



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

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

(51) 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

(96) Número de solicitud europea: **03729693 .6**

(96) Fecha de presentación : **21.01.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1476541**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2004**

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

(30) Prioridad: **18.01.2002 US 350325 P**
25.04.2002 US 375323 P
19.12.2002 US 435315 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2009

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

(72) 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.

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

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

DESCRIPCIÓN

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 paratiroidea, 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.

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.

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 trombopoyetina (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 de células sanguíneas en pacientes que sufren de anemia, trombocitopenia y neutropenia, o que reciben quimioterapia para el cáncer.

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. 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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).

La Figura 3 es un trazado de hidrofiliidad 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 (Grussenmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7952-4, 1985), sustancia P, péptido Flag™ (Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6:1204-10, 1988), péptido de unión a estreptavidina u otro epítipo 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.

Los términos “aminoterminal” y “carboxilterminal” 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 carboxilterminal 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.

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 epítipo), pares de polinucleótidos sentido/antisentido y similares. Cuando se desee la disociación posterior del par de complemento/anticomplemento, el par de complemento/anticomplemento preferiblemente tendrá una afinidad de unión de $<10^9 \text{ M}^{-1}$.

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'.

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'-TAGCTTgagctt-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).

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, etc. Los vectores de expresión en general derivan de DNA plasmídico o vírico, o pueden contener elementos de ambos.

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).

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 físicas alternativas, como dímeros o formas alternativamente glucosiladas o derivatizadas.

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.

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.

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.

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

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 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.

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”.

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.

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.

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 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 unidos a membranas, ser citosólicos 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).

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.

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 transcrito de un gen.

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.

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 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 linfóide, particularmente las células T.

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 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).

La secuencia de aminoácidos para los receptores de OSMR, WSX-I 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-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).

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 linfoides y células linfoides. Otras citocinas de cuatro hélices conocidas que actúan sobre las células linfoides incluyen 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.

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 zcytor17, 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 zcytor17, OSMRbeta y WSX-1 (BaF3/zcytor17/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 zcytor17/WSX-1/OSMRbeta podría neutralizarse por una forma soluble del receptor zcytor17.

Los medios condicionados de células seleccionadas para CD3+ activadas con PMA/Ionomicina también soportaron el crecimiento de células BaF3 que expresaron el receptor zcytor17 y el receptor OSMRbeta (zcytor17/OSMRbeta), mientras que las células BaF3 que expresan solamente el receptor zcytor17 y el receptor WSX-1 (zcytor17/WSX-1), o que contienen solamente el receptor OSMRbeta, no fueron estimuladas por estos medios condicionados.

La proliferación de células BaF3 que expresan los receptores zcytor17/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. 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-sulfonil)-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*. 3era ed., Wiley-Liss, 1994, que se incorpora a la presente memoria por referencia.

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 transfectó 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 zcytor17, WSX-1 y OSMRbeta. Se identificaron grupos de CDNA que producían medio condicionado que estimulaba los receptores BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta. Este cDNA plasmídico combinado se electroporó en *E. coli*. Se aisló CDNA de colonias sencillas y se transfectó individualmente a células BHK 570. Se identificaron clones positivos mediante un resultado positivo del ensayo de proliferación de los receptores BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta, y la actividad se confirmó por neutralización de la proliferación, usando el receptor soluble zcytor17.

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 zcytor17lig purificado de células 293T 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).

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 zcytor17lig humana que se muestra en la SEC ID NO: 2, la alineación de las secuencias de aminoácidos zcytor17lig humana, IL-3 humana y citocina humana, se pronostica que la hélice A de zcytor17lig 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 zcytor17lig 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 zcytor17lig, como se muestra en la SEC ID NO: 2 en el residuo 43.

Además, la secuencia de aminoácidos pronosticada de zcytor17lig 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 zcytor17lig 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 zcytor17lig humanos que se describen en la presente memoria, se muestran en la SEC ID NO: 1.

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 multimericos (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 CNTF 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 (Gln) 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 ID 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 (Gln) 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.

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

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. "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.

TABLA 2

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

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.

TABLA 3

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

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

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 “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 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 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 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 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 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 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 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 linfóide 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 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 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 (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 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 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

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
10 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
15 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).

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 sondeando 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 estas secuencias se pueden clonar sondeando cDNA o genotecas genómicas de diferentes individuos o tejidos según
30 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 heterocigosidad (LOH), translocaciones, inserciones, deleciones, cambios y 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
40 de restricción (RFLP), análisis de repeticiones cortas en tándem (STR) empleando técnicas PCR, y otras técnicas de análisis de enzimas genéticas conocidas en el campo (Sambrook *et al*, *ibid*; Ausubel *et. al.*, *ibid*; Marian, *Chest* 108:255-65.1995).

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 cóntigo existente y obtener secuencias genéticas circundantes adicionales en
45 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 El experto en la técnica reconocería que la región 12q24 está frecuentemente implicada en enormes reordenaciones genómicas, a saber translocaciones, deleciones, 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.
55 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,
60 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-zcytor17lig de la invención se pueden usar para la detección del polipéptido zcytor17lig, mRNA o anticuerpos anti-zcytor17lig, 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 zcytor17lig se pueden usar para detectar anomalías o genotipos asociados con deleciones 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 zcytor17lig 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 zcytor17lig se pueden usar para detectar anomalías o genotipos asociados con estos defectos.

El experto en la técnica reconocería que las sondas polinucleotídicas de zcytor17lig 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 zcytor17lig, se asocian a enfermedades humanas. Por ejemplo, las deleciones, translocaciones, duplicaciones y trisomía de 12q24 se asocian al cáncer, como se mencionó precedentemente. En consecuencia, ya que el gen zcytor17lig se mapea hacia esta región crítica, las sondas polinucleotídicas de zcytor17lig 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 zcytor17lig 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 zcytor17lig. Asimismo, las sondas polinucleotídicas de zcytor17lig se pueden usar para detectar diferencias alélicas entre individuos enfermos y no enfermos en el locus del cromosoma zcytor17lig. Como tales, las secuencias de zcytor17lig 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 zcytor17lig puede comprender un exón entero o más. El experto en la técnica determina fácilmente los exones, comparando las secuencias de zcytor17lig (SEC ID NO: 1) con el DNA genómico de zcytor17lig 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 zcytor17lig, 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 zcytor17lig, 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 zcytor17lig 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).

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 tándem empleando técnicas PCR, análisis de sistemas de ampliación-mutación refractaria, detección de polimorfismos de conformación monocatenaria, métodos de escisión de RNase, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, 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. 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 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. Con referencia a la SEC ID NO: 76, son manifestos 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.

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 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.

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 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 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.

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 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 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 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 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.

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 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 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.

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

-----x 100

[longitud de la secuencia más larga más el

número de espacios introducidos a la secuencia más larga

para alinear las dos secuencias]

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																
	C	0	-3	-3	-3	9															
15	Q	-1	1	0	0	-3	5														
	E	-1	0	0	2	-4	2	5													
	G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
20	H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
	I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
	L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
25	K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
	M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
	F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
30	P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
	S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
	T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
35	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	
40	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 deleciones 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 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 deleciones 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, deleciones 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; deleciones pequeñas, típicamente entre uno y aproximadamente 30 aminoácidos; y extensiones amino o carboxilterminales, 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 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.

TABLA 5

Sustituciones de aminoácidos consevadoras

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 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 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

(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 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 afectado. Otro método muy conocido y aceptado para medir el pliegue es el dicroísmo 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 epítomos son también 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 hidrofiliidad 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. 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 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 hidrofiliidad 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 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.

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 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 (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 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 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 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 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* nucleasa 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); Cournailleau *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 quiméricas 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-hidroxi-prolina, *trans*-4-hidroxi-prolina, *N*-metilglicina, alo-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipécólico, 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 suprimen 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, 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 epítipo de un polipéptido zcytor17lig descrito en este documento. Dichos fragmentos o péptidos pueden comprender un "epítipo 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 epítipo 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 "epítipo antigénico", 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 epítipo 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 hidrofiliidad de Hopp/Woods se pueden usar para determinar regiones que tengan el potencial más antigénico (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.

Los polipéptidos y péptidos que portan epítomos antigénicos 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. Ducgis polipéptidos y péptidos que portan epítomos pueden producirse fragmentando un polipéptido zcytor17lig o por síntesis peptídica química, como se describe en este documento. A su vez, los epítomos 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 epítomos y producir anticuerpos a partir de péptidos pequeños que comprenden un epítomo 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 direccionarse hacia un tipo de célula predeterminado, condensando un polipéptido zcytor17lig a un ligando que se una específicamente a un receptor en la superficie de esa célula diana. De este modo, los polipéptidos y proteínas se pueden direccionar 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 exógena 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 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).

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 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 de la vía secretora.

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 (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 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 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.

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 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, puromicinacetil transferasa). Se pueden utilizar marcadores 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.

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, Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, pFastBac1TM (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,

pFastBac1TM 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 epítipo en el término C o N del polipéptido zcytor17lig expresado, por ejemplo, un marcador de epítipo 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 *POT1* 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 guilliermondii* 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, se prefiere tener todo el sistema 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 desee 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 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 (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 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 contranfectado a la célula hospedante. Las células de *P. 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%).

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 libre de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal.

Los polipéptidos zcytor17lig recombinantes expresados (o los polipéptidos zcytor17lig quiméricos) 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 caotrope para fraccionar las muestras. Las etapas de purificación ilustrativas pueden incluir hidroxipatita, exclusión de tamaño, FPLC y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa. Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poliácridamida, 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), 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 celulósicas, esferas de agarosa, esferas de agarosa reticuladas, esferas de poliestireno, resinas de poliácridamida 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 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 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 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.

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 humana (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 funcionalmente 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 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 granulosa, 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 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 presente memoria por referencia). Los ensayos que miden la proliferación incluyen, por ejemplo, medir los marcadores
65 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).

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-asociados (AAV). El adenovirus, un virus de DNA bicatenario, es actualmente el vector de transferencia de genes mejor estudiado para administración de ácido nucleico heterólogo (para una revisión, véanse T.C. Becker *et al.*, *Meth. Cell Biol.* 43:161-89, 1994; y J.T. Douglas y D.T. Curiel, *Science & Medicine* 4:44-53, 1997).

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 subsiguientes 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. Véanse, 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.

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 medible en 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.

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 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 citotóxicos naturales, linfocitos citotóxicos y otras células de los linajes linfoides y mieloides en cultivo.

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).

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 el receptor de zcytor17.

Se puede expresar un polipéptido zcytor17lig como una fusión con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, típicamente un fragmento F_c, 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 F_c y se usan en un formato ELISA.

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, poliácridamida 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 hidroxisuccinimida, 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,

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, epítipo 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 epítipos, 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 antiinflamatorios en una diversidad de enfermedades descritas en la presente memoria. Las personas con experiencia en la técnica reconocerán que los polipéptidos antigénicos que portan epítipos 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 epítipos 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 epítipos antigénicos 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 quiméricos, 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 “cubriéndolos” 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 epítipo 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 una 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, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, enzimoimmunoanálisis 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 intermediarios. 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 desnaturalizado 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, saporina, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y demás); como también radionúcleos terapéuticos, por ejemplo yodo-131, renio-188 o iridio-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.

