsngar 300

55

60 aayacngtng ayacnwsntg ggttnathmgn tggtytnacna ayathwsntg yttayaayccn 360
ytnaayytna ayathwsngt nccnggnaay acngaygarw sntaygaytg yaargtntty 420
gtnytnacng tnytnaarca rttywsnaay tgyatggcng arytnccargc naargayaay 480
acnacntgy 489

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

ES 2 310 660 T3

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC6673

5 <400> 13

gcgcaaggta ccgttcacag c

21

10

<210> 14
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC29082

20

<400> 14

25 caatttgtt ggtttttta gcagcagtag gcccag

36

25

<210> 15
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC29083
<400> 15

40

40 ctgggcctac tgctgctaaa aaaacccaac aaattg

36

45

<210> 16
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC29145
<400> 16

55

55 gcgtctagag gtttatattg aagttggca ggaaga

36

60

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Etiqueta peptídica Gly-Ser Glu-Glu (CEE) modificada

ES 2 310 660 T3

<400> 17

5 Gly Ser Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5

<210> 18

10 <211> 33

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador de oligonucleótido ZC29359

<400> 18

20 gcgggatcca tgaagctctc tccccagcct tca 33

<210> 19

25 <211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Cebador de oligonucleótido ZC27899

<400> 19

35 ccagaacttt gactccttga ccg 23

40 <210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC27895

50 <400> 20

 gaagtcaact tcgctaagaa ccg 23

55 <210> 21

<211> 34

<212> DNA

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC29122

65

ES 2 310 660 T3

<400> 21

ccgctcgagt tatattgaag ttgggcagga agac

34

5

<210> 22

<211> 22

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador de oligonucleótido ZC29180

<400> 22

20 **cctggagtcc ctgaaacgaa ag**

22

<210> 23

25 <211> 34

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Cebador de oligonucleótido ZC29122

<400> 23

35

ccgctcgagt tatattgaag ttgggcagga agac

34

40 <210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC9791

<400> 24

50

cgttccaaca aaacccagac

20

55 <210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC9793

<400> 25

65

tggcggtgac agcggacac

19

ES 2 310 660 T3

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC40109
10 <400> 26

ccattccagc accagccaac 20

15 <210> 27
<211> 22
20 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC40112
25 <400> 27

tacaacttca atagcatctg gg 22

30 <210> 28
<211> 40
35 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
40 <223> Cebador de oligonucleótido ZC13496
<400> 28

45 <210> 29
50 <211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
55 <223> Cebador de oligonucleótido ZC13945
<400> 29

60 <210> 30
65 <211> 34
<212> DNA

ES 2 310 660 T3

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC18698
5
<400> 30

tttttttctc gagactttt tttttttt tttt **34**

10 <210> 31
<220>
<223> Secuencia de salto
15 <400> 31
000
20 <210> 32
<211> 10
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Etiqueta peptídica Glu-Glu (CEE) con par resto Gly-Ser
30 <400> 32

Gly Ser Gly Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5 10

35 <210> 33
<211> 33
<212> DNA
40 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC29451
45 <400> 33

ccggaattcc cctgatacat gaagctctct ccc **33**

50 <210> 34
<211> 33
<212> DNA
55 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC29124
60 <400> 34

cgcggatccc tcaaagacac tgaatgacaa tgt **33**

65 <210> 35
<211> 6
<212> PRT

ES 2 310 660 T3

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Señal peptídica Glu-Glu (CEE) sin par resto Gly-Ser
5
<400> 35

10 Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5

15 <210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
20 <223> Secuencia peptídica C-terminal FLAG
<400> 36

25 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

30 <210> 37
 <211> 684
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 37

40	tcagacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagccgaggg ggcaccgtca 60 gttttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc 120 acatgcgtgg tggtgtggacgt gaggccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagtgc 180 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaaagaca aagccgcggg aggagcagta caacacgcacg 240 45 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtagc 300 aagtgcacagg tctccaacaa agccctccca tccctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 360 aaaggccagc cccgagaacc acagggtgtac accctgcggcc catcccgga tgagctgacc 420 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccgacga catcgccgtg 480 50 gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgtggac 540 tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600 gggaacgtct tctcatgctc cgtgtatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660 agccctccca tggctccggg taaa 684
----	---

55 <210> 38
60 <211> 2295
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
65 <223> Polipéptido de fusión zcytor17-Fc4 humano
<221> CDS
<222> (1)...(2295)

ES 2 310 660 T3

<400> 38

5	atg aag ctc tct ccc cag cct tca tgt gtt aac ctg ggg atg atg tgg Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp 1 5 10 15	48
10	acc tgg gca ctg tgg atg ctc cct tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala 20 25 30	96
15	gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg 35 40 45	144
20	aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr 50 55 60	192
25	cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat aat Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn 65 70 75 80	240
30	tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tcg tgc tct ttt Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe 85 90 95	288
35	ttc ctt cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg gaa Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu 100 105 110	336
40	gct gaa aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg aga Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg 115 120 125	384
45	tta gag aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg aaa Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys 130 135 140	432
50	cca gtt ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag cct	480

55

60

65

ES 2 310 660 T3

	Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro		
145	150	155	160
5	gag ttg gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc agg Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg		528
	165	170	175
10	aca gtc aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac cgt Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg		576
	180	185	190
15	aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt aca Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr		624
	195	200	205
20	gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc tgg Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp		672
	210	215	220
25	agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa gct cca Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro		720
	225	230	235
30	tgt ggc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag gcg gat gga Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly		768
	245	250	255
35	aga agg cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga gga gcc cca gtc Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val		816
	260	265	270
40	cta gag aaa aca ctt ggc tac aac ata tgg tac tat cca gaa agc aac Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn		864
	275	280	285
45	act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag cag ctt gaa ctg Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu		912
	290	295	300
50	cat ctg gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att tct tat aat tct His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser		960
	305	310	315
55			
60			
65			

ES 2 310 660 T3

5	ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca gct att caa gaa Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu 325 330 335	1008
10	aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc gtt gct gag gac Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp 340 345 350	1056
15	cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac gtg aac act tgg Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp 355 360 365	1104
20	atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc acc acc ctt tcc .Met Ile Glu Trp Phe .Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser 370 375 380	1152
25	tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag caa gat aaa Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys 385 390 395 400	1200
30	tta aaa ccc ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca atg ttg cat Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His 405 410 415	1248
35	gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc aaa gaa ggc Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly 420 425 430	1296
40	gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac att ggc gtg aag Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys 435 440 445	1344
45	acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt gag aga aag ggt Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly 450 455 460	1392
50	atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gga Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Lys Gly 465 470 475 480	1440
55	ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac ggc ctg gag tcc Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser 485 490 495	1488
60		

ES 2 310 660 T3

	ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc agc acc agt		1536
5	Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser		
	500	505	510
	gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca ttg tca ttc		1584
10	Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe		
	515	520	525
15	agt gtc ttt gag gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc cca		1632
	Ser Val Phe Glu Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
	530	535	540
20	ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc		1680
	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe		
	545	550	555
25	ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc		1728
	Pro Pro Lys Pro Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
	565	570	575
30	aca tgc gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc		1776
	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
	580	585	590
35	aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg		1824
	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
	595	600	605
40	cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc		1872
	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
	610	615	620
45	gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc		1920
	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
	625	630	635
50	tcc aac aaa gcc ctc cca tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc		1968
	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
	645	650	655
55	aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cg		2016
	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
60			
65			

ES 2 310 660 T3

	660	665	670	
5	gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	675	680	2064
			685	
10	ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	690	695	2112
			700	
15	gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	705	710	2160
			715	720
20	ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	725	730	2208
			735	
25	ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	740	745	2256
			750	
30	tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Pro Gly Lys *	755	760	2295
35	<210> 39 <211> 764 <212> PRT <213> Secuencia Artificial			
40	<220> <223> Polipéptido de fusión zcytor17-Fc4 humano			
45	<400> 39 Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp 1 5 10 15 Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala 20 25 30 Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg 35 40 45 Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr			

60

65

ES 2 310 660 T3

	50	55	60
5	Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn		
	65	70	75
	Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe		80
	85	90	95
10	Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu		
	100	105	110
	Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg		
	115	120	125
15	Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys		
	130	135	140
	Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro		
	145	150	155
20	160		
	Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg		
	165	170	175
	Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg		
	180	185	190
25	Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr		
	195	200	205
	Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp		
	210	215	220
30	Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Ala Pro		
	225	230	235
	240		
	Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly		
	245	250	255
35	Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val		
	260	265	270
	Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn		
	275	280	285
40	Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu		
	290	295	300
	His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser		
45	305	310	315
	320		
	Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu		
	325	330	335
50	Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp		
	340	345	350
	Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp		
	355	360	365
55	Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser		
	370	375	380
	Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys		
	385	390	395
60	400		

ES 2 310 660 T3

ES 2 310 660 T3

<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC29157

<400> 40
10

ctagtatggc cggccatgaa gctctctccc cagc 34

15 <210> 41
<211> 41
<212> DNA
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC29150

25 <400> 41

gtctgaagat ctgggctcct caaagacact gaatgacaat g 41

30 <210> 42
<211> 21
<212> DNA
35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC41458

40 <400> 42

tggacctcgc actaaaaatca t 21
45

<210> 43
<211> 22
50 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC41457
55
<400> 43

60 aatcacggca gagttcccac ac 22

<210> 44
<211> 100
65 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

ES 2 310 660 T3

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC12749

5 <400> 44

10 gtaccttccc gtaaatccct ccccttcccg gaattacacc cgcgtatitc ccagaaaagg 60
 aactgttagat ttcttaggaat tcaatccttg gccacgcgtc 100

15 <210> 45
<211> 100
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC12748

20 <400> 45

25 tcgagacgctg tggccaagga ttgaattcct agaaatctac agttcccttt ctggaaata 60
 cgcgggtgtt attccggaa ggggaggat ttacggaaag 100

30 <210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC10651

35 <400> 46

40 agctttctg cagcagctct 20

45 <210> 47
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC10565

50 <400> 47

55 tttgcagaaa aggttgcaaa tgc 23

60 <210> 48
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC14063

ES 2 310 660 T3

5 **caccagacat aatacgctac agact** **25**
10 <210> 49
 <211> 21
10 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
15 <223> Cebador de oligonucleótido ZC17574
 <400> 49

20 **ggtrttgctc agcatgcaca c** **21**
25 <210> 50
 <211> 24
25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
30 <223> Cebador de oligonucleótido ZC17600
 <400> 50

35 **catgttaggcc atgagggtcca ccac** **24**
40 <210> 51
 <211> 21
40 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
45 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido ZC38065
 <400> 51
50 **ctttccctggg aatctgtgtc t** **21**
55 <210> 52
 <211> 18
55 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
60 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido ZC38068
 <400> 52
65 **cctccagctc tggtgctg** **18**

ES 2 310 660 T3

<210> 53
<211> 24
<212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC37877
10 <400> 53

caaaaaaccc aacaaattga ctca

24

15 <210> 54
<211> 25
<212> DNA
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC37876
25 <400> 54

catgtggcta tactactttc agcag

25

30 <210> 55
<211> 22
35 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sonda TaqMan® del receptor zcytor17
40 <400> 55

45 **ctgtgtggc ccaccgttcc ca**

22

50 <210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
55 <223> Cebador hacia delante de rRNA
<400> 56

60 **cggctaccac atccaaaggaa**

20

65 <210> 57
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

ES 2 310 660 T3

<220>
<223> Cebador reverso de rRNA

5 <400> 57

gctggaatta ccgcggct 18

10 <210> 58
<211> 22
<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sonda TaqMan® de rRNA

20 <400> 58

tgctggcacc agacttgccc tc 22

25 <210> 59
<220>
30 <223> Secuencia de Salto
<400> 59

000

35 <210> 60
<211> 21
<212> DNA

40 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC41458

45 <400> 60

tggacctcgc actaaaatca t 21

50 <210> 61
<211> 22

55 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC41457

60 <400> 61

aatcacggca gagttcccac ac 22

65 <210> 62

ES 2 310 660 T3

<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC41459

<400> 62
10
agaagggcgt gtcgtgtc 19

15 <210> 63
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC41460

<400> 63
25
ccggatggct gggctgtg 18

30 <210> 64
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
35 <220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC39982

<400> 64
40
aatgtctgtg tagcataagg tatga 25

45 <210> 65
<211> 22
<212> DNA
50 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC39983

55 <400> 65

cctgcctacc taaaaaccag aa 22

60 <210> 66
<211> 36
<212> DNA
65 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC39980

ES 2 310 660 T3

<400> 66

5 ttgaattcg ccaccatggc tctatttgca gtcttt 36
 <210> 67
 <211> 28
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido ZC39981
 15 <400> 67
 20 ctgtctcgag tgctggtag cagtgttc 28
 25 <210> 68
 <211> 2217
 30 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(2217)
 35 <400> 68
 40 atg gct cta ttt gca gtc ttt cag aca aca ttc ttc tta aca ttg ctg 48
 Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 tcc ttg agg act tac cag agt gaa gtc ttg gct gaa cgt tta cca ttg 96
 Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg Leu Pro Leu
 20 25 30
 45 act cct gta tca ctt aaa gtt tcc acc aat tct acg cgt cag agt ttg 14
 Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg Gln Ser Leu
 35 40 45
 50 cac tta caa tgg act gtc cac aac ctt cct tat cat cag gaa ttg aaa 19
 His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln Glu Leu Lys
 55 60
 55 atg gta ttt cag atc cag atc agt agg att gaa aca tcc aat gtc atc 24
 Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser Asn Val Ile
 65 70 75 80
 60 tgg gtg ggg aat tac agc acc act gtg aag tgg aac cag gtt ctg cat 28
 Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln Val Leu His

ES 2 310 660 T3

	85	90	95	
5				
	tgg agc tgg gaa tct gag ctc cct ttg gaa tgt gcc aca cac ttt gta			336
	Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr His Phe Val			
	100	105	110	
10				
	aga ata aag agt ttg gtg gac gat gcc aag ttc cct gag cca aat ttc			384
	Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu Pro Asn Phe			
	115	120	125	
15				
	tgg agc aac tgg agt tcc tgg gag gaa gtc agt gta caa gat tct act			432
	Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln Asp Ser Thr			
	130	135	140	
20				
	gga cag gat ata ttg ttc gtt ttc cct aaa gat aag ctg gtg gaa gaa			480
	Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu Val Glu Glu			
	145	150	155	160
25				
	ggc acc aat gtt acc att tgt tac gtt tct agg aac att caa aat aat			528
	Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile Gln Asn Asn			
	165	170	175	
30				
	gta tcc tgt tat ttg gaa ggg aaa cag att cat gga gaa caa ctt gat			576
	Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu Gln Leu Asp			
	180	185	190	
35				
	cca cat gta act gca ttc aac ttg aat agt gtg cct ttc att agg aat			624
	Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe Ile Arg Asn			
	195	200	205	
40				
	aaa ggg aca aat atc tat tgt gag gca agt caa gga aat gtc agt gaa			672
	Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn Val Ser Glu			
	210	215	220	
45				
	ggc atg aaa ggc atc gtt ctt ttt gtc tca aaa gta ctt gag gag ccc			720
	Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro			
	225	230	235	240
50				
	aag gac ttt tct tgt gaa acc gag gac ttc aag act ttg cac tgt act			768
	Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu His Cys Thr			
	245	250	255	
55				
	tgg gat cct ggg acg gac act gcc ttg ggg tgg tct aaa caa cct tcc			816
60				

ES 2 310 660 T3

	Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys Gln Pro Ser		
	260	265	270
5	caa agc tac act tta ttt gaa tca ttt tct ggg gaa aag aaa ctt tgt Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys Lys Leu Cys		864
	275	280	285
10	aca cac aaa aac tgg tgt aat tgg caa ata act caa gac tca caa gaa Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp Ser Gln Glu		912
	290	295	300
15	acc tat aac ttc aca ctc ata gct gaa aat tac tta agg aag aga agt Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg Lys Arg Ser		960
	305	310	315
20	gtc aat atc ctt ttt aac ctg act cat cga gtt tat tta atg aat cct Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu Met Asn Pro		1008
	325	330	335
25	ttt agt gtc aac ttt gaa aat gta aat gcc aca aat gcc atc atg acc Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile Met Thr		1056
	340	345	350
30	tgg aag gtg cac tcc ata agg aat aat ttc aca tat ttg tgt cag att Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys Gln Ile		1104
	355	360	365
35	gaa ctc cat ggt gaa gga aaa atg atg caa tac aat gtt tcc atc aag Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val Ser Ile Lys		1152
	370	375	380
40	gtg aac ggt gag tac ttc tta agt gaa ctg gaa cct gcc aca gag tac Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr		1200
	385	390	395
45	atg gcg cga gta cgg tgt gct gat gcc agc cac ttc tgg aaa tgg agt Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys Trp Ser		1248
	405	410	415
50	gaa tgg agt ggt cag aac ttc acc aca ctt gaa gct gct ccc tca gag Glu Trp Ser Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro Ser Glu		1296
	420	425	430
55			
60			

ES 2 310 660 T3

5	gcc cct gat gtc tgg aga att gtg agc ttg gag cca gga aat cat act	1344
	Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn His Thr	
	435 440 445	
10	gtg acc tta ttc tgg aag cca tta tca aaa ctg cat gcc aat gga aag	1392
	Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn Gly Lys	
	450 455 460	
15	atc ctg ttc tat aat gta gtt gta gaa aac cta gac aaa cca tcc agt	1440
	Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro Ser Ser	
	465 470 475 480	
20	tca gag ctc cat tcc att cca gca cca gcc aac agc aca aaa cta atc	1488
	Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile	
	485 490 495	
25	ctt gac agg tgt tcc tac caa atc tgc gtc ata gcc aac aac agt gtg	1536
	Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val	
	500 505 510	
30	ggt gct tct cct gct tct gta ata gtc atc tct gca gac ccc gaa aac	1584
	Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn	
	515 520 525	
35	aaa gag gtt gag gaa gaa aga att gca ggc aca gag ggt gga ttc tct	1632
	Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Gly Phe Ser	
	530 535 540	
40	ctg tct tgg aaa ccc caa cct gga gat gtt ata ggc tat gtt gtg gac	1680
	Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp	
	545 550 555 560	
45	tgg tgt gac cat acc cag gat gtg ctc ggt gat ttc cag tgg aag aat	1728
	Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn	
	565 570 575	
50	gta ggt ccc aat acc aca agc aca gtc att agc aca gat gct ttt agg	1776
	Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg	
	580 585 590	
55	cca gga gtt cga tat gac ttc aga att tat ggg tta tct aca aaa agg	1824
	Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg	
	595 600 605	

60

65

ES 2 310 660 T3

5	att gct tgt tta tta gag aaa aaa aca gga tac tct cag gaa ctt gct Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala 610 615 620	1872
10	cct tca gac aac cct cac gtg ctg gtg gat aca ttg aca tcc cac tcc Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser 625 630 635 640	1920
15	ttc act ctg agt tgg aaa gat tac tct act gaa tct caa cct ggt ttt Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe 645 650 655	1968
20	ata caa ggg tac cat gtc tat ctg aaa tcc aag gcg agg cag tgc cac Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His 660 665 670	2016
25	cca cga ttt gaa aag gca gtt ctt tca gat ggt tca gaa tgt tgc aaa Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys 675 680 685	2064
30	tac aaa att gac aac ccg gaa gaa aag gca ttg att gtg gac aac cta Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu 690 695 700	2112
35	aag cca gaa tcc ttc tat gag ttt ttc atc act cca ttc act agt gct Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala 705 710 715 720	2160
40	cac tcc tcg His Ser Ser	2217
45	<210> 69 <211> 739 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
50		
55		
60		
65		

ES 2 310 660 T3

<400> 69

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

ES 2 310 660 T3

	Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile Met Thr		
	340	345	350
5	Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys Gln Ile		
	355	360	365
	Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val Ser Ile Lys		
	370	375	380
10	Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr		
	385	390	395
	395	400	
	Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys Trp Ser		
	405	410	415
15	Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro Ser Glu		
	420	425	430
	Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn His Thr		
	435	440	445
20	Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn Gly Lys		
	450	455	460
	Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro Ser Ser		
25	465	470	475
	480		
	Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile		
	485	490	495
30	Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val		
	500	505	510
	Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn		
	515	520	525
35	Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Gly Phe Ser		
	530	535	540
	540		
	Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp		
	545	550	555
	560		
40	Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn		
	565	570	575
	575		
	Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg		
	580	585	590
45	Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg		
	595	600	605
	605		
	Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala		
	610	615	620
50	Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser		
	625	630	635
	640		
	Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe		
	645	650	655
55	Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His		
	660	665	670
	670		
60	Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys		

ES 2 310 660 T3

	675	680	685
	Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu		
5	690	695	700
	Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala		
	705	710	715
	Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu		
10	725	730	735
	His Ser Ser		

15 <210> 70
 <211> 1557
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1557)

25 <400> 70

	atg atg tgg acc tgg gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc	48
	Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe	
30	1 5 10 15	
	agc ctg gca gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac	96
	Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr	
35	20 25 30	
	tac tat agg aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc	144
	Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr	
40	35 40 45	
	agt tat acc cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa	192
	Ser Tyr Thr Glu Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys	
45	50 55 60	
	cat gat aat tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tcg	240
	His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser	
50	65 70 75 80	
	tgc tct ttt ttc ctt cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att	288
	Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile	
55		

60

65

ES 2 310 660 T3

	85	90	95	
5	gag gtg gaa gct gaa aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr 100 105 110			336
10	tac tgg aga tta gag aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe 115 120 125			384
15	cgt gtg aaa cca gtt ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp 130 135 140			432
20	ata aag cct gag ttg gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu 145 150 155 160			480
25	cga ttc agg aca gtc aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala 165 170 175			528
30	aag aac cgt aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag Lys Asn Arg Lys Asp Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln 180 185 190			576
35	cct ttt aca gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser 195 200 205			624
40	aag ttc tgg agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu 210 215 220			672
45	gaa gct cca tgt ggc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu 225 230 235 240			720
50	gcg gat gga aga agg cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga gga Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly 245 250 255			768
55	gcc cca gtc cta gag aaa aca ctt ggc tac aac ata tgg tac tat cca			816

60

65

ES 2 310 660 T3

	Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro		
	260	265	270
5	gaa agc aac act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag cag		864
	Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln		
	275	280	285
10	ctt gaa ctg cat ctg gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att tct		912
	Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser		
	290	295	300
15	tat aat tct ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca gct		960
	Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala		
	305	310	315
20	att caa gaa aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc gtt		1008
	Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val		
	325	330	335
25	gct gag gac cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac gtg		1056
	Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val		
	340	345	350
30	aac act tgg atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc acc		1104
	Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr		
	355	360	365
35	acc ctt tcc tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag		1152
	Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln		
	370	375	380
40	caa gat aaa tta aaa cct ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca		1200
	Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro		
	385	390	395
45	atg ttg cat gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc		1248
	Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala		
	405	410	415
50	aaa gaa ggc gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac att		1296
	Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile		
	420	425	430
55			
60			

ES 2 310 660 T3

ggc gtg aag acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt gag 1344
 Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu
 435 440 445
 5
 aga aag ggt atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa ggt 1392
 Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly
 450 455 460
 10
 gga aaa gga ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac ggc 1440
 Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly
 465 470 475 480
 15
 ctg gag tcc ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc 1488
 Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala
 485 490 495
 20
 agc acc agt gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca 1536
 Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr
 500 505 510
 25
 ttg tca ttc agt gtc ttt gag 1557
 Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu
 515
 30
 <210> 71
 <211> 519
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 71
 40
 Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe
 1 5 10 15
 Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr
 20 25 30
 45 Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr
 35 40 45
 Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys
 50 55 60
 His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser
 65 70 75 80
 50 Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile
 85 90 95

ES 2 310 660 T3

	Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr		
	100	105	110
5	Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe		
	115	120	125
	Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp		
	130	135	140
10	Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu		
	145	150	155
	Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala		
	165	170	175
15	Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln		
	180	185	190
20	Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser		
	195	200	205
	Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu		
	210	215	220
25	Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu		
	225	230	235
	Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly		
	245	250	255
30	Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro		
	260	265	270
	Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln		
	275	280	285
35	Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser		
	290	295	300
	Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala		
	305	310	315
40	Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val		
	325	330	335
	Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val		
	340	345	350
45	Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr		
	355	360	365
	Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln		
	370	375	380
50	Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro		
	385	390	395
	Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala		
	405	410	415
55	Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile		
	420	425	430
60	Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu		

ES 2 310 660 T3

435 440 445
Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly
450 455 460
5 Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly
465 470 475 480
10 Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala
485 490 495
Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr
500 505 510
15 Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu
515

20 <210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> Señal peptídica C-Terminal de His

<400> 72

30 Gly Ser Gly Gly His His His His His His
1 5 10

35 <210> 73
<211> 12
<212> PRT
40 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Espaciador Gly-Ser de 12 aminoácidos
45 <400> 73

50 Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Pro Arg Ser
1 5 10

55 <210> 74
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
60 <223> Cebador de oligonucleótido ZC41557
<400> 74

65 ttatagatct cgaggagtgt tcatccggag t 31

<210> 75

ES 2 310 660 T3

<211> 65

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC29232

<400> 75

10

cgactg~~a~~tc gagtcagtga tggtgatgg tggccacc tgccttta cccggagaca 60
ggag 65

15

<210> 76

<211> 3196

<212> DNA

20 <213> *Mus musculus*

<400> 76

25

tgtatgtctg cacagttgt gtatgcctgg tgcccacaga ggctcgagag tgcagattc 60
cccccaaaac tggagttaca gtttgagcc gccccatgtc tgatagcaat caaacctggg 120
tccctctaaaa gggcatccag tgcgtgtacactgaacca tctctccaaa ccatgaacat 180
cacttaatt ttttttaata gtaaaaggat attttatttc taaagatgtaa aagaacgtc 240
tcacctattt taaaaatttg taataaatgt ttcttcaag cttaaaaaaaaa ttatgtcagg 300
ttttttttt ttttcgtca gtgatgtct aagctgccc aactggctt gaatttgta 360
ccctcttgc tcagcatact gagggttaag attacaatgt cacccttac ccagttccca 420
taatttaactg atccacccccc acccccatcc caccctactc ccattgcctg ggcaagtaac 480
tcttggccc cattctgggt ctaggtctg aagtcacaaa ggtgcaggtg agaacgtcaag 540
gacaaggggca ggccctggag cacagatgcc ttctccttat gcctccctg tggacttag 600
agccatcccc ctgcctccgg aattccccaca gatggatcgc tctgtggctt cttaaaactt 660
ccctgcaggg cactgaccct cagccctct aagtcacttc ttccccagtg attgtacttt 720
tcaatcgggc ttcaaaacttt cctctcatta aatc~~a~~caag cacttccaa gaaaagagag 780
atgctcaaga tgccttcctg tggatgtgt gtatgcgttt gtgtgtgc acgcgtgtgt 840
gtgcgtgtga ctcaatcttc tgccttgctt tgaggtaac ctcagcattt cctccagcc 900
ctgctttccc caggccgagc cgaggctggc aaccttttga aaatgttttc tggagaaaag 960
ctgagcaatg gtttgccat gggcgggcct ttgatctgtt tcctcatgac aaccctttat 1020
atattgcctg gtggccatgg cgaacacacc aggctccaga gaccacaggc aaagcgggccc 1080