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). Las proteínas de fusión descritas permiten direccionar una citocina hacia un sitio deseado de acción, proporcionando así una concentración local elevada de citocina. Los polipéptidos zcytor17lig o anticuerpos anti-zcytor17lig adecuados direccionan 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.

Incluso en otra realización, si el polipéptido zcytor17lig o el anticuerpo anti-zcytor17lig direcciona 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 direccionar un conjugado bioactivo que contenga un radionúcleo, como se describe en esta memoria.

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 séptico 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 antiinflamatorios, 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 séptico. Como tal, los anticuerpos anti-zcytor17lig y polipéptidos de unión antiinflamatorios 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

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 antiinflamatorios, 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.

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 una o inhiba 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.

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 antiinflamatorios 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 epítomos 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.

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 antiinflamatorios 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.

La endotoxemia inducida por lipopolisacáridos (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 direccionar 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).

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 µg 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 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.

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 evacue 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 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 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.

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 corticosteroides (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 corticosteroides y azatioprina puede provocar graves efectos 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.

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-trinitrobenenosulfónico/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, prolapso rectal y engrosamiento de la pared del intestino grueso (Neurath *et al. Intern. Rev. Immunol.* 19:51-62, 2000).

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- α e IFN- γ . 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.

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.

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, 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.

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, 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.

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 colonias 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.

45

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. Technol. 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.

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 efector de la motilidad de las células, el aumento o pérdida de expresión de zcytor17lig puede servir como diagnóstico para cáncer linfóide, de células B, epitelial, hematopoyético y otros tipos de cáncer.

65

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 singéneos 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 período máximo de 3 semanas, durante las cuales pueden alcanzar un tamaño de 1500-1800 mm³ en el grupo tratado con control. Se controlan cuidadosamente 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, serán 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 sobrestimulación 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-

leccionar 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, 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 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 en este zcytor17lig, los agonistas (incluyendo el receptor o receptores 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 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 antigénicas. 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.

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
15 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 patológicas, incluyendo cáncer. Los polipéptidos zcytor17lig pueden contribuir a procesos patológicos y pueden ser marcadores indirectos de una enfermedad subyacente.

20 Además, el zcyto17lig se puede usar para detectar o direccionar 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
25 consecuencia, el receptor de zcytor17 y/o sus receptores solubles pueden estar asociados o servir como marcadores de afecciones inflamatorias y neoplásicas relacionadas. El zcytor17lig, incluyendo los conjugados citotóxicos, se puede usar para detectar o direccionar dichos tejidos, y patologías.

Las moléculas de la presente invención tienen uso particular en el brazo de monocitos/macrófagos del sistema
30 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 antígenos 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.

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
45 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 lípidos (esfingolipidosis), como la enfermedad de Gaucher. La resistencia a infecciones puede estar afectada debido
55 a un defecto en la función de los macrófagos, lo que podría tratarse con los agonistas del receptor zcytor17, como zcytor17lig.

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
60 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 monoclonal se asocia a una diversidad de anomalías clínicas que reflejan la liberación de los 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
65 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.

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 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, 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 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. 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-idiotipo 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 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. 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 antiinflamatorias 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), α_1 -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 (Dumoutier, 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 periodos más largos contribuye a inflamación crónica y puede ser perjudicial para la salud humana. 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 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 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 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. 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 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, 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, 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 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:

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 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, 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 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 antagónico inhibe el desarrollo 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, 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.

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 señalar 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 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 señalar, 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 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 carcinoma 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.

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.

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 dirigiendo 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"*, 3ª Ed., p. 208-209). Los complejos receptor soluble/citocina para IL12 y CNTF exhiben actividades similares.

El zcyto17lig 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 zcytor17lig se pueden usar para detectar polipéptidos zcytor17lig circulantes; de forma inversa, se puede emplear zcytor17lig 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 zcytor17lig 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 zcytor17lig, 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 zcytor17lig, 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 linfoides 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 zcytor17lig suficiente para producir un incremento en el número de células linfoides de la médula ósea o de células de sangre periférica, en comparación con células de sangre periférica o médula ósea cultivadas en ausencia de zcytor17lig. En otras realizaciones, las células hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, las células linfoides 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 zcytor17lig 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 zcytor17lig 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 zcytor17lig 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 retroviral, 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 direccionados (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 tumorigenicidad de tumores pancreáticos y de mama humanos. Esto indica que el zcytor17lig puede desempeñar una función en la regulación de la tumorigenicidad 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 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 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, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, por perfusión a través de un catéter regional, 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 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 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 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 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 tamponada con fosfato es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente 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 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 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, 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 compartimientos 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

liposomas pueden variar en tamaño con diámetros que oscilan entre 0,02 μm a más de 10 μm . 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 endocitosado 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 μm) 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 μm 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 direccionar 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 direccionar 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 dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) direcciona 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 direccionar 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 asialofetuina condujo a una semivida en plasma acortada y potenció en gran medida la absorción de los liposomas marcados con asialofetuina 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 asialofetuina (Murahashi *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Los liposomas de albúmina de suero humano poliacetonilado proveen otro planteamiento para direccionar 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)).

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.

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^a 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).

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).

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.

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. 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.

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.

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

ES 2 310 660 T3

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 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 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 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.

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) 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.

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 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 zcytor17lig, 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 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 número 104-117; (f) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de 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: 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 epítipo antigénico de acuerdo con un perfil de hidrofiliidad de Hopp/Woods de la SEC ID NO: 2 o la SEC ID 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 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.

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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 zcytor17lig 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 zcytor17lig 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 zcytor17lig, 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 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 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 zcytor17lig 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 zcytor17lig 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 zcytor17lig, 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 zcytor17lig desempeña una función, que comprende: administrar un antagonista de zcytor17lig 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 zcytor17lig (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 una 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; 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.

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

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 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. El producto PCR se pasó por gel de agarosa al 1% y se aisló el fragmento de aproximadamente 460 bp, usando el kit de extracción de gel Qiaquick™ (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

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 gel Qiaquick, siguiendo las instrucciones del fabricante.

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 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.

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 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

Se mantuvo BaF3, una interleucina 3 (IL-3) dependiente de la línea celular prelinfoide 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 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 5x.1 mseg 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 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 capacidad de señalización, como se describe a continuación.

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 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 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 microlitros 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 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).

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

Ejemplo 3

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

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.

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 aproximadamente 600 bp resultante se purificó con gel y se usó para una ligadura para formar un cDNA de longitud total.

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

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 XhoI. 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 XhoI para generar un fragmento de 1075 bp, y también se digirió con XhoI 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 electroMAX™ (25 µF, 200Ω, 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 pZP7Z/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 µg del vector de expresión de zcytor17 descrito en el Ejemplo 3A. Una excepción es que en lugar de selección de Geneticina, se añadieron 2 µg/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.™ (InVitrogen). Se sintetizó cDNA de la primera cadena, usando el kit de RT-PCR de primera cadena proSTAR™, 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 µg 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 µg/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.™ (InVitrogen). El cDNA de la primera cadena se sintetizó usando el kit de RT-PCR de primera cadena proSTAR™, 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 µg 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.™ (InVitrogen). Se sintetizó cDNA de la primera cadena, usando el kit de RT-PCR de primera cadena proSTAR™, 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.

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 Puomicina (ClonTech) a las células transfectadas en un matraz T-162 para aislar la mezcla resistente a puomicina. 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 μ g 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

Cribado de zcytor17lig que utiliza células BaF3/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

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 μ g/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

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.

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/zcytor17/WSX-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).

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

Se extrajeron 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 $1,2 \times 10^9$ células.

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 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 3×10^8 células totales.

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+.

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.

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

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.

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/zcytor17/WSX-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.

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 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

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.

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 pZP7NX se construyó de la siguiente manera: la región codificante para el marcador selectivo DHFR en el vector pZP7 se eliminó por 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 ZC13,945 (SEC ID NO: 29), y pZeoSV2(+) como molde. Hay sitios de restricción adicionales PstI y BclI 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 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 (BclI 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 XhoI 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 digirieron 20 μg de pZP7NX con 20 unidades de EcoRI (Life Technologies Gaithersburg, MD) y 20 unidades de XhoI (Boehringer Mannheim Indianapolis, IN) durante 5 horas a 37°C, luego 68°C durante 15 minutos. La digestión se pasó luego por un gel IXAE 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. Después 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 $1,5 \times 10^8$ 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 siguiente 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 1,0 μl de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cebador de primera cadena ZC18,698 (SEC ID NO: 30) que contenía un sitio de restricción XhoI, 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 ditiotretol 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 desnaturalizar 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 ditiotretol 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. Después 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 enomó 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 ditiotretol 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.). Después 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 μl 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 *XhoI*, resultando en un cDNA que tenía un extremo 5' cohesivo de RI *Eco* y un extremo 3' cohesivo de *XhoI*. El sitio de restricción *XhoI* 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 *XhoI* (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 GTG™; 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 rellenar 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 μ l de agua.

20 Para determinar la relación óptima de cDNA al vector, se ensamblaron varias ligaduras y se sometieron a electroporación. 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 ElectroMax™ (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 (Manniatís *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 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 transfectó posteriormente a células BHK, medio condicionado 72 horas, se cosechó y se conservó a -80°C, y luego se dispuso en 5K de células 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 II™ (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 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 SuperBrothII™ + *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-Fill2™ (Genetix, Christchurch, Dorset, Reino Unido). Las *E. coli* 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 centrífuga Beckman GS-6KR. Estos sedimentos de *E. coli* se congelaron a -20°C o se usaron nuevos antes de miniprep-
65

Estas mezclas de 250 clones de cDNA se miniprepararon luego usando el kit QIAprep™ 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), GlutaMax™ 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/Lipofectamine™ de la siguiente manera: se combinaron 2,2 μ l de reactivo Lipofectamine™ (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 Lipofectamine™/SFA para formar la mezcla DNA/Lipofectamine™, 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/Lipofectamine™ durante 5 horas a 37°C con 5% CO₂. Se añadieron 50 μ l de la mezcla DNA/Lipofectamine™ 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/Lipofectamine™ durante 5 horas, la mezcla DNA/Lipofectamine™ 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 ElectroMax™ 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 SuperBrothll™ 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 transfectó 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

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 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 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, 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 cribaron por análisis de restricción, o PCR de DNA preparado a partir de 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

Se preparó un vector de expresión, pEZE-2 hzytor17/Fc4, para expresar una versión soluble marcada C-terminalmente con Fc4 de hzytor17 (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 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 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 BglII 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 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 BglII 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 resultante se ligó durante 5 horas a temperatura ambiente en un vector pEZE-2 previamente digerido con FseI y BglII que contenía Fc4 3' de los sitios FseI y BglII.

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 Qiagen Maxi (Qiagen).

Se disponen en placas células BHK 570 (ATCC No. CRL-10314), DG-44 CHO u otras células mamíferas, a aproximadamente $1,2 \times 10^6$ 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 transfectan con plásmidos de expresión que contienen zcytor17CEE, zcytor17CFLG, 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.

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 tripsinizó 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 nM. Al cabo de una semana, las células se sembraron a 4X10⁵ células/ml en una selección MTX 1 µM. Después 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 µM. Las combinaciones de HT 50 nM, y 1 µM 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.

Ejemplo 10

*Purificación de receptores solubles zcytor17 de células BHK 570 y CHO*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). Después de 72 horas, el medio se recogió y filtró, y las células se realimentaron con medio libre de suero. Después de 72 horas, el medio se recogió y filtró nuevamente.