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

5	ttcctcaactc tc ttaccgtc gccatgatct tccacacagg taccgctggc tccacacgca 1140 gctcagcatg gcttcagctc catggctctt atcatgttag gggaggagc cgggaatggc 1200 tgccctcggt ggttgctgga cagaggctgt tgtaactgaa gctggatgg gcaggggcat 1260 ctgacccatc agctccatgg tatcccttctt tttctccagg aacaacgaaag cctaccctgg 1320 tgctgcttg ctgtatagga acctggctgg ccacctgcag cttgtccctc ggtgccccaa 1380 tatcgaagga agacttaaga actacaattt accttctgaa acaagagtct caggatcttt 1440 ataacaacta tgtaagtgcc cttgagattt tttttctta accatttctt taaaatgtct 1500 tattttgcta tctaagcaca gctatccctt ctcgatataa agccagctat ggaagccaga 1560 gaggcatggg gaaacattgg aattcgggtt ggggtgaaatg tttccaagggg ggttaatgca 1620 ctagcagaag aggccagggc agactggtcc agggactgaa accttggcag cttacgaaac 1680 actacaggat gtatgctccc tgaattcttt atctcaaaatc caccggctc acagtcccta 1740 ctaaacgagc attcttgctg aaaggcattc cttagagaag ggccagctt attcaggaat 1800 cccccaagag caatgagagc cagttcagc agccaaagat gtcctagtg aagcagggtg 1860 tgaggatctt cctttgggtc tccgttgact aactaggca ctgtctgtgt gttcttgag 1920 20 catccctggag ggccctctgc ctggccagag cctggcacag gtacagcaca ggaccaggaa 1980 agtgtgaata cttcattttcc ttgggaccgc tttagataact tcagttgaag caagtaacag 2040 ggaactgtat ggagacacag ataacccccc tgccctctc acttcagtc ctgagccctcc 2100 gagaacaggt tgcagatggc tagggcagc ctcagccaga taggcggagg cagactgggt 2160 agaagcatcc ttaggaacca cggccaaacct gggtgggtat gccatgtctt ctagtcata 2220 25 agccaacttag accttcgatt cctgtagaca cagagttgt gatggccaa gcttcagaag 2280 gttgggtatc caatttagata aggtctgagg caggctagac acagaggaag ccctggaaat 2340 gagctgttct gagctgttagg gttgttacaa atgtcttctt tacaatattt caaacctctt 2400 ctttctacag agcataaaagc aggcatctgg gatgtcagca gacgaatcaa tacagctgcc 2460 gttttcagc ctggaccggg agcattaaac caacatctcg gtcatcatag cacatctgga 2520 30 gaaagtcaaa gtgttgagcg agaacacagt agatacttct tgggtgataa gatggctaac 2580 aaacatcagc tggttcaacc cactgaattt aaacatttct gtgcctgaa atactgtat 2640 atcctatgt tgtaaaagtgt tcgtgttac ggttttaaag cagttctaa actgcattggc 2700 agaactgcag gctaaggaca atactacatg ctgagtgatg gggggggggg ggtgcagtgt 2760 cctcagcagt gcctgtccctt cgagggtcga gcttgcaccc caggactaa ctccaaaggaa 2820 actgtcggt cattactagt catgttattt atgtttttat tttgtccact gaaatcttgt 2880 40 tctgttaccc tggaggact ggaagtggca gctatatttta ttatattatg tactgagttt 2940 gttaacgcctc catggaggag cttcagagt ctatattaa aattatattt acatgatcac 3000 ataatcgtt ttggaaattt tgatgggtt gaaatcaaag attaggaatg ttctggaaat 3060 agtttatgtt accctctccc tccattagac agactcatga gcaaataatc ccagcagcat 3120 45 cacgtcatg ataaaacatct ttgttccagg tcataagtac aatcactgtc cttttggat 3180 gtaggctgga aactaa 3196
---	---

<210> 77
 50 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Cebador de oligonucleótido ZC28575

<400> 77
 60 ccaggaaagg aaaccaggta tacc

24

65 <210> 78
 <211> 23
 <212> DNA

ES 2 310 660 T3

ES 2 310 660 T3

5	gcagggttgg gaacggtgg	19
10	<210> 83 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220>	
15	<223> Cebador de oligonucleótido ZC28917 <400> 83	
20	tgcaagatgc tggaattgac	20
25	<210> 84 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220>	
30	<223> Cebador de oligonucleótido ZC28916 <400> 84	
35	agtcaattcc agcatcttgc	20
40	<210> 85 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220>	
45	<223> Cebador de oligonucleótido ZC28918 <400> 85	
50	tcacagagtc atcagactcc	20
55	<210> 86 <211> 18 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220>	
60	<223> Cebador de oligonucleótido ZC41498 <400> 86	
65	ggctccagag accacagg	18

ES 2 310 660 T3

<210> 87
<211> 22
<212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC41496
10 <400> 87

atgactagta atgaccgcac ag 22

15 <210> 88
<211> 39
<212> DNA
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC41583
25 <400> 88

cgtacgggcc ggccaccatg atttccaca caggaacaa 39

30 <210> 89
<211> 36
35 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC41584
40 <400> 89

tgacgaggcg cgcctcagca ttagtattg tcctta 36

45 <210> 90
<211> 650
50 <212> DNA
<213> *Mus musculus*
<220>
55 <221> CDS
<222> (53)...(542)

60

65

ES 2 310 660 T3

<400> 90

5	ggctccagag accacaggca aagcgggcct tcctactct cttaccgtcg cc atg atc 58			
		Met Ile		
		1		
10	ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc tgt ata 106			
	Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys Cys Ile			
	5	10	15	
15	gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca ata tcg 154			
	Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro Ile Ser			
	20	25	30	
20	aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag tct cag 202			
	Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu Ser Gln			
	35	40	45	50
25	gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg tca gca 250			
	Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met Ser Ala			
	55	60	65	
30	gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa gca tta 298			
	Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu Ala Leu			
	70	75	80	
35	acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa gtg ttg 346			
	Thr Asn Ile Ser Val Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys Val Leu			
	85	90	95	
40	agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta aca aac 394			
	Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu Thr Asn			
	100	105	110	
45	atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct gga aat 442			
	Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro Gly Asn			
	115	120	125	130
50	act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt tta aag 490			
	Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val Leu Lys			
	135	140	145	
55	cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat act aca 538			
	Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn Thr Thr			
	150	155	160	
60	tgc t gagtgatggg ggggggtgc agtgtccctca gcagtgcctg tccttcgagg 592			
	Cys			
65	gctgagcttg caacccagga cttaactcca aaggactgt gcggtcatta ctatgtcat 650			

ES 2 310 660 T3

<210> 91

<211> 163

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 91

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

30 Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu
 100 105 110
 Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro
 35 115 120 125
 Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val
 130 135 140
 Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn
 40 145 150 155 160
 Thr Thr Cys

45 <210> 92

<211> 511

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Secuencia clonada de cDNA de múrido (SEQ ID NO: 90) con lugares de restricción FseI y AscI y una secuencia Kozak parcial para el marco de lectura abierto mecytor17lig y el codón de terminación

55 <400> 92

ggccggccac catgatcttc cacacagaa caacgaagcc taccctggtg ctgcttgct 60
 gtataggaac ctggctggcc acctgcagct tgccttcgg tgcccaata tcgaaggaag 120
 acttaagaac tacaattgc ctctgaaac aagagtctca ggatctttat aacaactata 180
 gcataaaagca ggcatctggg atgtcagcag acgaatcaat acagctgccg tggccatgg 240
 tggacccggga agcattaacc aacatctcggt tcatacatgc acatctggag aaagtcaaag 300
 tggatggcga gaacacagta gatacttctt gggtgataag atggctaaaca aacatcagct 360
 gtttcaaccc actgaattta aacatttctg tgcctggaaa tactgatgaa tcctatgatt 420
 gtaaaagtgtt cgtgcttacg gttttaaagc agttctcaaa ctgcatggca gaactgcagg 480
 ctaaggacaa tactacatgc tgaggcgcc 511

ES 2 310 660 T3

<210> 93
<211> 21
<212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC41438
10 <400> 93

gccatggcct ctcactcagg c

21

15
<210> 94
<211> 24
<212> DNA
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC41437
25 <400> 94

ccagggagca ttgacaactc ttag

24

30
<210> 95
<211> 516
35 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
40 <223> Polinucleótido zCytor17Lig-CEE humano
<221> CDS
<222> (1)...(516)

45

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

<400> 95

	atg	gcc	tct	cac	tca	ggc	ccc	tcg	acg	tct	gtg	ctc	ttt	ctg	ttc	tgc	48
5	Met	Ala	Ser	His	Ser	Gly	Pro	Ser	Thr	Ser	Val	Leu	Phe	Leu	Phe	Cys	
	1			5					10					15			
	tgc	ctg	gga	ggc	tgg	ctg	gcc	tcc	cac	acg	ttg	ccc	gtc	cgt	tta	cta	96
10	Cys	Leu	Gly	Gly	Trp	Leu	Ala	Ser	His	Thr	Leu	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	
		20				25					30						
	cga	cca	agt	gat	gat	gta	cag	aaa	ata	gtc	gag	gaa	tta	cag	tcc	ctc	144
15	Arg	Pro	Ser	Asp	Asp	Asp	Val	Gln	Lys	Ile	Val	Glu	Glu	Leu	Gln	Ser	Leu
		35				40					45						
	tcg	aag	atg	ctt	ttg	aaa	gat	gtg	gag	gaa	gag	aag	ggc	gtg	ctc	gtg	192
20	Ser	Lys	Met	Leu	Leu	Lys	Asp	Val	Glu	Glu	Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Val	
		50			55				60								
	tcc	cag	aat	tac	acg	ctg	ccg	tgt	ctc	agc	cct	gac	gcc	cag	ccg	cca	240
25	Ser	Gln	Asn	Tyr	Thr	Leu	Pro	Cys	Leu	Ser	Pro	Asp	Ala	Gln	Pro	Pro	
		65			70					75				80			
	aac	aac	atc	cac	agc	cca	gcc	atc	cg	gca	tat	ctc	aag	aca	atc	aga	288
30	Asn	Asn	Ile	His	Ser	Pro	Ala	Ile	Arg	Ala	Tyr	Leu	Lys	Thr	Ile	Arg	
		85			90					95							
	cag	cta	gac	aac	aaa	tct	gtt	att	gat	gag	atc	ata	gag	cac	ctc	gac	336
35	Gln	Leu	Asp	Asn	Lys	Ser	Val	Ile	Asp	Glu	Ile	Ile	Glu	His	Leu	Asp	
		100			105					110							
	aaa	ctc	ata	ttt	caa	gat	gca	cca	gaa	aca	aac	att	tct	gtg	cca	aca	384
40	Lys	Leu	Ile	Phe	Gln	Asp	Ala	Pro	Glu	Thr	Asn	Ile	Ser	Val	Pro	Thr	
		115			120					125							
	gac	acc	cat	gaa	tgt	aaa	cgc	ttc	atc	ctg	act	att	tct	caa	cag	ttt	432
45	Asp	Thr	His	Glu	Cys	Lys	Arg	Phe	Ile	Leu	Thr	Ile	Ser	Gln	Gln	Phe	
		130			135					140							
	tca	gag	tgc	atg	gac	ctc	gca	cta	aaa	tca	ttg	acc	tct	gga	gcc	caa	480
50	Ser	Glu	Cys	Met	Asp	Leu	Ala	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr	Ser	Gly	Ala	Gln	
		145			150					155				160			
	· cag	gcc	acc	act	gaa	gaa	tac	atg	ccg	atg	gaa	taa					516
55	Gln	Ala	Thr	Thr	Glu	Glu	Tyr	Met	Pro	Met	Glu	*					
		165			170												
60	<210> 96																
	<211> 171																
	<212> PRT																
65	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
	<223> Polipéptido zCytor17Lig-CEE humano																

ES 2 310 660 T3

<400> 96

Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys
 1 5 10 15
 Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu
 20 25 30
 Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu
 35 40 45
 Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu Glu Lys Gly Val Leu Val

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

35 <210> 97

<211> 49

<212> DNA

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZCZC41607

45 <400> 97

tccagggaaat tcatataggc cggccaccat ggcctctcac tcagggcccc 49

50

<210> 98

<211> 82

55 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZCZC41605

60

<400> 98

caaccccaaga gctgttttaa ggccgcgcctc tagattatta ttccatggc atgtattctt 60
cagtggtggc ctgttggct cc 82

ES 2 310 660 T3

<210> 99
 <211> 629
 <212> DNA
 5 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> CDS
 10 <222> (28)...(528)
 <400> 99

15	aacccttgg aggaccagaa cgagaca atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc 54			
	Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser			
	1	5		
20	atc cac acc atg ctg ctc ctg ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc 102			
	Ile His Thr Met Leu Leu Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu			
	10	15	20	25
25	caa gct tca atc aat ggc cgg gat acc cac cgt tta acc aag acg ttg 150			
	Gln Ala Ser Ile Ser Gly Arg Asp Thr His Arg Leu Thr Arg Thr Leu			
	30	35	40	
30	aat tgc agc tct att gtc aag gag att ata ggg aag ctc cca gaa cct 198			
	Asn Cys Ser Ser Ile Val Lys Glu Ile Ile Gly Lys Leu Pro Glu Pro			
	45	50	55	
35	gaa ctc aaa act gat gat gaa gga ccc tct ctg agg aat aag aac ttt 246			
	Glu Leu Lys Thr Asp Asp Glu Gly Pro Ser Leu Arg Asn Lys Ser Phe			
	60	65	70	
40	cgg aga gta aac ctg tcc aaa ttc gtg gaa agc caa gga gaa gtg gat 294			
	Arg Arg Val Asn Leu Ser Lys Phe Val Glu Ser Gln Gly Glu Val Asp			
	75	80	85	
45	cct gag gac aga tac gtt atc aag tcc aat ctt cag aaa ctt aac tgt 342			
	Pro Glu Asp Arg Tyr Val Ile Lys Ser Asn Leu Gln Lys Leu Asn Cys			
	90	95	100	105
50	tgc ctg cct aca tct gcg aat gac tct gcg ctg cca ggg gtc ttc att 390			
	Cys Leu Pro Thr Ser Ala Asn Asp Ser Ala Leu Pro Gly Val Phe Ile			
	110	115	120	
55	cga gat ctg gat gac ttt cgg aag aaa ctg aga ttc tac atg gtc cac 438			
	Arg Asp Leu Asp Asp Phe Arg Lys Lys Leu Arg Phe Tyr Met Val His			
	125	130	135	

60

ES 2 310 660 T3

5	ctt aac gat ctg gag aca gtg cta acc tct aga cca cct cag ccc gca Leu Asn Asp Leu Glu Thr Val Leu Thr Ser Arg Pro Pro Gln Pro Ala 140 145 150	486
10	tct ggc tcc gtc tct cct aac cgt gga acc gtg gaa tgt taa Ser Gly Ser Val Ser Pro Asn Arg Gly Thr Val Glu Cys * 155 160 165	528
15	aacagcaggc agagcaccta aagtctgaat gttcctcatg gcccatggtc aaaaggattt tacattccctt tatgccatca aatgtcttat caatttatct a	588 629
20	<210> 100 <211> 166 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>	
25	<400> 100	
30	Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu 1 5 10 15 Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Gly Arg 20 25 30	
35	Asp Thr His Arg Leu Thr Arg Thr Leu Asn Cys Ser Ser Ile Val Lys 35 40 45	
40	Glu Ile Ile Gly Lys Leu Pro Glu Pro Glu Leu Lys Thr Asp Asp Glu 50 55 60 Gly Pro Ser Leu Arg Asn Lys Ser Phe Arg Arg Val Asn Leu Ser Lys 65 70 75 80 Phe Val Glu Ser Gln Gly Glu Val Asp Pro Glu Asp Arg Tyr Val Ile 85 90 95	
45	Lys Ser Asn Leu Gln Lys Leu Asn Cys Cys Leu Pro Thr Ser Ala Asn 100 105 110	
50	Asp Ser Ala Leu Pro Gly Val Phe Ile Arg Asp Leu Asp Asp Phe Arg 115 120 125 Lys Lys Leu Arg Phe Tyr Met Val His Leu Asn Asp Leu Glu Thr Val 130 135 140	
55	Leu Thr Ser Arg Pro Pro Gln Pro Ala Ser Gly Ser Val Ser Pro Asn 145 150 155 160 Arg Gly Thr Val Glu Cys 165	
60	<210> 101 <211> 674 <212> DNA <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<220> <221> CDS <222> (10)...(464)	

ES 2 310 660 T3

<400> 101

5	gatccaaac atg aac cgc ctg ccc gtc ctg ctc ctg ctc caa ctc ctg gtc 51 Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val 1 5 10
10	cgc ccc gga ctc caa gct ccc atg acc cag aca acg tcc ttg aag aca 99 Arg Pro Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Ser Leu Lys Thr 15 20 25 30
15	agc tgg gtt aac tgc tct aac atg atc gat gaa att ata aca cac tta 147 Ser Trp Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu 35 40 45
20	aag cag cca cct ttg cct ttg ctg gac ttc aac aac ctc aat ggg gaa 195 Lys Gln Pro Pro Leu Pro Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu 50 55 60
25	gac caa gac att ctg atg gaa aat aac ctt cga agg cca aac ctg gag 243 Asp Gln Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu 65 70 75
30	gca ttc aac agg gct gtc aag agt tta cag aac gca tca gca att gag 291 Ala Phe Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu 80 85 90
35	agc att ctt aaa aat ctc ctg cca tgt ctg ccc ctg gcc acg gcc gca 339 Ser Ile Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Ala Thr Ala Ala 95 100 105 110
40	ccc acg cga cat cca atc cat atc aag gac ggt gac tgg aat gaa ttc 387 Pro Thr Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe 115 120 125
45	cgg agg aaa ctg acg ttc tat ctg aaa acc ctt gag aat gcg cag gct 435 Arg Arg Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala 130 135 140
50	caa cag acg act ttg agc ctc gcg atc tt ttagtccaaac gtccagctcg 484 Gln Gln Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile 145 150
55	ttctctgggc cttctcacca cagcgccctcg ggacatcaa aacagcagaa cttctgaaac 544 ctctgggtca tctctcacac attccaggac cagaaggcatt tcaccctttc ctgcggcatc 604 agatgaattg ttaattatct aatitctgaa atgtgcagct cccatttggc cttgtgcgggt 664 tgtgttctca 674
60	

<210> 102

<211> 151

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 310 660 T3

<400> 102

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

<210> 103

<211> 7

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

2203

40 <223> Señal peptídica alternativa Glu-Glu (CEE) sin par resto Gly-Ser

<400> 103

45 Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5

50 <210> 104

<211> 513

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Polinucleótido zCytor17Lig(m)-CEE de ratón

<221> CDS

<222> (1)...(513)

ES 2 310 660 T3

<400> 104

5	atg atc ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys 1 5 10 15	48
10	tgt ata gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro 20 25 30	96
15	ata tcg aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu 35 40 45	144
20	tct cag gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met 50 55 60	192
25	tca gca gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu 65 70 75 80	240
30	gca tta acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys 85 90 95	288
35	gtg ttg agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu 100 105 110	336
40	aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro 115 120 125	384
45	gga aat act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val 130 135 140	432
50	tta aag cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn 145 150 155 160	480
55	act aca tgc gaa gaa tac atg ccg atg gaa tga Thr Thr Cys Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu *	513
60	<210> 105 <211> 170 <212> PRT	
65	<213> Secuencia Artificial <220> <223> Polipéptido zCytor17Lig(m)-CEE de ratón	

ES 2 310 660 T3

<400> 105

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

<210> 106

40 <211> 49

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Cebador de oligonucleótido ZC41643

<400> 106

50 tccagggaat tcatataggc cggccaccat gatcttccac acaggaaca 49

<210> 107

55 <211> 85

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC41641

ES 2 310 660 T3

<400> 107

5 **caaccccaga gctgttttaa ggcgccgc** tagattatca ttccatcg 60
 cgcatgtagt attgtcctta gcctg 85

<210> 108

10 <211> 19

 <212> DNA

 <213> Secuencia Artificial

 <220>

15 <223> Cebador de oligonucleótido ZC38,239

<400> 108

20

gccgactaag ccagagaac

19

<210> 109

25 <211> 20

 <212> DNA

 <213> Secuencia Artificial

30 <220>

 <223> Cebador de oligonucleótido ZC38.245

<400> 109

35

ctgttgacag ttctgaaccg

20

40 <210> 110

 <211> 20

 <212> DNA

 <213> Secuencia Artificial

45 <220>

 <223> Cebador de oligonucleótido ZC38,238

<400> 110

50

cgcggttcc attgtatctg

20

55 <210> 111

 <211> 2748

 <212> DNA

 <213> *Mus musculus*

60 <220>

 <221> CDS

 <222> (237)...(2222)

65

ES 2 310 660 T3

<400> 111

5	gatggggccc tgaatgttga tctgacagaaa ttccagacca acctgggtgt tatttcctt 60 ttcatcttgtt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaagggtct gctgtccggg 120 ctctcagaga aggcagtgtt ggaggcggtt ctggcccccggg tctcctccta ctgttcctgg 180 tagcccagcc ttctcggggtt ggaaggagaaa gctggccagg tgagcttga ggaagc atg 239 Met 1
10	
15	ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac 287 Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His 5 10 15
20	gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg 335 Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu 20 25 30
25	tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act 383 Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr 35 40 45
30	aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act 431 Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Thr 50 55 60 65
35	tgc act tgg aga cca gag aag gaa acc aat gat acc agc tac att gtg 479 Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Val 70 75 80
40	act ttg act tac tcc tat gga aaa agc aat tat agt gac aat gct aca 527 Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala Thr 85 90 95
45	gag gct tca tat tct ttt ccc cgt tcc tgt gca atg ccc cca gac atc 575 Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp Ile 100 105 110
50	tgc agt gtt gaa gta caa gct caa aat gga gat ggt aaa gtt aaa tct 623 Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys Ser 115 120 125
55	gac atc aca tat tgg cat tta atc tcc ata gca aaa acc gaa cca cct 671 Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro 130 135 140 145
60	ata att tta agt gtg aat cca att tgt aat aga atg ttc cag ata caa 719 Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile Gln 150 155 160
65	tgg aaa ccg cgt gaa aag act cgt ggg ttt cct tta gta tgc atg ctt 767 Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met Leu 165 170 175

ES 2 310 660 T3

5	cggttcagaactgtcaacagtacgcggacgaaat	ttt	gaa	815
	Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu			
	180	185	190	
10	aactgtaaa	cag	gtc	863
	tgc	aac	ctc	
	aca	gga	ctt	
	cag	gct	ttc	
	aca	gaa		
	Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr Glu			
	195	200	205	
15	tatgtcctg	gct	cta	911
	cga	ttc	agg	
	ttc	aat	gac	
	tca	aga	tat	
	tgg	agg	tgg	
	arg	ttc	aat	
	tyr	val	gac	
	leu	ala	ala	
	leu	arg	phe	
	arg	phe	asp	
	asp	ser	arg	
	ser	arg	tyr	
	trp	ser	trp	
	210	215	220	225
20	aagtgg	agc	aaa	959
	gaa	gaa	acc	
	aga	gtg	act	
	atg	gag	gaa	
	gtt	cca	cat	
	lys	trp	ser	
	lys	glu	glu	
	thr	arg	val	
	arg	val	thr	
	230	235	240	
25	gtcctg	gac	ctg	1007
	tgg	aga	att	
	ctg	gaa	cca	
	gca	gac	atg	
	aac	gga	gac	
	val	leu	asp	
	asp	leu	trp	
	trp	arg	ile	
	arg	ile	leu	
	glu	pro	ala	
	pro	ala	asp	
	asp	met	asn	
	met	asn	gly	
	245	250	255	
30	agg	aag	gtg	1055
	cga	ttg	ctg	
	tgg	aag	aag	
	gca	aga	gga	
	gcc	gcc	ccc	
	gtc	ttg		
	arg	lys	val	
	lys	arg	leu	
	leu	trp	lys	
	lys	lys	ala	
	ala	arg	gly	
	arg	ala	pro	
	ala	pro	val	
	260	265	270	
35	gag	aaa	aca	1103
	ttt	ggc	tac	
	cac	ata	cag	
	cac	cac	tac	
	ttt	gca	gag	
	gac	aac	act	
	act	acc	acc	
	cag	cag	cag	
	tat	gaa	ctg	
	gaa	ctt		
	asn	leu	thr	
	glu	ile	asn	
	ile	asn	ile	
	thr	thr	thr	
	gln	gln	gln	
	gln	tyr	glu	
	tyr	glu	leu	
	275	280	285	
40	aac	ctc	aca	1151
	gag	ata	aac	
	aac	aac	atc	
	atc	acc	acc	
	acc	cag	cag	
	cag	cag	tat	
	tat	gaa	ctg	
	gaa	ctt		
	asn	leu	thr	
	thr	glu	ile	
	ile	asn	ile	
	asn	ile	thr	
	ile	thr	gln	
	thr	gln	gln	
	gln	gln	tyr	
	tyr	glu	leu	
	290	295	300	305
45	ctgtat	agc	cag	1199
	gca	cac	tct	
	tcc	gtg	act	
	gtg	tct	ttt	
	act	tct	aat	
	tct	tct	tct	
	310	315	320	
50	ggcaag	tcc	caa	1247
	gag	acc	atc	
	atc	ctg	agg	
	agg	atc	cca	
	atc	cca	gat	
	gat	gtc	cat	
	cat	gag	aag	
	gag	gac	gly	
	gly	lys	ser	
	lys	glu	thr	
	thr	ile	leu	
	ile	arg	ile	
	arg	ile	pro	
	ile	pro	asp	
	pro	asp	val	
	asp	val	his	
	val	his	glu	
	his	glu	lys	
	glu	lys		
	325	330	335	
55	acc	ttc	cag	1295
	cag	tac	att	
	att	aag	agc	
	aag	agc	atg	
	atg	cag	tac	
	cag	gcc	ata	
	gcc	gac	gac	
	gac	ccc	ctg	
	ccc	ctg		
	ctg			
	thr	phe	gln	
	phe	gln	tyr	
	gln	tyr	ile	
	tyr	ile	lys	
	ile	lys	ser	
	lys	ser	met	
	met	gln	ala	
	gln	ala	tyr	
	ala	tyr	ile	
	tyr	ile	glu	
	ile	glu	pro	
	glu	pro	leu	
60	65			

ES 2 310 660 T3

	340	345	350	
5	ttg gtg gtg aac tgg caa agc tcc att cct gcg gtg gac act tgg ata Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp Ile 355 360 365			1343
10	gtg gag tgg ctc cca gaa gct gcc atg tcg aag ttc cct gcc ctt tcc Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu Ser 370 375 380 385			1391
15	tgg gaa tct gtg tct cag gtc acg aac tgg acc atc gag caa gat aaa Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp Lys 390 395 400			1439
20	cta aaa cct ttc aca tgc tat aat ata tca gtg tat cca gtg ttg gga Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu Gly 405 410 415			1487
25	cac cga gtt gga gag ccg tat tca atc caa gct tat gcc aaa gaa gga His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly 420 425 430			1535
30	act cca tta aaa ggt cct gag acc agg gtg gag aac atc ggt ctg agg Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu Arg 435 440 445			1583
35	aca gcc acg atc aca tgg aag gag att cct aag agt gct agg aat gga Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn Gly 450 455 460 465			1631
40	ttt atc aac aat tac act gta ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gaa Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Glu 470 475 480			1679
45	ctc tcc aag act gtt aac tct cat gcc ctg cag tgt gac ctg gag tct Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu Ser 485 490 495			1727
50	ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg 500 505 510			1775
55	gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc			1823