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.

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.

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. Después 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 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).

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 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. Después 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.

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 dimerica de zcytor17-Fc4 bajo condiciones no reductoras, según lo esperado.

Ejemplo 11

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

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 $\mu\text{g/ml}$. El volumen de ensayo total fue 200 μl .

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 $\mu\text{l/pocillo}$. 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 $\mu\text{g/ml}$, confirmando que el factor en cada muestra fue específico del receptor zcytor17.

Las curvas de valoración, diluyendo el receptor soluble o los heterodímeros del receptor soluble que comprendían zcytor17/OSMR y zcytor17AVSX-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.

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

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 transfectó 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

La transfección de células COS se realizó de la siguiente manera: 800 ng de cDNA de zcytor17lig y 4 μl de LipofectamineTM se mezclaron en 80 μl de medio DMEM libre de suero (55 mg de 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), y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se añadieron 320 μl de medio DMEM libre de suero. Esta mezcla de 500 μl 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 μl 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

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 $\mu\text{g/ml}$ proteína de fusión zcytor17-Fc4 receptor soluble zcytor17 (Ejemplo 10); o (B) 1-3 $\mu\text{g/ml}$ 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.

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 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

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
10 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 una extensión de 1 ciclo final de 7 minutos a 72°C. Las reacciones se separaron por electroforesis en un gel de agarosa
15 al 2 (EM Science, Gibbstown, NJ) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

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
20 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 cribaron varias fuentes de cDNA por PCR, incluyendo cDNA Marthon-ready (Clontech) y 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.
40 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 ZC41584 (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 *mcycor17lig* 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 *mcycor17lig* 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 *mzcytor17lig* 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
60 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).

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.

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.

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 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 metilicina. 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™ (Clontech), 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, desnaturalizan, 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 ³²P, usando el kit de marcado de cebadores aleatorio Prime-Itr RmT (Stratagene). Los 10 filtros se hibridan con esta sonda marcada a 65°C durante una noche, usando la solución de hibridación ExpressHyb™ (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

Se transfectó el DNA del clon de ratón mzcyc17lig/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.

15

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.

La captura de secreción se llevó a cabo según el ejemplo 12 usando, por ejemplo, 1 µg/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.

25

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

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 mzcyc17lig/pZP7X (Ejemplo 14), usando un kit de transfección estable de mamífero Lipofectamine (GibcoBRL) según las instrucciones del fabricante.

40

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 matraces 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.

45

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).

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.

65

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 ZC12,748 (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 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 cribaron por ensayo de luciferasa (véase Ejemplo 20B a 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 línea celular. 25

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 BHK7KZ134/zcytor17/OSMRbeta, dependiendo de los receptores transfectados a la línea celular. 30

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

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 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. 40

La activación de STAT de las células BaF3/KZ134/Zcytor17, BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta, BHK/KZ134/zcytor17 o BHK/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 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 tampón 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 del ensayo de luciferasa (Promega) a una integración de cinco segundos. 55

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. 60

65

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 cuidadosamente 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 10⁶ 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

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 un anticuerpo de linfocitos citotóxicos 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 citotóxicos 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.

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.

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).

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 (Boehringer-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 ElectroMax™ (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 incuban 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. 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*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1994.

B. Constructo para expresión de zcytor17lig humano del promotor EµLCK específico de linfoides

Se designan oligonucleótidos para generar un fragmento PCR que contiene una secuencia Kozak de consenso y la 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 pKF051, 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 pKF051 previamente digerido con FseI y AscI. El vector pKF051 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).

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 pKF051-zcytor17lig secuenciando, y se realiza una maxipreparación de este clon. Un fragmento NotI, que contiene el promotor Ick proximal y el potenciador µ de inmunoglobulina (EµLCK), cDNA de zcytor17lig y el gen hGH mutado se prepara para microinyección a oocitos de murino fertilizados.

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 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 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 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 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 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 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

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 EμLCK específico de linfoides*

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).

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 pKFO51, un vector transgénico 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 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 (EμLCK), cDNA de zcytor17lig de ratón y el gen hGH mutado, para usar para microinyección a oocitos murinos fertilizados (Ejemplo 41).

Ejemplo 23

Construcción de vectores de expresión mamífera que expresan zcytor17lig-CEE

A. *Construcción de zCyt17Lig-CEE/p2MP21*

Se construyó un plásmido de expresión que contenía todo o parte de un polinucleótido que codifica el zCyt17lig humano, vía recombinación homóloga. El plásmido se denominó zCyt17Lig-CEE/pZMP21.

La construcción de zCyt17Lig-CEE/pZMP21 se logra generando un fragmento zCyt17Lig-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 zCyt17Lig-CEE fue zCyt17Lig/pZP7nx. Los cebadores utilizados para la producción del fragmento zCyt17Lig-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 zCyt17Lig; 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 zCyt17Lig. El fragmento resultante de la ampliación PCR anterior es una copia del molde zCyt17Lig con la adición de un marcador C-terminal EE, lo que proporciona un producto final zCyt17Lig-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 ZC41607 (SEC ID NO: 97) 3 μl de un stock 20 pmol/μl del cebador ZC43605 (SEC ID NO: 98) y 2 μl de un stock 0,13 μg/μl del DNA del molde zCyt17Lig. 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 que se recogió la reacción.

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 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*.

Se combinaron independientemente 50 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 levadura/DNA se electropulsó a 0,75 kV (5 kV/cm), ohms infinito, 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 y en una alícuota de 300 μl 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 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 zCyt17Lig de longitud total en células BHK transfectadas con zCyt17Lig-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 transfectaron con zCyt17Lig-CEE/pZMP21 por transfección mediada por liposomas (usando Lipofectamine[™]; 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 Pvu1, 1 μ g enlazador y 1 μ g pRS315 cortado con ScaI/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.

Después 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 Kanomicina durante dos horas, agitando a 37°C. Se indujo 1 ml del cultivo con IPTG 1 mM. Dos a cuatro 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 1X MES. Los clones positivos se designaron pCMHOI y se sometieron a análisis de secuencias.

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. Después de la electroporación, se añadieron 0,6 ml MM/CA con 25 μ g/L Kanomicina. 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*

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.

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 A₆₀₀ 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.

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.

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. Después 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.

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).

Ejemplo 25

Anticuerpo policlonal del receptor soluble zcytor17 humano

A. Preparación y purificación

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

intraperitoneal (IP) de 200 µg de proteína purificada en Adyuvante de Freund Completo seguida de inyecciones IP de refuerzo de 100 µg 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.

El suero de conejo específico de huzcytor17/MBP-6H se preadsorbió de anticuerpos anti-MBP, usando una columna de proteína CNBr-SEPHAROSE 4B (Farmacia 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 de proteínas CNBr-SEPHAROSE 4B (Farmacia 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 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

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 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-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 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

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 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 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 ID 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 control positiva de DNA genómico de ratón (Clontech, Palo Alto, CA). Cada pocillo contenía aproximadamente 0,2-100 pg/µl 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 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 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.

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		

Ejemplo 27

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

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

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

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.

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).

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 OSMRbet, 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).

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 marco 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).

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.

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

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.

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

(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).

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-γ-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%.

TABLA 7

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

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 IFN γ 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 μ g/ml anticuerpos anti-CD3 en medio que contiene 5 μ g/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 μ g/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 IFN γ (10 ng/ml) para conducir las hacia una vía monocítica. Las células THP-1 se activaron durante una noche con una combinación de LPS (10 ng/ml) e IFN γ (10 ng/ml). Se preparó RNA a partir de todas las células primarias, usando el kit RNeasy MidiprepTM (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El DNA remanente se eliminó usando el kit DNA-FreeTM (Ambion, 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 bazo 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 μ g/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 μ g/ml PMA y 10 ng/ml ionomicina. La inclinación "Th2" se obtuvo disponiendo células T CD4+ naturales con 2,5 μ g/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 μ g/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 μ g/ml). Las células "Th2" se dispusieron en placas en medio que contenía mIL-4 (10 ng/ml) y anti-IFN γ (10 μ g/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.

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

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. 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 del sacrificio, se extirparon las secciones distales del colon y se colocaron en RNeasy Lysis Buffer (Qiagen). Las secciones del colon se homogeneizaron usando técnicas convencionales, y se aisló el RNA usando el kit RNeasy Midiprep™ (Qiagen). Se eliminó el DNA contaminante por tratamiento con DNA-free™ (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 Midiprep™.

Incluso en otro estudio, se generaron ratones transgénicos de Zcytor17lig murino y se observaron para detectar cambios genotípicos (véase Ejemplo 41). Se observaron alopecia 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 Midiprep™, siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA remanente se eliminó usando el kit DNA-free™ de Ambion.

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 IFNγ 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 IFNγ, 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.

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 de tiempo de la hora 16.

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 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 IFNγ durante 72 y 96 horas. Todos los datos de expresión humana se resumen a continuación en la Tabla 8.

TABLA 8

Monocitos humanos primarios	Estado de activación	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17lig
Monocitos humanos	Sin estimulación	-	-	-
Monocitos humanos	Act. 24 h IFN γ	+	-	-
Monocitos humanos	Act. 48 h IFN γ	++	-	-
CD4+ humana	Sin estimulación	-	-	-
CD4+ humana	Act 4 h	++	-	++
CD4+ humana	Act. 16 h	+	-	+
CD8+ humana	Sin estimulación	-	-	-
CD8+ humana	Act 4 h	++	-	++
CD8+ humana	Act. 16 h	+	-	+
NK humanos	Sin estimulación	-	-	-
NK humanos	Act 24h	-	-	+
U937	Sin estimulación	++	-	-
U937	Act. 16 h	+++	-	-
THP-1	Sin estimulación	++	-	-
THP-1	Act. 16 h	+++	+	-
HL-60	Sin estimulación	++	-	-
HL-60	Act. 16 h PMA	+	-	-
HL-60	Act. 72 h IFN γ	+++	-	-
HL-60	Act 96 h IFN γ	+++	-	-

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

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.

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.

En las células T CD44 primarias que se inclinaron hacia la dirección Th1 o Th2, no se examinó el Zcyto17. 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			
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 caeruléina. Los datos se resumen en la Tabla 11 a continuación.

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 colonos 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 cicladore de 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, desnaturalización 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.

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 ZcytoR17 tiene similitud estructural con IL12R-B1. Se ensayaron OSMRbeta y zcytor17 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 zcytor17lig.

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 (Clontech, 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/ μ l de cada oligonucleótido y 2-20 ng/ μ l de DNA de la genoteca del plásmido purificado como molde. Las genotecas de cDNA derivaron de los siguientes 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 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: desnaturalización a 94°C, 30 segundos, desnaturalización a 63°C, 45 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 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, 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 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 PstI 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 PstI y XhoI, y se volvió a clonar en el plásmido pZP7Nx-h OncostatinM R en lugar del fragmento PstI/XhoI que contenía la mutación ofensiva. Este nuevo plásmido se secuenció sobre la región PstI a XhoI recientemente ampliada para confirmar la corrección y asegurar que no se hubiesen creado errores en el proceso de ampliación. Este análisis 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 Zcytor17/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 onconstatin M humano (OSMRbeta) y zcytor17 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 zcytor17 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 hzcytor17 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 domino extracelular de zcytoR17 se condensó a Fc4 (SEC ID NO: 37) con un marcador His (SEC ID NO: 72) en el término C. Para ambos brazos de hzcytor17 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.

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 BglII (Boehringer-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 (Boehringer-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/Sma1 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 (Boehringer-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 BglII 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 zcytoR17, 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 (Boehringer-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 (Boehringer-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 (Boehringer-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 (Boehringer-Mannheim). La reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y precipitó etanol. El DNA digerido se trató luego con DNA Polimerasa T4 (Boehringer-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 (Boehringer-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 transfectó 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 sondearon 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 ID 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 amplificar 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 ribosómica 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/ μ l 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 TaqTM (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, 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 μ l 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.

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.

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	Tiroides	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 Ionomicina + 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	HL-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

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 *zcytoR17* 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
Hel 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, TNFα 24 horas	0

Células y condiciones	Puntaje 0-5
PBMC humana estimulada con LPS, PWM, IFN γ , TNF α , 24 horas	0
PBMC humana bajo todas las condiciones indicadas más arriba durante 48 horas	4
HUVEC p.2	4
RPMI1788	0
TF1	0
Células T de bazo de mono estimuladas con PMA, Ionomicina	0
Epitelio de próstata humano transformado con HPV	5
Amígdalas humanas inflamadas	0
HACAT	0
Condrocito humano	1
Sinoviocito humano	1
THP1	5
REH	0

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 Jolla, CA) a 68°C durante una noche, usando una sonda para zcytoR17 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 ³²P (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 sonda U937, mientras que se observó una banda más tenue en la sonda THP1.

Para optimizar el cDNA utilizado como sonda de hibridación, se ampliaron por PCR cuatro regiones diferentes de la secuencia humana zcytoR17 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). El DNA genómico humano, junto con las genotecas de cDNA ampliadas que demostraron contener zcytoR17 por PCR, se digirieron con EcoRI y XhoI 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 ende, la Sonda B se utilizó para todas las hibridaciones subsiguientes.

Dado que las células THP1 son un excelente modelo de monocitos circulantes y expresaron zcytoR17 a niveles bajos, se trataron con una diversidad de compuestos en un esfuerzo por aumentar la expresión de zcytoR17. 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 μ g/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), hMCSF 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, San Diego, 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 μ g 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 zcytoR17 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 sonda 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 sonda 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 zCyt17Lig-CEE/pZMP21

Se construyó un plásmido de expresión que contenía todo o parte de un polinucleótido que codifica zCyt17Lig-CEE (SEC ID NO: 95) vía recombinación homóloga. El plásmido se denominó zCyt17Lig-CEE/pZMP21.

La construcción de zCyt17Lig-CEE/pZMP21 se logró generando un fragmento zCyt17Lig-CEE, usando ampliación PCR. El molde de DNA utilizado para la producción del fragmento zCyt17Lig-CEE fue zCyt17Lig/pZP7nx. Los cebadores utilizados para la producción del fragmento zCyt17Lig-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 zCyt17Lig; 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 zCyt17Lig. El fragmento resultante de la ampliación PCR ya mencionada fue una copia del molde zCyt17Lig con la adición de un marcador C-terminal EE, proporcionando un producto final zCyt17Lig-CEE.

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 dH $_2$ O, 3 μ l de un stock 20 pmol/ μ l del cebador ZC41,607 (SEC ID NO: 97) 3 μ l de un stock 20 pmol/ μ l del cebador ZC41,605 (SEC ID NO: 98) y 2 μ l de un stock 0,13 μ g/ μ l del molde de DNA zCyt17Lig. 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 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 μ l 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 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

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 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 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 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 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 con las instrucciones del fabricante.

B. Construcción de zCyt17Lig(m)-CEE/pZMP21 de ratón

Se construyó además un plásmido de expresión que contenía todo el polinucleótido que codifica el zCyt17Lig-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 zCyt17Lig(m)-CEE. El plásmido 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

Transfección y expresión de polipéptidos zcytor17lig-CEE

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

Se expresó ZCyt17Lig-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 $6,5 \times 10^4$ 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.

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 zCyt17Lig-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 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.

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 proteínas (Ejemplo 35).

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

La proteína zCyt17Lig de longitud total se produjo en células BHK transfectadas con zCyt17Lig-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 zCyt17Lig-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 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:lipido. 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/lipido 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

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

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 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.

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 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.

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.

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. Después 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. Después 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*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).

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-cicládolo con Biobrene™.

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.

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).

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.

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

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 transfectó 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.

A. *Transfección de células COS*

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 + pZp7Z/WSX-1; pZp7NX/OSMR + pZp7Z/WSX-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 incubaba 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 incubaba 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 incubaba durante una noche.

B. *Ensayo de unión*

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 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.

Ejemplo 38

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

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

Se crió 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. Los filtros se marcaron con una aguja caliente para orientación y luego se desnaturalizaron 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.

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).

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®, Stratagene, La Jolla, CA). La sonda se desnaturalizó 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 colonias sencillas se recogieron y enviaron a secuenciación. Se determinó que tres de éstas contenían la secuencia del ortólogo de ratón de zcytoR17.

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 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.

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.

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 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 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).

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 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 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 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.

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

Se transfectaron las líneas celulares estables BaF3/KZ134 y BHK/KZ134 (Ejemplo 20) con un plásmido de 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 transfectó 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 con, además de Geneticina, 2 µg/ml puromicina, mientras que BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam y BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam se seleccionaron con, además de Geneticina, 2 µg/ml puromicina y 200 µg/ml zeocina.

Los clones se diluyeron, se dispusieron en placas y se seleccionaron usando técnicas convencionales. Los clones se cribaron 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.

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 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 biotinylation 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 biotinylation, la solución se dializó en PBS usando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer.

10 Para ensayar las propiedades de unión del zcytor17lig humano a diferentes combinaciones de receptores, ambas células BHK y BAF3 se transfectaron con plásmidos de expresión usando técnicas convencionales conocidas en el campo. Estos plásmidos se transfectaron 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 transfectadas como controles. Las células se tiñeron por FACS de la siguiente manera: se tiñeron 15 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, 20 Mountain View, CA).

25 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 concentración. Los valores de intensidad fluorescente media (MFI) para la unión de BHK se exponen en la Tabla 15.

TABLA 15

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

45	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
50	BAF3-WT	13	13	12	12	12	12	13

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

60

Ejemplo 40

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

65

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.

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).

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.

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).

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 (Grunig *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).

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; 277(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; 277(12): 10387-10393). Este receptor carece, no obstante, del dominio citoplásmico 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; 277(12):10387-10393).

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 desee 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.

Ejemplo 41

Ratones transgénicos con zcytor17lig murino

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 *Eμ/lck*, y el promotor ubicuo, *EFlα* (Ejemplo 22). Los niveles de proteína en el suero oscilan entre aproximadamente 20-300 ng/ml. El promotor *Eμ/lck* generó ratones con niveles más altos de proteína en suero que aquellos de los ratones transgénicos de *EFlα-zcytor17lig*.

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 *Eμ/lck*, y 50% incidencia en ratones transgénicos *EFlα-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 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 exacerbaban por la conducta de rascado de los animales.

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 μ /lck* expresó más RNA de zcytor17lig que la piel de ratones transgénicos con *EFl α -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 zcytor17lig.

Un examen de los tejidos linfoides de un subconjunto de los fundadores transgénicos de *E μ /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, 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.

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 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 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, 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).

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, alérgenos 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 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* exagera la AD y perpetúa la cronicidad de esta enfermedad de la piel.

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 para la AD, los síntomas de muchos pacientes no mejoran, o tienen reacciones adversas a los medicamentos, lo que requiere la búsqueda de otros agentes terapéuticos más eficaces.

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 alérgenos 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.

Ejemplo 42

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

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.

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).

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

(Tabla pasa a página siguiente)

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	Poligonal	Melanoma	Negativa
Sk-Mel-2	Humana	Piel	Epitelial	Melanoma	2,7x
WM-115	Humana	Piel		Melanoma	2x

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
HLB-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	Epitelial		Negativa

ES 2 310 660 T3

Ejemplo 43

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

Se cribaron 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

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 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 Quimioatrayente 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 de citocinas (pg/mL) para cada línea celular en las muestras de 24 horas se muestra en la Tabla 17 a continuación.

TABLA 17

GM-CSF

pg/mL

	A549	SkLu1	DUI45	U2OS	PZ-HPV-7
zcytor17L	18,80	10,26	16,19	13,26	14,10
IFN-g	16,19	13,36	11,56	16,26	11,81
IL-1b	104,60	126,44	76,77	338,25	27,32
TNFa	106,67	33,20	58,50	107,09	33,79
LPS	17,64	10,62	11,81	25,47	18,34
control	14,81	8,56	13,26	21,67	13,96

IL-1bpg/mL

	A549	SkLu1	DUI45	U2OS	PZ-HPV-7
zcytor17L	26,90	30,17	28,77	29,07	28,00
IFN-g	29,07	35,33	21,96	26,90	26,73
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
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	zcytor17L	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
	TNFa	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	zcytor17L	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
	TNFa	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
35	zcytor17L	8,97	187,29	26,84	105,15	7,20
40	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	TNFa	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

TNFa pg/mL

		A549	SkLul	DUI45	U2OS	PZ-HPV-7
55	zcytor17L	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
	TNFa	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 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

Además de líneas celulares epiteliales humanas, se ensayaron células epiteliales humanas normales (NHBE, Clo-netics). 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 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

IL-6 pg/ml

	A549	DU145	SkLul	U2OS	NHBE
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
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
IFNa	24,6	109,3	33,7	26,4	52,4
TGFb	24,4	102,6	42,7	27,8	268,9
control	24,5	36,3	29,9	25,2	47,9

IL-8 pg/ml

	A549	DU145	SkLul	U2OS	NHBE
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
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
IFNa	18,9	315,3	39,5	33,1	231,6
TGFb	9,9	77,5	19,6	88,9	246,9
control	10,9	238,0	38,0	39,7	315,8

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	TNFa	nd	22,1	2862,6	1104,7	nd
	OSM	nd	17,2	448,2	85,8	nd
	IFNa	nd	nd	131,7	10,5	nd
15	TGFb	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.

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
45		10ng/ml IFNg	35,4	nd
		control	36,6	nd
	DU145	10ng/mL IFNg+100ng/mL r17L	102,3	nd
		10ng/mL IFNg+10ng/mL r17L	92,9	nd
50		10ng/mL IFNg+1 ng/mL r17L	79,9	nd
		10ng/ml IFNg	70,7	nd
		control	79,4	nd
55	SkLu1	10ng/mL IFNg+100ng/mL r17L	152,2	604,9
		10ng/mL IFNg+10ng/mL r17L	194,4	870,7
		10ng/mL IFNg+1 ng/mL r17L	138,7	585,4
60		10ng/ml IFNg	170,8	652,6
		control	203,0	292,3
65	U2OS	10ng/mL IFNg+100ng/mL r17L	106,8	357,0
		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.

Ejemplo 44

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

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.

Dieciocho horas después de la adición de zcytor17lig y el resto de los reactivos de ensayo, las células se pulsaron con 250 nCi/mL [^3H]-timidina (NEN) durante 4 horas. Después del pulso de 4 horas, se desechó el medio y se añadieron 100 μL 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 contando la etiqueta incorporada, usando un contador de centelleos para microplacas Packard TopCount NXT.

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.