60

65

ES 2 310 660 T3

	Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile		
515	520	525	
5	agt gtg ttt gaa att gtc ctt cta aca tct cta gtt gga gga ggc ctt		1871
	Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Leu		
530	535	540	545
10	ctt cta ctt agc atc aaa aca gtg act ttt ggc ctc aga aag cca aac		1919
	Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro Asn		
	550	555	560
15	cgg ttg act ccc ctg tgt tgt cct gat gtt ccc aac cct gct gaa agt		1967
	Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser		
	565	570	575
20	agt tta gcc aca tgg ctc gga gat ggt ttc aag aag tca aat atg aag		2015
	Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met Lys		
	580	585	590
25	gag act gga aac tct ggg aac aca gaa gac gtg gtc cta aaa cca tgt		2063
	Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro Cys		
	595	600	605
30	ccc gtc ccc gcg gat ctc att gac aag ctg gta gtg aac ttt gag aat		2111
	Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Asn		
	610	615	620
35	ttt ctg gaa gta gtt ttg aca gag gaa gct gga aag ggt cag gcg agc		2159
	Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala Ser		
	630	635	640
40	att ttg gga gga gaa gcg aat gag tat atc tta tcc cag gaa cca agc		2207
	Ile Leu Gly Gly Ala Asn Glu Tyr Ile Leu Ser Gln Glu Pro Ser		
	645	650	655
45	tgt cct ggc cat tgc tgaagctacc ctcagggtcc aggacagctg tcttggc		2262
	Cys Pro Gly His Cys		
	660		
50	acttgactct ggcaggAACC tgcgtctac ttttcttc cctgtctccg gacactttct		2322
	ctcccttcatg cagagaccag gacttagagcg gattcctcat ggtttccag gctcctca		2382
	ccttgctccg gctcaggatc ttcaacaatg cccttctgg gacactccat catccactta		2442
	tatattttttt ttgcaacatt gtggattgaa cccaggact tgttatgcg cgcaacttca		2502
55	gttaactgtgg cagagactta ggaatggaga tctgaccctt tgcagaaggt ttctggacat		2562
	ccgtccctgt gtgagctca gacagcattg tcttacttt gaatcagttt ccaagttat		2622
	aaaagaaaaa cagagaggtg gcataacagc tcctgcttc tgacctgctt gagttccagt		2682
60	tctgacttcc tttggtgatg aacagcaatg tggaaagtgt aagctgaata aacccttcc		2742
	tcccca		2748
	.		
	<210> 112		
65	<211> 662		
	<212> PRT		
	<213> <i>Mus musculus</i>		

ES 2 310 660 T3

<400> 112

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

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

	245	250	255
5	Asp Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val		
	260	265	270
	Leu Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser		
	275	280	285
10	Thr Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu		
	290	295	300
	Leu Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser		
	305	310	315
15	Leu Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu		
	325	330	335
	Lys Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro		
	340	345	350
20	Leu Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp		
	355	360	365
	Ile Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu		
	370	375	380
25	Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp		
	385	390	395
	Lys Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu		
	405	410	415
30	Gly His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu		
	420	425	430
	Gly Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu		
	435	440	445
35	Arg Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn		
	450	455	460
	Gly Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys		
40	465	470	475
	Glu Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu		
	485	490	495
45	Ser Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr		
	500	505	510
	Arg Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser		
	515	520	525
50	Ile Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly		
	530	535	540
	Leu Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro		
55	545	550	555
	Asn Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu		
	565	570	575
	Ser Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met		
60	580	585	590

ES 2 310 660 T3

5	Lys Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro 595 600 605
	Cys Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu 610 615 620
	Asn Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala 625 630 635 640
10	Ser Ile Leu Gly Gly Glu Ala Asn Glu Tyr Ile Leu Ser Gln Glu Pro 645 650 655
	Ser Cys Pro Gly His Cys 660
15	
	<210> 113
	<211> 2728
20	<212> DNA
	<213> <i>Mus musculus</i>
	<220>
	<221> CDS
25	<222> (237)...(1877)
	<400> 113
30	gatggggccc tgaatgttga tctgacagaa ttccagaccca acctgggtt tattgtcctt 60 ttcatctggt catgctaat atactctcaa gatgtgctgg agaagggtct gctgtccggg 120 ctctcagaga aggcaagtctt ggaggcggttc ctggcccggt tctccctcta ctgttcctgg 180 tagcccgcc ttctcgggtt ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239
35	Met 1
40	ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac 287 Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His 5 10 15
45	gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg 335 Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu 20 25 30
50	tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act 383 Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr 35 40 45
55	aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act 431 Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Thr

60

65

ES 2 310 660 T3

	50	55	60	65	
5	tgc act tgg aga cca gag aag gaa acc aat gat acc agc tac att gtg Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Val 70 75 80				479
10	act ttg act tac tcc tat gga aaa agc aat tat agt gac aat gct aca Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala Thr 85 90 95				527
15	gag gct tca tat tct ttt ccc cgt tcc tgt gca atg ccc cca gac atc Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp Ile 100 105 110				575
20	tgc agt gtt gaa gta caa gct caa aat gga gat ggt aaa gtt aaa tct Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys Ser 115 120 125				623
25	gac atc aca tat tgg cat tta atc tcc ata gca aaa acc gaa cca cct Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro 130 135 140 145				671
30	ata att tta agt gtg aat cca att tgt aat aga atg ttc cag ata caa Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile Gln 150 155 160				719
35	tgg aaa ccg cgt gaa aag act cgt ggg ttt cct tta gta tgc atg ctt Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met Leu 165 170 175				767
40	cgg ttc aga act gtc aac agt agc cgc tgg acg gaa gtc aat ttt gaa Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu 180 185 190				815
45	aac tgt aaa cag gtc tgc aac ctc aca gga ctt cag gct ttc aca gaa Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr Glu 195 200 205				863
50	tat gtc ctg gct cta cga ttc agg ttc aat gac tca aga tat tgg agc Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp Ser 210 215 220 225				911
55	aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtg act atg gag gaa gtt cca cat				959

60

65

ES 2 310 660 T3

	Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro His		
	230	235	240
5	gtc ctg gac ctg tgg aga att ctg gaa cca gca gac atg aac gga gac Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly Asp		1007
	245	250	255
10	agg aag gtg cga ttg ctg tgg aag aag gca aga gga gcc ccc gtc ttg Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val Leu		1055
	260	265	270
15	gag aaa aca ttt ggc tac cac ata cag tac ttt gca gag aac agc act Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser Thr		1103
	275	280	285
20	aac ctc aca gag ata aac aac atc acc acc cag cag tat gaa ctg ctt Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu Leu		1151
	290	295	300
25	ctg atg agc cag gca cac tct gtg tcc gtg act tct ttt aat tct ctt Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser Leu		1199
	310	315	320
30	ggc aag tcc caa gag acc atc ctg agg atc cca gat gtc cat gag aag Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu Lys		1247
	325	330	335
35	acc ttc cag tac att aag agc atg cag gcc tac ata gcc gag ccc ctg Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro Leu		1295
	340	345	350
40	ttg gtg gtg aac tgg caa agc tcc att cct gcg gtg gac act tgg ata Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp Ile		1343
	355	360	365
45	gtg gag tgg ctc cca gaa gct gcc atg tcg aag ttc cct gcc ctt tcc Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu Ser		1391
	370	375	380
50	tgg gaa tct gtg tct cag gtc acg aac tgg acc atc gag caa gat aaa Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp Lys		1439
	390	395	400
55			
60			
65			

ES 2 310 660 T3

5	ctt aaa cct ttc aca tgc tat aat ata tca gtg tat cca gtg ttg gga Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu Gly 405 410 415	1487
10	cac cga gtt gga gag ccg tat tca atc caa gct tat gcc aaa gaa gga His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly 420 425 430	1535
15	act cca tta aaa ggt cct gag acc agg gtg gag aac atc ggt ctg agg Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu Arg 435 440 445	1583
20	aca gcc acg atc aca tgg aag gag att cct aag agt gct agg aat gga Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn Gly 450 455 460 465	1631
25	ttt atc aac aat tac act gta ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gaa Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Lys Glu 470 475 480	1679
30	ctc tcc aag act gtt aac tct cat gcc ctg cag tgt gac ctg gag tct Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu Ser 485 490 495	1727
35	ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg 500 505 510	1775
40	gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile 515 520 525	1823
45	agt gag tac tgg ctt cag gcc tca ttc tgg agt tta ctt cgg gtt gga Ser Glu Tyr Trp Leu Gln Ala Ser Phe Trp Ser Leu Leu Arg Val Gly 530 535 540 545	1871
50	aat gtt tgacaggagc aaggagagcc agcagaggc agcagagcat ggcttctcct Asn Val	1927
55	gctctctctg gctcactcac ctcccaggag ttactgagga gctggcaaag ggagggctga 1987 gttagaccaa caggccattt tgatccctgc tggtaagcag ccacaaataa tcttaagatg 2047 aagcaagcaa catccacttc agcctcagcc acgtcaaagg ctgtgcctg agctcacact 2107	
60		

ES 2 310 660 T3

5 ggccagttcc taaatgtca gagggtgc aatagaacctg ggaagggaaaca actgggtgat 2167
 cagaggtcac tgacaaggga cttaatgtta ccatctgcgg tggggctttt gtttcgtttt 2227
 gtttgttgt tatgtgtatt caacttatca gctttacgt tgaaaacatg aaaagcaaga 2287
 caaatttgtt agatatcaca tataatgtga aatataatag ttaataatt gagtaggaaa 2347
 gctgagggca tgtaatagac agagggaaaa gaagaggaaa gccagtcgg tctacaaagt 2407
 gagttccagg acagccaggg ctacatggag aaaccctgtc tcaatcaatc aatcaatcaa 2467
 10 tcaatcagtc aatcaatcaa aattcaagca gcattgacaa gtttgcaat aactactata 2527
 aaccaaaaaa gtcatcttga tgtatctcag aagccccttg ttatttatgt tcctgaagac 2587
 taaagttagac cgtggctctg agaaccatga gcaagataac acgttctgtc ctgcagccata 2647
 acaatgcctt cttggtattc ttttgatac aacttctaaa ataacttttt titaaaaaaa 2707
 15 ataaaaatca tgttacagct a 2728

20 <210> 114

21 <211> 547

22 <212> PRT

23 <213> *Mus musculus*

24 <400> 114

25

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

ES 2 310 660 T3

	195	200	205
5	Glu Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp		
	210	215	220
	Ser Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro		
	225	230	235
10	His Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly		
	245	250	255
	Asp Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val		
	260	265	270
15	Leu Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser		
	275	280	285
	Thr Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu		
	290	295	300
20	Leu Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser		
	305	310	315
	Leu Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu		
	325	330	335
25	Lys Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro		
	340	345	350
	Leu Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp		
	355	360	365
30	Ile Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu		
	370	375	380
	Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp		
	385	390	395
35	Lys Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu		
	405	410	415
	Gly His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu		
40	420	425	430
	Gly Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu		
	435	440	445
	Arg Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn		
45	450	455	460
	Gly Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys		
	465	470	475
50	Glu Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu		
	485	490	495
	Ser Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr		
	500	505	510
55	Arg Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser		
	515	520	525
	Ile Ser Glu Tyr Trp Leu Gln Ala Ser Phe Trp Ser Leu Leu Arg Val		
	530	535	540
60	<210> 115		
	<211> 30		
	<212> DNA		
65	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador ZC41.764		

ES 2 310 660 T3

<400> 119

5	ctgtggacat tttaccatgc agccataaaag agaggtcaaa aatgttttc aagtccccgg 60 ttagtaaaga tctgatggcg ttctaaggag agaaaggaac ttggatcttc gtggacaaag 120 aattcaggc tc tagctgaa ggaggcgtgg ccacacaggg cgtttccagg tcctgttagag 180 gaagcacagt tcatagatct ctgttctaaac acgtctgtct tgctctgaac gccgaaagt 240 aactcgatca caagttgat ccaacagtt gacatttcag gtaattttca gacggagcgc 300 tggggttggaa tctcccaagc aacacaattt gctctgtgca ggacacctgg cacggggcac 360 tgggtcgca gtcgtccctt ctccctccag gaacaacgat gctcaaggac cagctttcc 420 tcccaggcct ctcccaccc ccttcacc ggtgctgccc gcccgtccc gggaaaccgc 480 cccgtcgca ggtcccgatc gtcccccta catcccttgg gaccaggagc aaattccctgt 540 gggtcccgagg agtccaaaaa gtgctcagcg agacggaaaa ttgcaacagt acitggccct 600 tcggccctcc cccggcgctt tcccgtaact cccggccctg gacacttgc ccgtagttga 660 ttcatagctg gggcgcccccc acgcctggac agacgtccgc gcccgttccc 720 ctgtgaggcc gaggaccggc aaggctccgg agcaggtcgc caggcggta atcagacca 779 atg gct ttc tct gtg gtc ctt cat cca gcc ttc ctc ctg gca gtg ctg 827
	Met Ala Phe Ser Val Val Leu His Pro Ala Phe Leu Leu Ala Val Leu 1 5 10 15

25	tcc ctg agg gca tcc cga agc gaa gtc ttg gag gag cct tta cca ttg 875 Ser Leu Arg Ala Ser Arg Ser Glu Val Leu Glu Glu Pro Leu Pro Leu 20 25 30
----	--

30	act cct gag ata cat aaa gtt tct ttt caa ttg aaa ctt caa gaa gtg 923 Thr Pro Glu Ile His Val Ser Phe Gln Leu Lys Leu Gln Glu Val 35 40 45
----	--