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

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

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.

El vector pTAP98 se construyó usando recombinación homóloga de levadura. Se recombinaron 100 nanogramos de pMAL-c2 cortado con EcoRI, con 1 μ g pRS316 cortado con PvuI, 1 μ g enlazador, y se combinó 1 μ g pRS316 cortado con SmaI/EcoRI 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 90 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 pRPSOI y se sometieron a análisis de secuencias.

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 μ F 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 ITPG y se cribaron 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*

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 pRPSOI 1 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.

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.

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.

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 huzcytor17Lig/MBP-6H purificado. El polipéptido huzcytor17Lig/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 huzcytor17Lig/MBP-6H se determinó por análisis BCA en 1,28 mg/mL.

Ejemplo 46

Anticuerpo policlonal de zcytor17lig humano

A. Preparación y purificación

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 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.

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 tiempo de por lo menos 8 horas. Los anticuerpos específicos de Huzcytor17-Ligando se caracterizaron por ELISA, usando 500 ng/ml de las 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

Se ensayó anticuerpo ZcytoR17lig MBP-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, 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 el zcytoR17lig MBP-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.

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.

Ejemplo 47

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

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 Biologies) enriquecido con Complemento de Desarrollo Microvascular (MVGS) (Cascade Biologies). 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.

Después de incubar durante una noche las células endoteliales con los reactivos de ensayo (ligando zcytor17 ± TNFalfa), las células U937, teñidas con 5 µM 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 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 ($\text{adherencia neta/total neta} \times 100 = \% \text{ adherencia}$).

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, aumento 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.

TABLA 21

	Basal	0,3ng/mL TNFalfa
Basal	5,8±1,2	35±5,5
Zcytor17lig 0,4ng/mL	9±0,7	44,7±2,5
Zcytor17lig 1,1ng/mL	10,4±0,8	45,2±0,6
Zcytor17lig 3,3ng/mL	7,9±1,7	51,1±4
Zcytor17lig 10ng/mL	9,5±0,5	56,6±3,9

REIVINDICACIONES

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:
- (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.
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.
4. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo de:
- (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;
 - (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;
 - (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;
 - (k) residuos aminoácido 34-39 de la SEC ID NO: 11;
 - (l) residuos aminoácido 46-51 de la SEC ID NO: 11;
 - (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;
 - (p) residuos aminoácido 126-131 de la SEC ID NO: 2;
 - (q) residuos aminoácido 158-162 de la SEC ID NO: 2;
- 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.
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:

(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;

(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;

un segundo espaciador de 5-11 residuos aminoácido;

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

(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;

(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 una secuencia de residuos aminoácido seleccionados del grupo de:

(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;

(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.

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:

(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;

(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;

un primer espaciador de 6-27 residuos aminoácido;

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

(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;

10 (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;

15 (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;

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

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.

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:

30 (a) el polipéptido que se muestra desde los residuos 38 (Val) hasta 152 (Leu), como se muestra en la SEC ID NO: 2;

35 (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

40 (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;

50 (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:

60 (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:

65 (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.

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

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:

20

(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;

25

(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;

30

(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;

35

(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;

40

(i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 desde el aminoácido número 27 hasta el 164;

45

(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;

50

(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;

55

(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;

60

(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.

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:

(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.

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.

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.

18. Un anticuerpo según la reivindicación 15 para reducir la inflamación por un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

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:

(1) determinar el nivel de una molécula inflamatoria;

(2) administrar dicho medicamento;

(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 una disminución del nivel de la molécula inflamatoria es indicativo de la supresión de una respuesta inflamatoria.

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.

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.

22. Un método según la reivindicación 21, en el que las células hematopoyéticas y los progenitores de células hematopoyéticas son células linfoides.

23. Un método según la reivindicación 22, en el que las células linfoides son macrófagos o células T.

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:

- (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
- (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.

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
- (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.

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.

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

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:

- (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.

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:

- (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.

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.

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.

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.

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:

(a) enfermedad inflamatoria de los intestinos;

(b) colitis ulcerosa;

(c) enfermedad de Crohn;

(d) dermatitis atópica;

(e) eczema; y

(f) psoriasis.

37. Uso según la reivindicación 34, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda.

38. Uso según la reivindicación 37, en el que la enfermedad inflamatoria aguda se selecciona del grupo de:

(a) endotoxemia;

(b) septicemia;

(c) síndrome de choque tóxico; y

(d) enfermedad infecciosa.

39. Uso según la reivindicación 34, en el que el anticuerpo comprende además un radionúcleo, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimiluminiscente, marcador peptídico, partícula magnética, fármaco o toxina.

40. Un método para detectar inflamación en un paciente, que comprende:

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;

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,

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.

41. Un método para detectar inflamación en un paciente, que comprende:

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;

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

- 5 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 zcytor17lig	---ASHTLPVRLLRP	SDDVQKIVEELOSLS	KMLLKD--VEEEKGV		40
2 mzytor17lig	---ATCSLSFGAPIS	KEDLRTTIDLLKQES	QDLNNYSIKQASGM		42
3 mIL-3	ASISGRDTHRLRTL	NCS-SIVKEIIGKL-	--PEP----ELKT--		35
4 hIL-3	APMTQTTPPKTSW-V	NCS-NMIDEIITHLK	QPPLP--LLDFNNLN		41
	46	60 61	75 76	90	
1 zcytor17lig	LVSQNYTLPCLSPDA	QPPNNIHSPAIRAYL	KTIRQLDNKSVIDEI		85
2 mzytor17lig	SADESIQLPCFSLDR	EALTNISVIIAHLEK	VKVLSE-NTVDTSWV		86
3 mIL-3	DDEGPSLRNKS----	-----FRRVNLSKFV	ESQGEVDPEDRYVIK		71
4 hIL-3	GEDQDILMENN----	-----LRRPNLEAFN	RAVKSL--QNASAIE		75
	91	105 106	120 121	135	
1 zcytor17lig	IEHLDKLIQDAPET	NISVPTDTHE---CK	RFILTISQQFSECMD		127
2 mzytor17lig	IRWLTNISCNPLNL	NISVPGNTDESYDCK	VFVLTVLKQFSNOMA		131
3 mIL-3	SNLQKLNCCLPSTAN	DSALPGVFIRDLD--	DFRKKLRFYMHV-LN		113
4 hIL-3	SILKNLLPCLPLATA	APTRHPIHIKGDWN	EFRRKLTFY----LK		116
	136	150 151	165 166	180	
1 zcytor17lig	LALKSLTSGAQOATT				142
2 mzytor17lig	ELQAKDNTTC				141
3 mIL-3	DLETVLTSRPPOPAS	GSVSPNRRGTVEC			140
4 hIL-3	TLENA----QAQQT	LSLAIF			133

FIG. 1

ES 2 310 660 T3

	10	20	30	40	50	
ZCYTOR	MASHSGPSTSVLFLFCCLGGWLASHTLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSLSKMLLKD--VEE					
	:	:	:	:	:	:
M17RL-	MIFHTGTTKPTLVLLCCIGTWLATCSLSFGAPISKEDLRTTIDLLKQESQDLYNNYSIKQ					
	10	20	30	40	50	60
	60	70	80	90	100	110
ZCYTOR	EKGVLVSQNYTLPCLSPPDAQPPNNIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDE-IIIEHLDKLIFQ					

M17RL-	ASGMSADESIQLPCFSLDREALTNI--SVIIAHLEKVKVLSENTVOTSWVIRWLTNISC					
	70	80	90	100	110	
	120	130	140	150	160	
ZCYTOR	DAPETNISVPTDTHE---CKRFILTISQQFSECM-DLALKSLTSGAQQATT					
	X:	X
M17RL-	NPLNLNISVPGNTDESVDCKVFVLTVLKQFSNMAELQAKDNTTC					
	120	130	140	150	160	

FIG. 2

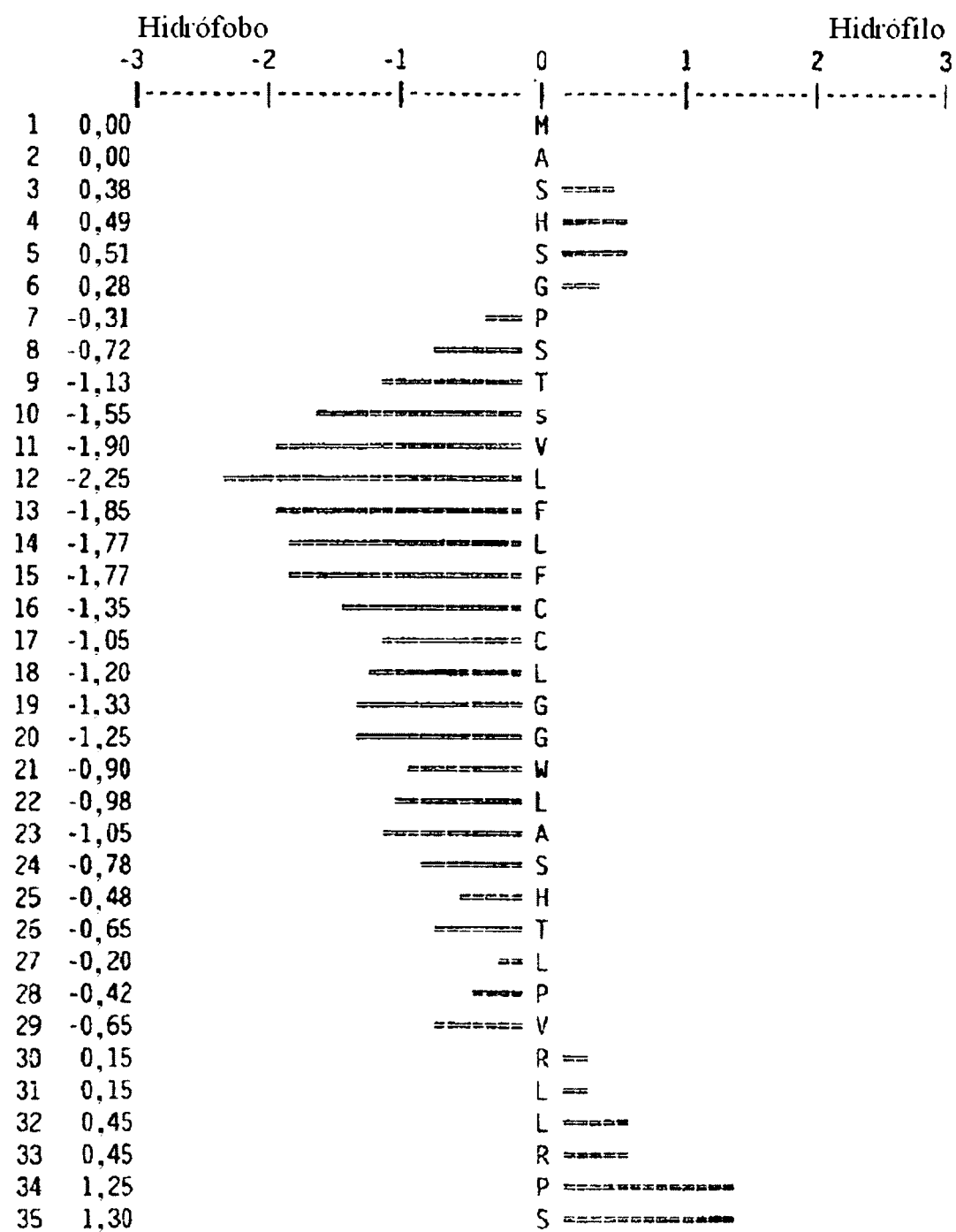


FIG. 3A

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

FIG. 3B

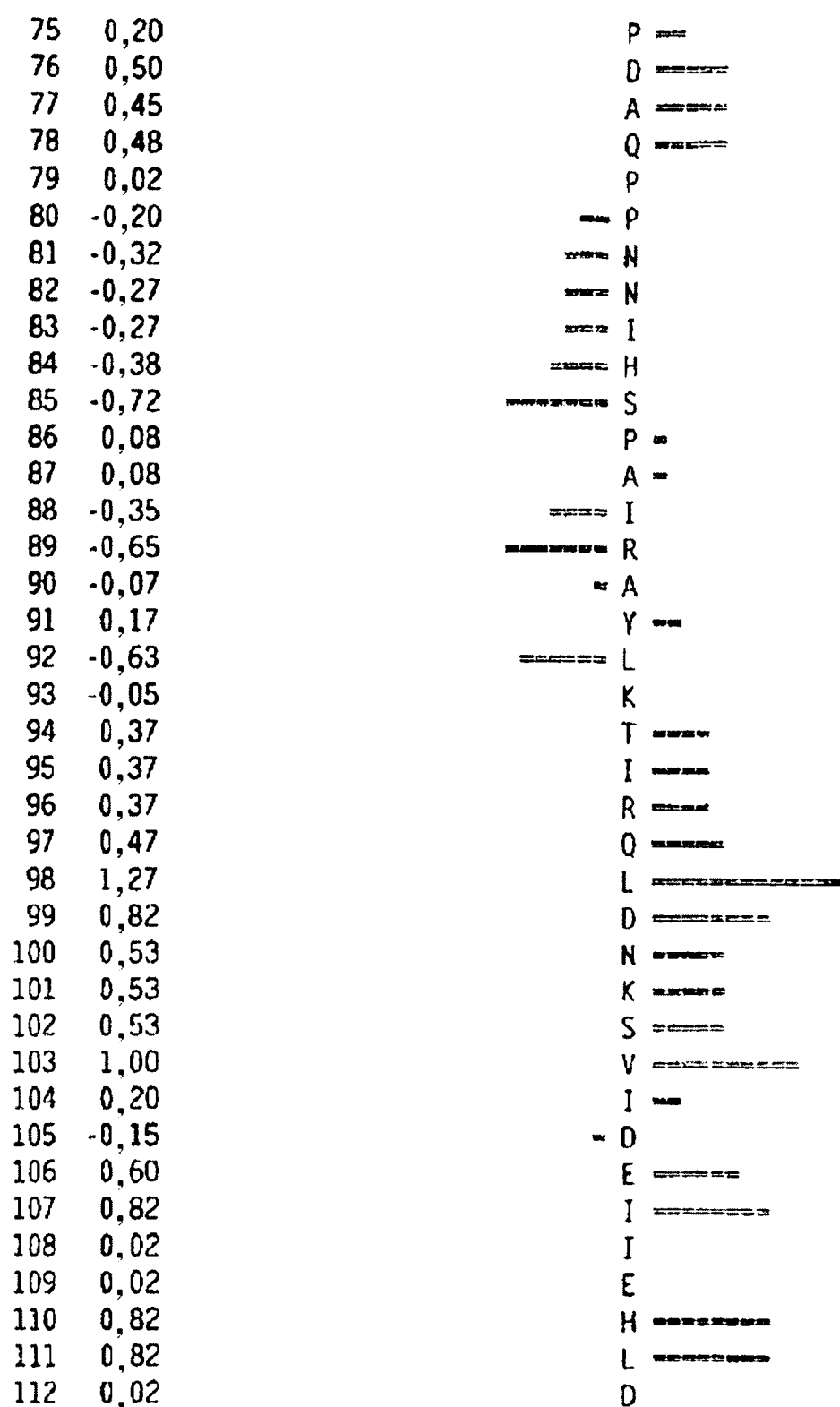


FIG. 3C

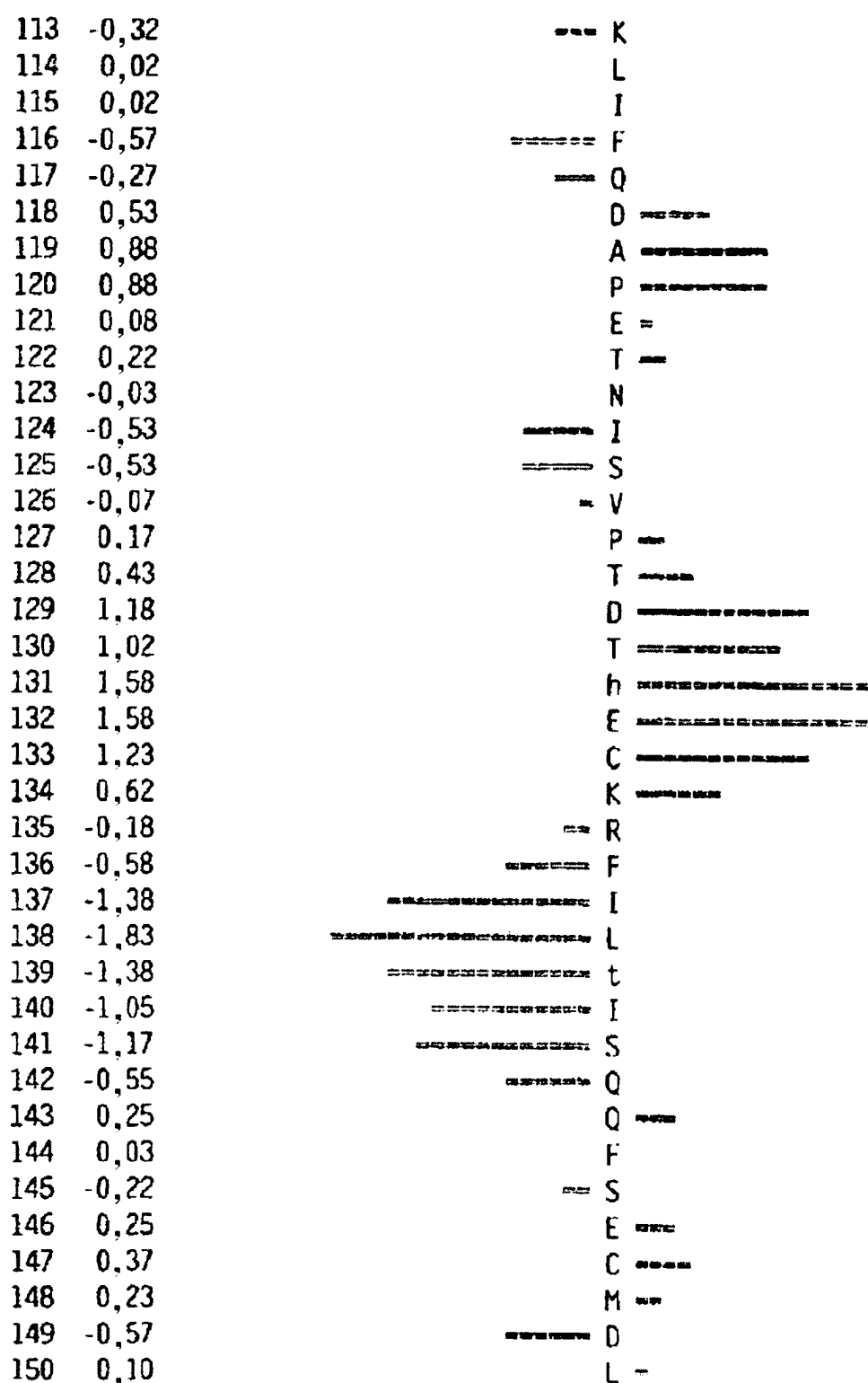


FIG. 3D

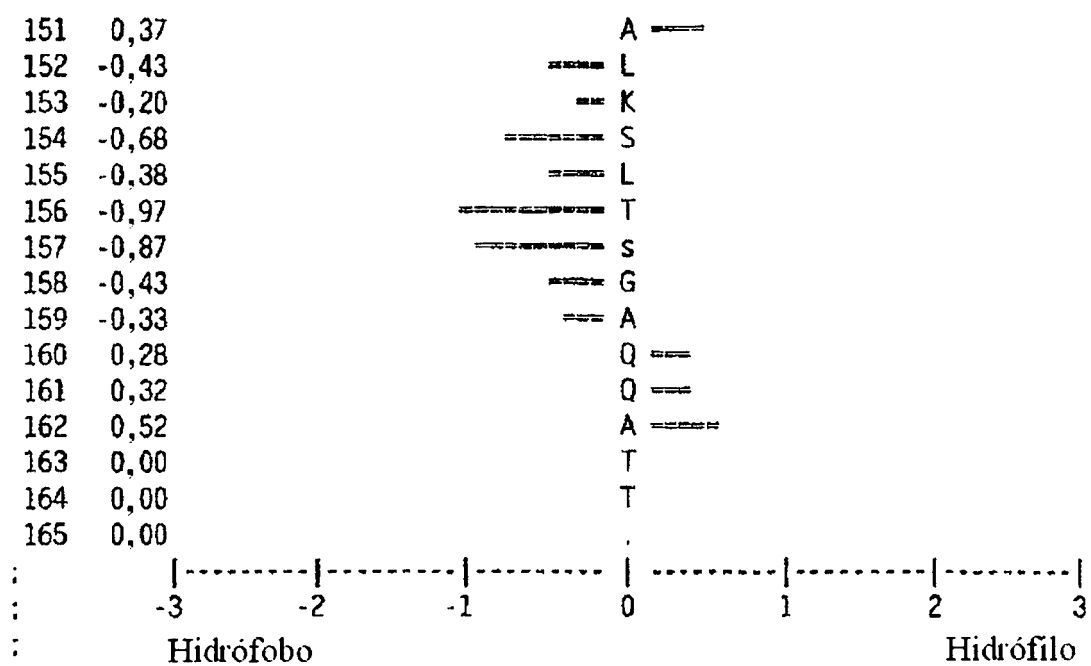


FIG. 3E

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)

30 <400> 1

ctgaagctgg ccttgctctc tctcgcc 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 102
Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His
10 15 20 25

10 acg ttg ccc gtc cgt tta cta cga cca agt gat gat gta cag aaa ata 150
Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile
30 35 40

15 gtc gag gaa tta cag tcc ctc tcg aag atg ctt ttg aaa gat gtg gag 198
Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu
45 50 55

20 gaa gag aag ggc gtg ctc gtg tcc cag aat tac acg ctg ccg tgt ctc 246
Glu Glu Lys Gly Val Leu Val Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu
60 65 70

25 agc cct gac gcc cag ccg cca aac aac atc cac agc cca gcc atc cgg 294
Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg
75 80 85

30 gca tat ctc aag aca atc aga cag cta gac aac aaa tct gtt att gat 342
Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp
90 95 100 105

35 gag atc ata gag cac ctc gac aaa ctc ata ttt caa gat gca cca gaa 390
Glu Ile Ile Glu His Leu Asp Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu
110 115 120

40 aca aac att tct gtg cca aca gac acc cat gaa tgt aaa cgc ttc atc 438
Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile
125 130 135