35	aat tta gaa tgg act gtc cca gcc ctt act cat gaa gaa tta aac atg 971 Asn Leu Glu Trp Thr Val Pro Ala Leu Thr His Glu Glu Leu Asn Met 50 55 60
----	--

40

45

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

5	ata ttt cag ata gag atc agt aga ctg aac ata tcc aac acc atc tgg Ile Phe Gln Ile Glu Ile Ser Arg Leu Asn Ile Ser Asn Thr Ile Trp 65 70 75 80	1019
10	gtg gag aat tat agc acc act gtg aag cgt gaa gaa gct gtg cgt tgg Val Glu Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Arg Glu Glu Ala Val Arg Trp 85 90 95	1067
15	aac tgg acg tct gat atc cct ttg gag tgt gtc aaa cat ttc ata aga Asn Trp Thr Ser Asp Ile Pro Leu Glu Cys Val Lys His Phe Ile Arg 100 105 110	1115
20	atc agg gct ctg gta gat gac acc aag tcc ctt cca cag agt tcc tgg Ile Arg Ala Leu Val Asp Asp Thr Lys Ser Leu Pro Gln Ser Ser Trp 115 120 125	1163
25	ggc aac tgg agt tcc tgg aaa gaa gtt aat gca aag gtt tcc gtt gaa Gly Asn Trp Ser Ser Trp Lys Glu Val Asn Ala Lys Val Ser Val Glu 130 135 140	1211
30	cct gat aaa tca tta ata ttt cct aaa gac aaa gtg ttg gaa gaa ggc Pro Asp Lys Ser Leu Ile Phe Pro Lys Asp Lys Val Leu Glu Glu Gly 145 150 155 160	1259
35	tcc aat gtc acc atc tgt ctg atg tat ggg cag aat gta tat aat gta Ser Asn Val Thr Ile Cys Leu Met Tyr Gly Gln Asn Val Tyr Asn Val 165 170 175	1307
40	tcc tgt aag ttg caa gat gag cca atc cat gga gaa caa ctt gat tcc Ser Cys Lys Leu Gln Asp Glu Pro Ile His Gly Glu Gln Leu Asp Ser 180 185 190	1355
45	cac gtg tca tta tta aaa ttg aac aat gta gtt ttc ctt agt gac aca His Val Ser Leu Leu Lys Leu Asn Asn Val Val Phe Leu Ser Asp Thr 195 200 205	1403
50	ggg aca aac atc aat tgt caa gcc acg aag ggt cct aaa aga ata ttt Gly Thr Asn Ile Asn Cys Gln Ala Thr Lys Gly Pro Lys Arg Ile Phe 210 215 220	1451
55	ggt act gtt ctc ttt gtc tcg aaa gtg ctc gag gaa cct aag aat gtt Gly Thr Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro Asn Val	1499
60		

ES 2 310 660 T3

	225	230	235	240	
5	tcc tgt gaa acc cga gac ttt aag act ttg gac tgt tca tgg gaa cct Ser Cys Glu Thr Arg Asp Phe Lys Thr Leu Asp Cys Ser Trp Glu Pro				1547
	245	250		255	
10	ggg gta gat acg act ttg act tgg cgt aaa caa aga ttc caa aac tac Gly Val Asp Thr Thr Leu Thr Trp Arg Lys Gln Arg Phe Gln Asn Tyr				1595
	260	265		270	
15	act tta tgt gaa tcg ttc tct aag aga tgt gag gtt tct aac tac agg Thr Leu Cys Glu Ser Phe Ser Lys Arg Cys Glu Val Ser Asn Tyr Arg				1643
	275	280		285	
20	aac tcc tat acc tgg caa atc act gaa ggc tca cag gaa atg tat aac Asn Ser Tyr Thr Trp Gln Ile Thr Glu Gly Ser Gln Glu Met Tyr Asn				1691
	290	295		300	
25	ttt act ctc aca gct gaa aac caa cta agg aaa aga agt gtc aac att Phe Thr Leu Thr Ala Glu Asn Gln Leu Arg Lys Arg Ser Val Asn Ile				1739
	305	310	315		320
30	aat ttt aac ctg acc cat aga gtt cat cca aag gct ccg cag gac gtc Asn Phe Asn Leu Thr His Arg Val His Pro Lys Ala Pro Gln Asp Val				1787
	325	330		335	
35	acc ctt aaa att ata ggt gct aca aaa gcc aac atg act tgg aag gtt Thr Leu Lys Ile Ile Gly Ala Thr Lys Ala Asn Met Thr Trp Lys Val				1835
	340	345		350	
40	cac tcc cat gga aac aac tac aca ctt ttg tgt cag gtt aaa ctc caa His Ser His Gly Asn Asn Tyr Thr Leu Leu Cys Gln Val Lys Leu Gln				1883
	355	360	365		
45	tat gga gaa gtg att cat gag cac aat gtt tct gtc cac atg agc gca Tyr Gly Glu Val Ile His Glu His Asn Val Ser Val His Met Ser Ala				1931
	370	375	380		
50	aac tac ctc ttc agt gat ctg gat cca gac aca aag tac aag gct ttt Asn Tyr Leu Phe Ser Asp Leu Asp Pro Asp Thr Lys Tyr Lys Ala Phe				1979
	385	390	395	400	
55	gtg cgc tgt gca agt gcc aac cac ttc tgg aaa tgg agc gac tgg acc				2027

60

65

ES 2 310 660 T3

	Val Arg Cys Ala Ser Ala Asn His Phe Trp Lys Trp Ser Asp Trp Thr		
	405	410	415
5	caa aaa gag ttc agc aca ccc gag act gct ccc tca cag gct ctt gat		2075
	Gln Lys Glu Phe Ser Thr Pro Glu Thr Ala Pro Ser Gln Ala Leu Asp		
	420	425	430
10	gta tgg aga caa gtg tgg tcg gag aat gga aga cgc att gtg act tta		2123
	Val Trp Arg Gln Val Trp Ser Glu Asn Gly Arg Arg Ile Val Thr Leu		
	435	440	445
15	ttc tgg aag cca cta tta aaa tca cag gcc aat ggc aaa atc ata tcc		2171
	Phe Trp Lys Pro Leu Leu Lys Ser Gln Ala Asn Gly Lys Ile Ile Ser		
	450	455	460
20	tat aat ata gtt gta gaa aat gaa gcc aaa cca act gag tca gaa cac		2219
	Tyr Asn Ile Val Val Glu Asn Glu Ala Lys Pro Thr Glu Ser Glu His		
	465	470	475
	480		
25	tac tgt gtc tgg gca cca gcc ctc agc aca aac ctg agc ctt gac ctg		2267
	Tyr Cys Val Trp Ala Pro Ala Leu Ser Thr Asn Leu Ser Leu Asp Leu		
	485	490	495
30	caa cct tac aag att cgc atc aca gcc aac aac agc atg ggg gca tct		2315
	Gln Pro Tyr Lys Ile Arg Ile Thr Ala Asn Asn Ser Met Gly Ala Ser		
	500	505	510
35	cct gag tcc ttg atg gtc ctt tct aat gat tct gga cac gag gtc aag		2363
	Pro Glu Ser Leu Met Val Leu Ser Asn Asp Ser Gly His Glu Val Lys		
	515	520	525
40	gaa aag aca att aaa ggt ata aag gat gca ttc aat att tct tgg gag		2411
	Glu Lys Thr Ile Lys Gly Ile Lys Asp Ala Phe Asn Ile Ser Trp Glu		
	530	535	540
45	ccc gta tct gga gac acg atg ggc tat gtt gtg gac tgg tgt gca cat		2459
	Pro Val Ser Gly Asp Thr Met Gly Tyr Val Val Asp Trp Cys Ala His		
	545	550	555
	560		
50	tcc cag gac caa cgc tgt gat ttg cag tgg aag aac ctt ggt ccc aat		2507
	Ser Gln Asp Gln Arg Cys Asp Leu Gln Trp Lys Asn Leu Gly Pro Asn		
	565	570	575
55			
60			

ES 2 310 660 T3

5	acc aca agc acc acc atc acc tca gat gat ttt aaa cca ggc gtc cgt Thr Thr Ser Thr Thr Ile Thr Ser Asp Asp Phe Lys Pro Gly Val Arg 580 585 590	2555
10	tac aac ttc aga att ttt gaa agg tct gtg gaa cac aaa gct cgg tta Tyr Asn Phe Arg Ile Phe Glu Arg Ser Val Glu His Lys Ala Arg Leu 595 600 605	2603
15	gta gag aaa caa aga gga tac acc cag gaa ctg gct cct ttg gtg aat Val Glu Lys Gln Arg Gly Tyr Thr Gln Glu Leu Ala Pro Leu Val Asn 610 615 620	2651
20	cca aaa gtg gag att cct tac tcg acc cct aac tcc ttc gtt cta aga Pro Lys Val Glu Ile Pro Tyr Ser Thr Pro Asn Ser Phe Val Leu Arg 625 630 635 640	2699
25	tgg cca gat tat gac agc gac ttc cag gct ggt ttt ata aaa ggg tac Trp Pro Asp Tyr Asp Ser Asp Phe Gln Ala Gly Phe Ile Lys Gly Tyr 645 650 655	2747
30	ctc gtg tat gtg aaa tcc aag gag atg cag tgc aac caa ccc tgg gaa Leu Val Tyr Val Lys Ser Lys Glu Met Gln Cys Asn Gln Pro Trp Glu 660 665 670	2795
35	agg acc ctc ctt cca gat aat tca gtc ctc tgt aaa tac gac atc aat Arg Thr Leu Leu Pro Asp Asn Ser Val Leu Cys Lys Tyr Asp Ile Asn 675 680 685	2843
40	ggc tca gag aca aag aca ctc acc gtg gaa aac ctt cag cca gag tcc Gly Ser Glu Thr Lys Thr Leu Thr Val Glu Asn Leu Gln Pro Glu Ser 690 695 700	2891
45	ctc tat gag ttt ttc gtc act ccg tac acc agc gct ggc cca gga ccc Leu Tyr Glu Phe Phe Val Thr Pro Tyr Thr Ser Ala Gly Pro Gly Pro 705 710 715 720	2939
50	aat gaa acg ttc aca aag gtc aca act cca gat gca cgc tcc cac atg Asn Glu Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Ala Arg Ser His Met 725 730 735	2987
55	ctg ctg cag atc ata cta ccc atg acc ctc tgc gtc ttg ctc agc atc Leu Leu Gln Ile Ile Leu Pro Met Thr Leu Cys Val Leu Leu Ser Ile 740 745 750	3035
60		

ES 2 310 660 T3

	att gtc tgc tac tgg aaa agt cag tgg gtg aag gag aag tgc tac cct	3083
5	Ile Val Cys Tyr Trp Lys Ser Gln Trp Val Lys Glu Lys Cys Tyr Pro	
	755 760 765	
	gac att ccc aat ccg tac aag agc agc att ctg tca ctc ata aaa tcc	3131
10	Asp Ile Pro Asn Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser Leu Ile Lys Ser	
	770 775 780	
15	aag aag aat cct cac tta ata atg aat gtc aaa gac tgc att cca gat	3179
	Lys Lys Asn Pro His Leu Ile Met Asn Val Lys Asp Cys Ile Pro Asp	
	785 790 795 800	
20	gtc ctt gaa gtg ata aac aaa gca gaa ggc agc aag aca cag tgt gta	3227
	Val Leu Glu Val Ile Asn Lys Ala Glu Gly Ser Lys Thr Gln Cys Val	
	805 810 815	
25	ggc tct ggg aaa ctt cac att gaa gat gta ccc act aag ccg cca atc	3275
	Gly Ser Gly Lys Leu His Ile Glu Asp Val Pro Thr Lys Pro Pro Ile	
	820 825 830	
30	gtg cca aca gaa aag gat tcc tca ggg cct gtg ccc tgc atc ttc ttt	3323
	Val Pro Thr Glu Lys Asp Ser Ser Gly Pro Val Pro Cys Ile Phe Phe	
	835 840 845	
35	gag aat ttt act tac gat cag tca gct ttt gac tct ggt tcc cat ggc	3371
	Glu Asn Phe Thr Tyr Asp Gln Ser Ala Phe Asp Ser Gly Ser His Gly	
	850 855 860	
40	ctc att cca ggt ccc cta aaa gac aca gca cac caa ctt gga cta ttg	3419
	Leu Ile Pro Gly Pro Leu Lys Asp Thr Ala His Gln Leu Gly Leu Leu	
	865 870 875 880	
45	gct cca cct aac aag ttc cag aac gta tta aaa aat gac tac atg aag	3467
	Ala Pro Pro Asn Lys Phe Gln Asn Val Leu Lys Asn Asp Tyr Met Lys	
	885 890 895	
50	ccc ctg gtc gaa agt cca act gaa gaa act agc ttg att tat gtg tca	3515
	Pro Leu Val Glu Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ser Leu Ile Tyr Val Ser	
	900 905 910	
55	cag ctg gct tca ccc atg tgc gga gac aag gac acg ctt gcc aca gaa	3563
	Gln Leu Ala Ser Pro Met Cys Gly Asp Lys Asp Thr Leu Ala Thr Glu	
60		
65		