45 ctg act att tct caa cag ttt tca gag tgc atg gac ctc gca cta aaa 486
Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys
140 145 150

50 tca ttg acc tct gga gcc caa cag gcc acc act taaggccatc tcttccttc 539
Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln Gln Ala Thr Thr
155 160

55 ggattggcag gaacttaagg agccttaaaa agatgaccga cagctaagtg tgggaactct 599

60 gccgtgattc cttaagtaca tttttccaat gaataatctc agggaccct catatgggct 659
agtccccgga gggctgagat gtgaatttgt gaattacctt gaaaaacatt aggttattgt 719
tattagtctt ggtatttatg gaatgctttt cttctgcagg cttaagtctt acttattata 779
ccctcgtgag ggtgggaggt ggcagctatg ttaatttatt gatatttatt gtactaagag 839
ttgtcaatgc tccctggggg agccctcgga atctatttaa taaattatat 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
 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 Glu Lys Gly Val Leu Val
          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
          85          90          95
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
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

```

<210> 3

<211> 492

40 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Polinucleótido degenerado de SEQ ID NO: 2 de zcytor17lig humano

<221> característica miscelánea

<222> (1)...(492)

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

50

<400> 3

```

atggcnwsnc aywsnggncc nwsnacnwsn gtnynttity tnttytgytg yytnggnggn 60
tgytngcnw sncayacnyt nccngtnmgn ytnytnmgnc cnwsngayga ygtncaraar 120
athgtngarg arytnicarws nytnwsnaar atgytnytna argaygtnga rgargaraar 180
ggngtnytng tnwsncaraa ytayacnytn ccntggytnw snccngaygc ncarncccn 240
aayaayathc aywsnccngc nathmgngcn tayytnaara cnathmgncn ryngayaay 300
aarwsngtna thgaygarat hathgarcay ytn गयाary tnathttyca rgaygcncn 360
garacnaaya thwsngtncc nacngayacn caygartgya armgnttyat hytnacnath 420
wsncarcart tywsngartg yatggayytn gcnytnaarw snytnacnws ngngncncar 480
cargcnacna cn 492

```

65

<210> 4

ES 2 310 660 T3

<211> 2903

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

5 <220>

<221> CDS

<222> (497)...(2482)

10 <400> 4

```

    tgaaaagaca tgtgtgtgca gtatgaaaat tgagacagga aggcagagtg tcagcttggt 60
    ccacctcagc tgggaatgtg catcaggcaa ctcaagtttt tcaccacggc atgtgtctgt 120
15  gaatgtccgc aaaacattag ttctactctt gtcgccaggt tggagtacaa tggcacgac 180
    ttggctcact gcaacctctg cctcccgggt tcaagcgatt ctctgcctc agcctccga 240
    gtagctggga ttacagttaa caataatgca atccatttcc cagcataagt gggtaagtgc 300
    cactttgact tgggctgggc ttaaaagcac aagaaaagct cgcagacaat cagagtggaa 360
20  acactcccac atcttagtgt ggataaatta aagtccagat tgttcttcct gtcctgactt 420
    gtgctgtggg aggtggagtt gcctttgatg caaatccttt gagccagcag aacatctgtg 480
    gaacatcccc tgatac atg aag ctc tct ccc cag cct tca tgt gtt aac ctg 532
    Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu
    1 5 10

    ggg atg atg tgg acc tgg gca ctg tgg atg ctc cct tca ctc tgc aaa 580
    Gly Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys
    15 20 25
  
```

35

40

45

50

55

60

65

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
55	gct aag aac cgt aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg Ala Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr 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 gtg 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 Glu 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		

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	1684
	Thr	Thr	Leu	Ser	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	
					385					390					395		
10	cag	caa	gat	aaa	tta	aaa	cct	ttc	tgg	tgc	tat	aac	atc	tct	gtg	tat	1732
	Gln	Gln	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Phe	Trp	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	
				400					405						410		
15	cca	atg	ttg	cat	gac	aaa	gtt	ggc	gag	cca	tat	tcc	atc	cag	gct	tat	1780
	Pro	Met	Leu	His	Asp	Lys	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	
			415					420					425				
20	gcc	aaa	gaa	ggc	gtt	cca	tca	gaa	ggc	cct	gag	acc	aag	gtg	gag	aac	1828
	Ala	Lys	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Glu	Thr	Lys	Val	Glu	Asn	
		430					435					440					
25	att	ggc	gtg	aag	acg	gtc	acg	atc	aca	tgg	aaa	gag	att	ccc	aag	agt	1876
	Ile	Gly	Val	Lys	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	
	445					450					455					460	
30	gag	aga	aag	ggc	atc	atc	tgc	aac	tac	acc	atc	ttt	tac	caa	gct	gaa	1924
	Glu	Arg	Lys	Gly	Ile	Ile	Cys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	
					465					470					475		
35	ggc	gga	aaa	gga	ttc	tcc	aag	aca	gtc	aat	tcc	agc	atc	ttg	cag	tac	1972
	Gly	Gly	Lys	Gly	Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Tyr	
				480					485						490		
40	ggc	ctg	gag	tcc	ctg	aaa	cga	aag	acc	tct	tac	att	gtt	cag	gtc	atg	2020
	Gly	Leu	Glu	Ser	Leu	Lys	Arg	Lys	Thr	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Val	Met	
		495						500					505				
45	gcc	agc	acc	agt	gct	ggg	gga	acc	aac	ggg	acc	agc	ata	aat	ttc	aag	2068
	Ala	Ser	Thr	Ser	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Asn	Phe	Lys	
		510					515					520					
50	aca	ttg	tca	ttc	agt	gtc	ttt	gag	att	atc	ctc	ata	act	tct	ctg	att	2116
	Thr	Leu	Ser	Phe	Ser	Val	Phe	Glu	Ile	Ile	Leu	Ile	Thr	Ser	Leu	Ile	
	525					530					535					540	

ES 2 310 660 T3

5 ggt gga ggc ctt ctt att ctc att atc ctg aca gtg gca tat ggt ctc 2164
 Gly Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu
 545 550 555
 10 aaa aaa ccc aac aaa ttg act cat ctg tgt tgg ccc acc gtt ccc aac 2212
 Lys Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn
 560 565 570
 15 cct gct gaa agt agt ata gcc aca tgg cat gga gat gat ttc aag gat 2260
 Pro Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp
 575 580 585
 20 aag cta aac ctg aag gag tct gat gac tct gtg aac aca gaa gac agg 2308
 Lys Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg
 590 595 600
 25 atc tta aaa cca tgt tcc acc ccc agt gac aag ttg gtg att gac aag 2356
 Ile Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys
 605 610 615 620
 30 ttg gtg gtg aac ttt ggg aat gtt ctg caa gaa att ttc aca gat gaa 2404
 Leu Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu
 625 630 635
 35 gcc aga acg ggt cag gaa aac aat tta gga ggg gaa aag aat ggg act 2452
 Ala Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr
 640 645 650
 40 aga att ctg tct tcc tgc cca act tca ata taagtgtgga ctaaaatgcg 2502
 Arg Ile Leu Ser Ser Cys Pro Thr Ser Ile
 655 660
 45 agaaaggtgt cctgtggtct atgcaaatta gaaaggacat gcagagtittt ccaactlagga 2562
 agactgaatc tgtggcccca agagaaccat ctctgaagac tgggtatgtg gtcttttcca 2622
 cacatggacc acctacggat gcaatctgta atgcatgtgc atgagaagtc tgttattaag 2682
 tagagtgtga aaacatggtt atggtaatat gaacagcttt taaaatgctt ttgtatttgg 2742
 gcctttcata caaaaaagcc ataataccat ttcatgttaa tgctatactt ctatactatt 2802
 ttcatgtaat actatacttc tatactattt tcatgtaata ctatacttct atactatttt 2862
 catgtaatac tatacttcta tattaaagtt ttaccactc a 2903

50 <210> 5
 <211> 662
 55 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

60

65

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	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
	210						215					220				
40	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
				245						250					255	
45	Arg	Arg	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val
				260					265					270		
50	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Trp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Ser	Asn
		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
 325 330 335
 5 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
 10 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
 385 390 395 400
 15 Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His
 405 410 415
 Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly
 420 425 430
 20 Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys
 435 440 445
 Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly
 450 455 460
 25 Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly
 465 470 475 480
 Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser
 485 490 495
 30 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 Gly Leu
 530 535 540
 40 Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro Asn
 545 550 555 560
 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
 625 630 635 640
 55 Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr Arg Ile Leu Ser
 645 650 655
 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 Thr Val Lys Trp Asn Gln
              80              85              90
```