ES 2 310 660 T3

	915	920	925	
5	cca ccc gtg cca gtg cat ggt tca gag tat aaa agg caa atg gta gtt			3611
	Pro Pro Val Pro Val His Gly Ser Glu Tyr Lys Arg Gln Met Val Val			
	930	935	940	
10	ccc ggg agc ctc gca tca cct tct ctg aag gag gat aac agc ttg acc			3659
	Pro Gly Ser Leu Ala Ser Pro Ser Leu Lys Glu Asp Asn Ser Leu Thr			
	945	950	955	960
15	tca acg gtc ctc tta ggc caa ggt gaa cag taa acaccacgca gcacaaaataa			3712
	Ser Thr Val Leu Leu Gly Gln Gly Glu Gln *			
	965	970		
20	atgcactcca cacactatacg gcacitgggg agatgttgt gttaccatgc caacaccacg			3772
	tgcctgggtt gttccagggttgggggggttggggggact cattatctgc agtgctgatt			3832
	tatcaacgtt cactacagac caacagactt aaggaccata taatatggtg ttacccctga			3892
	aggcggttccc tagaaatggc agatccgaga gcatgctgac cttgcttatta ttgggtccag			3952
	gctcaccctt attgcgttag cttagacatag ggtgtacacc agtcatttcg cagagcctac			4012
	ctactcaaaa ctac			4026
30	<210> 120			
	<211> 970			
	<212> PRT			
	<213> <i>Mus musculus</i>			
35	<400> 120			
40	Met Ala Phe Ser Val Val Leu His Pro Ala Phe Leu Leu Ala Val Leu			
	1	5	10	15
	Ser Leu Arg Ala Ser Arg Ser Glu Val Leu Glu Glu Pro Leu Pro Leu			
	20	25	30	
	Thr Pro Glu Ile His Lys Val Ser Phe Gln Leu Lys Leu Gln Glu Val			
	35	40	45	
	Asn Leu Glu Trp Thr Val Pro Ala Leu Thr His Glu Glu Leu Asn Met			
	50	55	60	
	Ile Phe Gln Ile Glu Ile Ser Arg Leu Asn Ile Ser Asn Thr Ile Trp			
	65	70	75	80
	Val Glu Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Arg Glu Glu Ala Val Arg Trp			
	85	90	95	
	Asn Trp Thr Ser Asp Ile Pro Leu Glu Cys Val Lys His Phe Ile Arg			
	100	105	110	
	Ile Arg Ala Leu Val Asp Asp Thr Lys Ser Leu Pro Gln Ser Ser Trp			
	115	120	125	
55				
60				

ES 2 310 660 T3

	Gly Asn Trp Ser Ser Trp Lys Glu Val Asn Ala Lys Val Ser Val Glu			
5	130	135	140	
	Pro Asp Lys Ser Leu Ile Phe Pro Lys Asp Lys Val Leu Glu Glu Gly			
	145	150	155	160
	Ser Asn Val Thr Ile Cys Leu Met Tyr Gly Gln Asn Val Tyr Asn Val			
10	165	170	175	
	Ser Cys Lys Leu Gln Asp Glu Pro Ile His Gly Glu Gln Leu Asp Ser			
	180	185	190	
	His Val Ser Leu Leu Lys Leu Asn Asn Val Val Phe Leu Ser Asp Thr			
15	195	200	205	
	Gly Thr Asn Ile Asn Cys Gln Ala Thr Lys Gly Pro Lys Arg Ile Phe			
	210	215	220	
	Gly Thr Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro Lys Asn Val			
20	225	230	235	240
	Ser Cys Glu Thr Arg Asp Phe Lys Thr Leu Asp Cys Ser Trp Glu Pro			
	245	250	255	
	Gly Val Asp Thr Thr Leu Thr Trp Arg Lys Gln Arg Phe Gln Asn Tyr			
25	260	265	270	
	Thr Leu Cys Glu Ser Phe Ser Lys Arg Cys Glu Val Ser Asn Tyr Arg			
	275	280	285	
30	Asn Ser Tyr Thr Trp Gln Ile Thr Glu Gly Ser Gln Glu Met Tyr Asn			
	290	295	300	
	Phe Thr Leu Thr Ala Glu Asn Gln Leu Arg Lys Arg Ser Val Asn Ile			
	305	310	315	320
35	Asn Phe Asn Leu Thr His Arg Val His Pro Lys Ala Pro Gln Asp Val			
	325	330	335	
	Thr Leu Lys Ile Ile Gly Ala Thr Lys Ala Asn Met Thr Trp Lys Val			
40	340	345	350	
	His Ser His Gly Asn Asn Tyr Thr Leu Leu Cys Gln Val Lys Leu Gln			
	355	360	365	
	Tyr Gly Glu Val Ile His Glu His Asn Val Ser Val His Met Ser Ala			
45	370	375	380	
	Asn Tyr Leu Phe Ser Asp Leu Asp Pro Asp Thr Lys Tyr Lys Ala Phe			
	385	390	395	400
	Val Arg Cys Ala Ser Ala Asn His Phe Trp Lys Trp Ser Asp Trp Thr			
50	405	410	415	
	Gln Lys Glu Phe Ser Thr Pro Glu Thr Ala Pro Ser Gln Ala Leu Asp			
	420	425	430	
	Val Trp Arg Gln Val Trp Ser Glu Asn Gly Arg Arg Ile Val Thr Leu			
55	435	440	445	
	Phe Trp Lys Pro Leu Leu Lys Ser Gln Ala Asn Gly Lys Ile Ile Ser			
	450	455	460	
60	Tyr Asn Ile Val Val Glu Asn Glu Ala Lys Pro Thr Glu Ser Glu His			

ES 2 310 660 T3

465	470	475	480
Tyr Cys Val Trp Ala Pro Ala Leu Ser Thr Asn Leu Ser Leu Asp Leu			
5	485	490	495
Gln Pro Tyr Lys Ile Arg Ile Thr Ala Asn Asn Ser Met Gly Ala Ser			
500	505	510	
10 Pro Glu Ser Leu Met Val Leu Ser Asn Asp Ser Gly His Glu Val Lys			
515	520	525	
Glu Lys Thr Ile Lys Gly Ile Lys Asp Ala Phe Asn Ile Ser Trp Glu			
530	535	540	
15 Pro Val Ser Gly Asp Thr Met Gly Tyr Val Val Asp Trp Cys Ala His			
545	550	555	560
Ser Gln Asp Gln Arg Cys Asp Leu Gln Trp Lys Asn Leu Gly Pro Asn			
565	570	575	
20 Thr Thr Ser Thr Thr Ile Thr Ser Asp Asp Phe Lys Pro Gly Val Arg			
580	585	590	
Tyr Asn Phe Arg Ile Phe Glu Arg Ser Val Glu His Lys Ala Arg Leu			
595	600	605	
25 Val Glu Lys Gln Arg Gly Tyr Thr Gln Glu Leu Ala Pro Leu Val Asn			
610	615	620	
Pro Lys Val Glu Ile Pro Tyr Ser Thr Pro Asn Ser Phe Val Leu Arg			
625	630	635	640
30 Trp Pro Asp Tyr Asp Ser Asp Phe Gln Ala Gly Phe Ile Lys Gly Tyr			
645	650	655	
Leu Val Tyr Val Lys Ser Lys Glu Met Gln Cys Asn Gln Pro Trp Glu			
660	665	670	
35 Arg Thr Leu Leu Pro Asp Asn Ser Val Leu Cys Lys Tyr Asp Ile Asn			
675	680	685	
Gly Ser Glu Thr Lys Thr Leu Thr Val Glu Asn Leu Gln Pro Glu Ser			
40 690	695	700	
Leu Tyr Glu Phe Phe Val Thr Pro Tyr Thr Ser Ala Gly Pro Gly Pro			
705	710	715	720
45 Asn Glu Thr Phe Thr Lys Val Thr Pro Asp Ala Arg Ser His Met			
725	730	735	
Leu Leu Gln Ile Ile Leu Pro Met Thr Leu Cys Val Leu Leu Ser Ile			
50 740	745	750	
Ile Val Cys Tyr Trp Lys Ser Gln Trp Val Lys Glu Lys Cys Tyr Pro			
755	760	765	
Asp Ile Pro Asn Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser Leu Ile Lys Ser			
55 770	775	780	
Lys Lys Asn Pro His Leu Ile Met Asn Val Lys Asp Cys Ile Pro Asp			
785	790	795	800
Val Leu Glu Val Ile Asn Lys Ala Glu Gly Ser Lys Thr Gln Cys Val			
60 805	810	815	

ES 2 310 660 T3

Gly Ser Gly Lys Leu His Ile Glu Asp Val Pro Thr Lys Pro Pro Ile
 820 825 830
 Val Pro Thr Glu Lys Asp Ser Ser Gly Pro Val Pro Cys Ile Phe Phe
 835 840 845
 Glu Asn Phe Thr Tyr Asp Gln Ser Ala Phe Asp Ser Gly Ser His Gly
 850 855 860
 Leu Ile Pro Gly Pro Leu Lys Asp Thr Ala His Gln Leu Gly Leu Leu
 865 870 875 880
 Ala Pro Pro Asn Lys Phe Gln Asn Val Leu Lys Asn Asp Tyr Met Lys
 885 890 895
 Pro Leu Val Glu Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ser Leu Ile Tyr Val Ser
 900 905 910
 Gln Leu Ala Ser Pro Met Cys Gly Asp Lys Asp Thr Leu Ala Thr Glu
 915 920 925
 Pro Pro Val Pro Val His Gly Ser Glu Tyr Lys Arg Gln Met Val Val
 930 935 940
 Pro Gly Ser Leu Ala Ser Pro Ser Leu Lys Glu Asp Asn Ser Leu Thr
 945 950 955 960
 Ser Thr Val Leu Leu Gly Gln Gly Glu Gln
 965 970

30 <210> 121

35 <211> 2910

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido degenerado que codifica e

40 <221> característica miscelánea

<222> (1)...(2910)

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

45 <221> característica miscelánea

<222> (1)...(2910)

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

50 <400> 121

55 atggcntt^w sngtngt^{nyt} ncayccngcn t^{ty}tyt^{nyt}ng cngt^{nyt}rnws nytn^{mg}ngncn 60
wsnmgnwsng argt^{nyt}n^{ga} rgarc^{cc}nytn ccnytnacnc cngarathca yaargt^{nyt}wnsn 120
t^{ty}carytna arytn^{carga} rqt^{na}ayy^{tn} gartggacnq tnccngcnyt nacncaygar 180

5 garytnaaya tgathttyca rathgarath wsrmgnytna ayathwsnaa yacnathtg 240
gtnagaraayt aywsnacnac ngtnaarmgn gargargcng tnmgntggaa ytggacnwsn 300
gayathccny tngartgygt naarcaytty athmgnathm gngcnytngt ngaygaya 360
aarwsnytnc cnccarwsnws ntgggnaay tggwsnwsnt ggaargargt naaygcnaar 420
gtnwsngtng arccngayaa rwsnytnath ttyccnaarg ayaargtnyt ngargarggn 480
wsnaaygtna cnathtgyyt natgtaygg caraaaygtnt ayaaygtws ntgyaarytn 540
cargaygarc cnathcaygg ngarcarytn gaywsncayg trwsnytnyt naarytnaay 600
aaygtngtnt tyytnwsnga yacnggnacn aayathaayt gycargcnac naarggnccn 660
aarmgnath tyggnaclt nytnntygtw wsnaargtny tngargarcc naaraaygt 720
wsntgygara cnmgngaytt yaaracnytn gaytgywsnt gggarccngg nttrgayan 780
acnytnacnt ggmgnhaarca mgnttcar aaytayacny tntgygarws nttywsnaar 840
mgntgygarg trwsnaayta ymgnaaywsn tayacntggc arathacnga rggwsncar 900
garatgtaya ayttyacnyt naclngcngar aaycarytnm gnaarmgnws ntgnayath 960
aayttaayy tnaacncaymg ntncayccn aargcnccnc argaygtnc nytnaayath 1020
athggngcna cnaargcnaa yatgacntgg aartgtnayw sncayggnaa yaaytayacn 1080
ytnytnygyc argtntaaryt ncartaygg gartgnathc aygarcaya 1080
cayatgwsng cnaaytayyt nttywsngay ytnayccng ayacnaarta yaargcn 1200
gtnmgntgyg cnwsngcnaa ycaaytgytgg aartgwsng aytggacna raargartt 1260
wsnacnccng aracngcncc nwsncargcn ytnaygtnt ggmgnacrgt ntggwsngar 1320
aayggmgnm gnathgtac nytnntygtgg aarccnytny tnaarwsnca rgcnaaygg 1380
aarathathw sntayaayat hgtngtngar aaygargcna arccnacnga rwsngarcay 1440
taytgygtnt gggcnccngc nytnwsnacn aayytnwsny tngaytnc rccntayaar 1500
athmgnatha cngcnaayaa ywsnatgggn gcnwsnccng arwsnytnat ggtntwsn 1560
aaygaywsng gncaygargt naargaraar acnathaarg gnathaarga ygcnttyaay 1620
athwsntggg arccngtws nngngayacn atggntayg tngtngayt gtygcncay 1680
wsncargayc armgntgyga ytnycartgg aaraaytng gnccnaayac nacnwsnacn 1740
acnatha 1740 acnathaacn sngaygaytt yaarccnggn gtnmgntaya ayttymgnat httygarmgn 1800
wsngtngarc ayaargcnmg nytnngtgar aarcarmngn gntayacna rgarytngcn 1860
ccnytngtna ayccnaargt ngarathccn taywsnacnc cnaaywsntt ygtntmgn 1920
tggccngayt aaygaywsngay yttycargcn ggnntyatha arggntayt ntgnayt 1980
aarwsnaarg aratgcartg yaaycarccn tggarmgn cnytnytncc ngayaaywsn 2040
gtnytnygt aartaygat haaygnwsn garacnaara cnytnacngt ngaraayyt 2100
carccngarw snytnaytga rttytgytgn acnccntaya cnwsngcngg nccnggnccn 2160
aaygaracnt tyacnaargt naclnacnccn gaygcnmgnw sncayatgt nytncarath 2220
athytnccna tgacnytnygt ygtntytnw wsnathathg tntgytayt gaaarwsnacn 2280
tgggtntaarg araaartgyt yccngayath cnaayccnt ayaarwsnws nathytnwsn 2340
ytnathaarw snaaraaraa yccnccaytn athatgaayg tnaargayt yathccngay 2400
gtnytnygt gtnathaayaa rgcngarggn wsnaaracnc artgytngg nwsngnnaar 2460
ytnycayathg argaygtnc naclnacnccn cnaathtgn cnaacngaraa rgaywsnwsn 2520
ggncngtnc cnytngtnc ntgytntt yttycaraay ttyacntayg aycarwsngc nttygaywsn 2580
ggwsnacng gnytnygtcc ngnccnytn aargayacng cncaycaryt ngnnytnytn 2640
gcnccnccna ayaarttyca raaygtntn aaraaygayt ayatgaarcc nytnytnytn 2700
wsnccnacng argaracnws nytnathtay gtnwsncary tngcnwsncc natgtgyggn 2760

55
60
gayaargaya cnytngcncar ngarccnccn gtnccngtnc ayggwsngay tntayt 2820
caratggtng tncnccngnws nytnytnwsn cncnwsnytna argargayaa ywsnytnacn 2880
wsnacngtnt nytnytnytna rggngarcar 2910

65 <210> 122
<211> 24
<212> DNA

ES 2 310 660 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador ZC43891

5

<400> 122

10 **gggcagtagg atatgaatca gcat**

24

<210> 123

<211> 19

15 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Cebador ZC43900

<400> 123

25 **gaaggcccca gtgtacgt**

19

<210> 124

<211> 24

30 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Sonda OSMRbeta ZC43896

<400> 124

40 **tcatccggag tcgtgacatt cgta**

24

<210> 125

45 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Cebador ZC43280

<400> 125

55 **gagcacgccc ttctttcc**

20

<210> 126

60 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Cebador ZC43281

ES 2 310 660 T3

<400> 126

5 **cgttggccgt ccgttacta**

20

<210> 127

<211> 40

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda zcytor17lig ZC43275

15

<400> 127

20 **ctgtaattcc tcgactattt tctgtacatc atcacttggt**

40

<210> 128

<211> 22

25 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Cebador ZC40574

<400> 128

35

ctcatttggaa attttgcgcga tt

22

<210> 129

40 <211> 22

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Cebador ZC40575

<400> 129

50

ccgagtgaag atcccctttt ta

22

<210> 130

55 <211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Sonde GUS ZC43017

<400> 130

65

tgaacagtca ccgacgagag tgctgg

26

ES 2 310 660 T3

<210> 131
<211> 24
<212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador ZC28480
10 <400> 131

cgattcagga cagtcaacag tacc

24

15
<210> 132
<211> 21
<212> DNA
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador ZC41653
25 <400> 132

ccttcgtgaa cgttagcactg g

21

30
<210> 133
<211> 19
35 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador ZC41655
40 <400> 133

ctgaaatcca aggcgaggc

19

45
<210> 134
<211> 20
50 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
55 <223> Cebador ZC41703
<400> 134

60 **tgaagctggc ctgcgtctct**

20

65
<210> 135
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

ES 2 310 660 T3

<220>
<223> Cebador ZC41704

5 <400> 135

gagatatgcc cggatggct 19

10 <210> 136
<211> 24
<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador ZC43272

20 <400> 136

gctggtatca ttggttccct tctc 24

25 <210> 137
<211> 24
<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador ZC43273

35 <400> 137

cattctctt cctctgcaaa ttca 24

40 <210> 138
<211> 34

45 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sonda zcytor17 ZC43478

50 <400> 138

tagagaacat ttccctgcgtc tttacttcg acag 34

55 <210> 139
<211> 30

60 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador ZC43278

ES 2 310 660 T3

<400> 139

5 aaacaagagt ctcaggatct ttataacaac 30

10 <210> 140
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ZC43279

15 <400> 140

20 acggcagctg tattgattcg t 21

25 <210> 141
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda zcytor17lig ZC43276

30 <400> 141

35 taaaggcaggc atctggatcg tcagca 26

40 <210> 142
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

45 <223> Cebador ZC43045

 <400> 142

50 aaacatgata tttcagatag agatcagtag act 33

55 <210> 143
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

60 <223> Cebador ZC43046

 <400> 143

65 cttatgaaat gtttgacaca ctccaa 26

ES 2 310 660 T3

<210> 144
<211> 29
<212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sonda OSMRbeta ZC43141
10 <400> 144

15 **ctgtgcgttg gaactggacg tctgatatc** 29

<210> 145
<211> 21
20 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador ZC43004
25 <400> 145

30 **gaaacccgcc gcataattact t** 21

<210> 146
<211> 19
35 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador ZC43005
40 <400> 146

45 **tggcgttgct cacaagggt** 19

<210> 147
<211> 24
50 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
55 <223> Sonda GUS ZC43018 de múrido.
<400> 147

60 **acccacacca aagccctgga cctc** 24

<210> 148
65 <211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

ES 2 310 660 T3

<220>
<223> Cebador ZC40269

5 <400> 148

10 **gccagttca cacactcctc ttt** 23

15 <210> 149
<211> 26
<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador ZC40268

20 <400> 149

25 **gcagctattg cactagtcat ttctt** 26

30 <210> 150
<211> 29
<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sonda ZC40298 del Receptor de la Transferrina

35 <400> 150

40 **cccaggtagc cactcatgaa tccaaatcaa** 29

45 <210> 151
<211> 20
<212> DNA

45 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador ZC43140

50 <400> 151

55 **ttcttccaca gcaatcgac** 20

60 <210> 152
<211> 21
<212> DNA

60 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador ZC43139

65

ES 2 310 660 T3

<400> 152

atgcatgctt cggttcagaa c

21

5

<210> 153

<211> 24

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador ZC41608

<400> 153

20 **gcagacaatg atgctgagca agac**

24

<210> 154

<211> 24

25 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Cebador ZC41609

<400> 154

35 **caacgctgtg atttgcatgt gaga**

24

<210> 155

40 <211> 18

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Cebador ZC41502

<400> 155

50 **agcgggcctt cctcactc**

18

<210> 156

55 <211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Cebador ZC41500

<400> 156

65

ggacaaaata aaaacataaa tac

24

ES 2 310 660 T3

<210> 157
<211> 40
<212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Enlazador
10 <400> 157

tgtcgatgaa gccctgaaag acgcgcagac taattcgagc 40

<210> 158
<211> 60
<212> DNA
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Enlazador
20 <400> 158

acgcgcagac taattcgagc tcccaccatc accatcacca cgcgaattcg gtaccgctgg 60

<210> 159
<211> 60
<212> DNA
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Enlazador
30 <400> 159

actcactata gggcgaattg cccggggat ccacgcggaa ccagcggta cgaattcgcg 60

<210> 160
35 <211> 42
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
40 <223> Enlazador
<400> 160

acggccagtg aattgtata cgactcacta tagggcaat tg 42

<210> 161
45 <211> 825
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*
<220>
50 <221> CDS
<222> (48)...(518)

ES 2 310 660 T3

<400> 161

5	atcactctct ttaatcacta ctcacattaa cctcaactcc tgccaca atg tac agg Met Tyr Arg 1	56
10	atg caa ctc ctg tct tgc att gca cta att ctt gca ctt gtc aca aac Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu Val Thr Asn 5 10 15	10
15	agt gca cct act tca agt tcg aca aag aaa aca aag aaa aca cag cta Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Lys Lys Thr Gln Leu 20 25 30 35	15
20	caa ctg gag cat tta ctg ctg gat tta cag atg att ttg aat gga att Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile 40 45 50	20
25	aat aat tac aag aat ccc aaa ctc acc agg atg ctc aca ttt aag ttt Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe 55 60 65	24
30	tac atg ccc aag aag gcc aca gaa ctg aaa cag ctt cag tgt cta gaa Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Cys Leu Glu 70 75 80	29
35	gaa gaa ctc aaa cct ctg gag gaa gtg ctg aat tta gct caa agc aaa Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys 85 90 95	34
40	aac ttt cac tta aga ccc agg gac tta atc agc aat atc aac gta ata Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile 100 105 110 115	392
45	gtt ctg gaa cta aag gga tct gaa aca aca ttc atg tgt gaa tat gca Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala 120 125 130	440
50	gat gag aca gca acc att gta gaa ttt ctg aac aga tgg att acc ttt Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe 135 140 145	488
55	tgt caa agc atc atc tca aca cta act tga taattaagtg cttccactt Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr *	538
60	aaaacatatac aggccttcta ttatatttta aatattatata ttattgttga 598 atgtatgtt gctacctatt gtaactatta ttcttaatct taaaactata aatatggatc 658 ttttatgatt cttttgtaa gcccttagggg ctctaaaatg gtttaccta tttatcccaa 718 aaatatttat tattatgttq aatgttaaat atagtatcta tgttagattgg ttagtaaaac 778 tatttaataa atttgataaa tataaaaaaa aaaaacaaaa aaaaaaaa	825

<210> 162

ES 2 310 660 T3

<211> 156
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 162

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

40 <210> 163
<211> 614
<212> DNA
45 <213> *Homo sapiens*
<220>
<221> CDS
<222> (64)...(525)

55

60

65

ES 2 310 660 T3

<400> 163

5	gatcgtagc ttctcctgat aaactaattg cctcacattg tcactgaaa tcgacaccta	60
	tta atg ggt ctc acc tcc caa ctg ctt ccc cct ctg ttc ttc ctg cta	108
	Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu	
	1 5 10 15	
10	gca tgt gcc ggc aac ttt gtc cac gga cac aag tgc gat atc acc tta	156
	Ala Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Ile Thr Leu	
	20 25 30	
15	cag gag atc atc aaa act ttg aac agc ctc aca gag cag aag act ctg	204
	Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu	
	35 40 45	
20	tgc acc gag ttg acc gta aca gac atc ttt gct gcc tcc aag aac aca	252
	Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr	
	50 55 60	
25	act gag aag gaa acc ttc tgc agg gct gcg act gtg ctc cgg cag ttc	300
	Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe	
	65 70 75	
30	tac agc cac cat gag aag gac act cgc tgc ctg ggt gcg act gca cag	348
	Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln	
	80 85 90 95	
35	cag ttc cac agg cac aag cag ctg atc cga ttc ctg aaa cgg ctc gac	396
	Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp	
	100 105 110	
40	agg aac ctc tgg ggc ctg gcg ggc ttg aat tcc tgt cct gtg aag gaa	444
	Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu	
	115 120 125	
45	gcc aac cag agt acg ttg gaa aac ttc ttg gaa agg cta aag acg atc	492
	Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile	
	130 135 140	
50	atg aga gag aaa tat tca aag tgt tcg agc tga atatttaat ttatgagttt	545
	Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser *	
	145 150	
55	ttgatagctt tatttttaa gtatttat atttataact catcataaaa taaagtatat	605
	atagaatct	614
60	<210> 164	
	<211> 153	
	<212> PRT	
65	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 310 660 T3

<400> 164

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

35 <210> 165
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*,
40 <220>
 <221> CDS
 <222> (9)...(443)

45

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

<400> 165

5	gctggagg atg tgg ctg cag agc ctg ctg ctc ttg ggc act gtg gcc tgc 50		
	Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys		
	1 5 10		
10	agc atc tct gca ccc gcc cgc tcg ccc agc ccc agc acg cag ccc tgg 98		
	Ser Ile Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp		
	15 20 25 30		
15	gag cat gtg aat gcc atc cag gag gcc cgg cgt ctc ctg aac ctg agt 146		
	Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser		
	35 40 45		
20	aga gac act gct gct gag atg aat gaa aca gta gaa gtc atc tca gaa 194		
	Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu		
	50 55 60		
25	atg ttt gac ctc cag gag ccg acc tgc cta cag acc cgc ctg gag ctg 242		
	Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu		
	65 70 75		
30	tac aag cag ggc ctg cgg ggc agc ctc acc aag ctc aag ggc ccc ttg 290		
	Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu		
	80 85 90		
35	acc atg atg gcc agc cac tac aag cag cac tgc cct cca acc ccg gaa 338		
	Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu		
	95 100 105 110		
40	act tcc tgt gca acc cag act atc acc ttt gaa agt ttc aaa gag aac 386		
	Thr Ser Cys Ala Thr Gln Thr Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn		
	115 120 125		
45	ctg aag gac ttt ctg ctt gtc atc ccc ttt gac tgc tgg gag cca gtc 434		
	Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val		
	130 135 140		
50	cag gag tga gaccggccag atgaggctgg ccaagccggg gagctgctct 483		
	Gln Glu *		
55	ctcatgaaac aagagctaga aactcaggat ggtcatcttg gagggaccaa ggggtgggcc 543		
	acagccatgg tgggagtggc ctggacctgc cctggccac actgaccctg atacaggcat 603		
	ggcagaagaa tggaatatt ttatactgac agaaatcagt aatattata tatttatatt 663		
60	tttaaatat ttatttattt atttatattaa gttcatattc catattattt caagatgttt 723		
	taccgtata attattatta aaaatatgct tct 756		

<210> 166

65 <211> 144

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 310 660 T3

<400> 166

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

<210> 167

30 <211> 60

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

35 <221> CDS

<222> (1)...(60)

<221> variación

40 <222> (25)...(30)

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

<221> característica miscelánea

45 <222> (1)...(60)

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

<400> 167

gcc aca gaa ctg aaa cag ctt cag nnn nnn gaa gaa gaa ctc aaa cct 48
 Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Xaa Xaa Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 1 5 10 15

55 ctg gag gaa gtg 60
 Leu Glu Glu Val
 20

<210> 168

60 <211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

65 <221> VARIANTE

<222> (9)...(10)

ES 2 310 660 T3

<223> Cualquier aminoácido

<221> VARIANTE

<222> (1)...(20)

5 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 168

10 Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Xaa Xaa Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 1 5 10 15

15 Leu Glu Glu Val
 20

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65