40

```
gtt ctg cat tgg agc tgg gaa tct gag ctg 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				435
	Pro Asn Phe Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln	130	135	140	
10	gat tct act gga cag gat ata ttg ttc gtt ttc cct aaa gat aag ctg				483
	Asp Ser Thr Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu	145	150	155	
15	gtg gaa gaa ggc acc aat gtt acc att tgt tac gtt tct agg aac att				531
	Val Glu Glu Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile	160	165	170	
20	caa aat aat gta tcc tgt tat ttg gaa ggg aaa cag att cat gga gaa				579
	Gln Asn Asn Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu	175	180	185	
25	caa ctt gat cca cat gta act gca ttc aac ttg aat agt gtg cct ttc				627
	Gln Leu Asp Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe	190	195	200	205
30	att agg aat aaa ggg aca aat atc tat tgt gag gca agt caa gga aat				675
	Ile Arg Asn Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn	210	215	220	
35	gtc agt gaa ggc atg aaa ggc atc gtt ctt ttt gtc tca aaa gta ctt				723
	Val Ser Glu Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu	225	230	235	
40	gag gag ccc aag gac ttt tct tgt gaa acc gag gac ttc aag act ttg				771
	Glu Glu Pro Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu	240	245	250	
45	cac tgt act tgg gat cct ggg acg gac act gcc ttg ggg tgg tct aaa				819
	His Cys Thr Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys	255	260	265	
50	caa cct tcc caa agc tac act tta ttt gaa tca ttt tct ggg gaa aag				867
	Gln Pro Ser Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys	270	275	280	285
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 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 gtg 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

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 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

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
60	Pro Gly Glu His Tyr Cys 975			
65	<210> 7 <211> 979 <212> PRT <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
25			115					120					125			
	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
30	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

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

			260					265				270				
	Gln	Ser	Tyr	Thr	Leu	Phe	Glu	Ser	Phe	Ser	Gly	Glu	Lys	Lys	Leu	Cys
			275					280				285				
5	Thr	His	Lys	Asn	Trp	Cys	Asn	Trp	Gln	Ile	Thr	Gln	Asp	Ser	Gln	Glu
			290				295					300				
	Thr	Tyr	Asn	Phe	Thr	Leu	Ile	Ala	Glu	Asn	Tyr	Leu	Arg	Lys	Arg	Ser
10	305					310					315					320
	Val	Asn	Ile	Leu	Phe	Asn	Leu	Thr	His	Arg	Val	Tyr	Leu	Met	Asn	Pro
				325						330					335	
	Phe	Ser	Val	Asn	Phe	Glu	Asn	Val	Asn	Ala	Thr	Asn	Ala	Ile	Met	Thr
15				340					345					350		
	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
20			370				375					380				
	Val	Asn	Gly	Glu	Tyr	Phe	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Glu	Tyr
	385					390					395					400
	Met	Ala	Arg	Val	Arg	Cys	Ala	Asp	Ala	Ser	His	Phe	Trp	Lys	Trp	Ser
25					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	Val	Glu	Asn	Leu	Asp	Lys	Pro	Ser	Ser
	465				470						475					480
	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
50	545					550					555					560
	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
55				580					585					590		
	Pro	Gly	Val	Arg	Tyr	Asp	Phe	Arg	Ile	Tyr	Gly	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg
			595					600						605		

ES 2 310 660 T3

	Ile	Ala	Cys	Leu	Leu	Glu	Lys	Lys	Thr	Gly	Tyr	Ser	Gln	Glu	Leu	Ala
	610						615					620				
5	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
	705					710				715						720
20	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
				740					745					750		
25	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
	770					775						780				
30	Leu	Ile	Lys	Phe	Lys	Glu	Asn	Pro	His	Leu	Ile	Ile	Met	Asn	Val	Ser
	785					790				795						800
	Asp	Cys	Ile	Pro	Asp	Ala	Ile	Glu	Val	Val	Ser	Lys	Pro	Glu	Gly	Thr
				805					810						815	
35	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      cggaggcggc ctgccggggt gggtcggcctt cccgttgccg cctcgggcgc tgtaccacaga 60
      gctcgaagag gaggcagcgc gccgcgcgga cccggcaagg ctgggccgga ctcggggctc 120
      ccgaggggacg cc atg cgg gga ggc agg ggc gcc cct ttc tgg ctg tgg ccg 171
                  Met Arg Gly Gly Arg Gly Ala Pro Phe Trp Leu Trp Pro
20                      1           5           10

      ctg ccc aag ctg gcg ctg ctg cct 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	cgg 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	gcg gcc tgg acc ctg ctg gaa ccg 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 ccg 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 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

ES 2 310 660 T3

5	ttc tgg gtt gga ggt cgt gag ctg agt cca gaa gga att acc tgc tgc	987
	Phe Trp Val Gly Gly Arg Glu Leu Ser Pro Glu Gly Ile Thr Cys Cys	
	270 275 280 285	
10	tgc tcc cta att ccc agt ggg gcg gag tgg gcc agg gtg tcc gct gtc	1035
	Cys Ser Leu Ile Pro Ser Gly Ala Glu Trp Ala Arg Val Ser Ala Val	
	290 295 300	
15	aac gcc aca agc tgg gag cct ctc acc aac ctc tct ttg gtc tgc ttg	1083
	Asn Ala Thr Ser Trp Glu Pro Leu Thr Asn Leu Ser Leu Val Cys Leu	
	305 310 315	
20	gat tca gcc tct gcc ccc cgt agc gtg gca gtc agc agc atc gct ggg	1131
	Asp Ser Ala Ser Ala Pro Arg Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Ala Gly	
	320 325 330	
25	agc acg gag cta ctg gtg acc tgg caa ccg ggg cct ggg gaa cca ctg	1179
	Ser Thr Glu Leu Leu Val Thr Trp Gln Pro Gly Pro Gly Glu Pro Leu	
	335 340 345	
30	gag cat gta gtg gac tgg gct cga gat ggg gac ccc ctg gag aaa ctc	1227
	Glu His Val Val Asp Trp Ala Arg Asp Gly Asp Pro Leu Glu Lys Leu	
	350 355 360 365	
35	aac tgg gtc cgg ctt ccc cct ggg aac ctc agt gct ctg tta cca ggg	1275
	Asn Trp Val Arg Leu Pro Pro Gly Asn Leu Ser Ala Leu Leu Pro Gly	
	370 375 380	
40	aat ttc act gtc ggg gtc ccc tat cga atc act gtg acc gca gtc tct	1323
	Asn Phe Thr Val Gly Val Pro Tyr Arg Ile Thr Val Thr Ala Val Ser	
	385 390 395	
45	gct tca ggc ttg gcc tct gca tcc tcc gtc tgg ggg ttc agg gag gaa	1371
	Ala Ser Gly Leu Ala Ser Ala Ser Ser Val Trp Gly Phe Arg Glu Glu	
	400 405 410	
50	tta gca ccc cta gtg ggg cca acg ctt tgg cga ctc caa gat gcc cct	1419
	Leu Ala Pro Leu Val Gly Pro Thr Leu Trp Arg Leu Gln Asp Ala Pro	
	415 420 425	
55	cca ggg acc ccc gcc ata gcg tgg gga gag gtc cca agg cac cag ctt	1467
	Pro Gly Thr Pro Ala Ile Ala Trp Gly Glu Val Pro Arg His Gln Leu	

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 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 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 tgcagggttc 2100
accccagtcc tggattagcc ctcttgatgg atgaagacac tgaggactca gagaggctga 2160
gtcacttacc tgaggacacc cagccaggca gagctgggat tgaaggaccc ctatagagaa 2220
15 gggcttgccc cccatgggga agacacggat ggaagggtga gcaaaggaaa atacatgaaa 2280
ttgagagtgg cagctgcctg ccaaaatctg ttccgctgta acagaactga atttggaccc 2340
cagcacagtg gctcacgcct gtaatcccag cactttggca ggccaagggtg gaaggatcac 2400
ttagagctag gagtttgaga ccagcctggg caatatagca agacccctca ctacaaaaat 2460
20 aaaacatcaa aaacaaaaac aattagctgg gcatgatggc 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
20 25 30
40 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
50 Val Ala Val Ala Ala Gly Arg Ser Trp Val Ala Ile Pro Arg Glu Gln
85 90 95
Leu Thr Met Ser Asp Lys Leu Leu Val Trp Gly Thr Lys Ala Gly Gln
100 105 110
55 Pro Leu Trp Pro Pro Val Phe Val Asn Leu Glu Thr Gln Met Lys Pro
115 120 125
Asn Ala Pro Arg Leu Gly Pro Asp Val Asp Phe Ser Glu Asp Asp Pro
130 135 140

60

65

ES 2 310 660 T3

	Leu	Glu	Ala	Thr	Val	His	Trp	Ala	Pro	Pro	Thr	Trp	Pro	Ser	His	Lys
	145					150					155					160
5	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
					180				185						190	
10	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
	210						215					220				
15	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
					245					250					255	
20	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		
35	Leu	Leu	Val	Thr	Trp	Gln	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Pro	Leu	Glu	His	Val
			340					345					350			
	Val	Asp	Trp	Ala	Arg	Asp	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Lys	Leu	Asn	Trp	Val
		355				360					365					
40	Arg	Leu	Pro	Pro	Gly	Asn	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Pro	Gly	Asn	Phe	Thr
	370				375						380					
	Val	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Val	Ser	Ala	Ser	Gly
	385				390					395					400	
45	Leu	Ala	Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Trp	Gly	Phe	Arg	Glu	Glu	Leu	Ala	Pro
				405					410					415		
	Leu	Val	Gly	Pro	Thr	Leu	Trp	Arg	Leu	Gln	Asp	Ala	Pro	Pro	Gly	Thr
			420					425					430			
50	Pro	Ala	Ile	Ala	Trp	Gly	Glu	Val	Pro	Arg	His	Gln	Leu	Arg	Gly	His
		435				440						445				
	Leu	Thr	His	Tyr	Thr	Leu	Cys	Ala	Gln	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Ser	Val
55		450				455					460					
	Cys	Met	Asn	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Gln	Ser	Val	Thr	Leu	Pro	Asp	Leu
	465				470					475				480		
60	Pro	Trp	Gly	Pro	Cys	Glu	Leu	Trp	Val	Thr	Ala	Ser	Thr	Ile	Ala	Gly

ES 2 310 660 T3

				485				490				495	
	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ile	Leu	Arg	Leu	His	Leu	Pro
				500				505				510	
5	Leu	Arg	Trp	Lys	Val	Leu	Pro	Gly	Ile	Leu	Phe	Leu	Trp
			515					520				525	
	Leu	Leu	Gly	Cys	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Thr	Ser	Gly	Arg
		530					535					540	
10	Leu	Arg	His	Lys	Val	Leu	Pro	Arg	Trp	Val	Trp	Glu	Lys
	545						550				555		560
	Pro	Ala	Asn	Ser	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	His	Met	Glu	Gln
				565						570			575
15	Ala	Gln	Pro	Leu	Gly	Asp	Leu	Pro	Ile	Leu	Glu	Val	Glu
				580					585				590
	Pro	Pro	Pro	Val	Met	Glu	Ser	Ser	Gln	Pro	Ala	Gln	Ala
			595					600				605	
20	Leu	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Lys	His	Phe	Leu	Pro	Thr	Pro
		610					615					620	
	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Pro	Arg	Pro	Gln	Val	Leu	Ala	
25	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 48
      Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys
      1          5          10          15

10     tgt ata gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca 96
      Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro
          20          25          30

15     ata tcg aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag 144
      Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu
          35          40          45

20     tct cag gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg 192
      Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met
          50          55          60

25     tca gca gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa 240
      Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu
          65          70          75          80

30     gca tta acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa 288
      Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys
          85          90          95

35     gtg ttg agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta 336
      Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu
          100          105          110

40     aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct 384
      Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro
          115          120          125

45     gga aat act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt 432
      Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val
          130          135          140

50     tta aag cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat 480
      Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn
          145          150          155          160

55     act aca tgc tgagtgatgg gggggggggg ggtgcagtgt cctcagcagt 529
      Thr Thr Cys

```

60 <210> 11

<211> 163

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

65

ES 2 310 660 T3

<400> 11

```

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
           85           90           95
20     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
25     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
30     145          150          155          160
      Thr Thr Cys

```

<210> 12

<211> 489

35 <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     atgathttyc ayacnggnac nacnaarccn acnytngtny tnynttgytg yathggnacn 60
      tggytngcna cntgywsnyt mwsnttyggn gcncnathw snaargarga yytrmggnacn 120
      acnathgayy tnytnaarca rgarwsncar gayytnaya ayaaytayws nathaarcac 180
      gcrwsnggna tgwsngcnga ygarwsnath carytnccnt gyttywsnyt ngaymgngar 240
      gcnytnacna ayathwsngt nathathgcn cayytngara argtnaargt nytnwsngar 300
55
      aayacngtng ayacnwsntg ggtnathmgn tggynacna ayathwsntg yttayaayccn 360
      ytnaayytna ayathwsntg nccnggnaay acngaygarw sntaygaytg yaargtntty 420
      gtntynacng tnytnaarca rttysnaay tgyatggcng arytnarcg naargayaay 480
      acnacntgy
80     489

```

<210> 13

<211> 21

65 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

ES 2 310 660 T3

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC6673

5 <400> 13

gcgcaagggtg ccgttcacag c

21

10

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC29082

20

<400> 14

caattgttg gggttttta gcagcagtag gccag

36

25

<210> 15

<211> 36

30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<223> Cebador de oligonucleótido ZC29083

<400> 15

40

ctgggcctac tgctgctaaa aaaacccaac aaattg

36

45

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC29145

<400> 16

55

gcgtctagag gggtatattg aagtgggca ggaaga

36

60

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65

<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
	<210> 19
25	<211> 23
	<212> DNA
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
30	<223> Cebador de oligonucleótido ZC27899
	<400> 19
35	ccagaacttt gactccttga ccg
40	<210> 20
	<211> 23
	<212> DNA
	<213> Secuencia Artificial
45	<220>
	<223> Cebador de oligonucleótido ZC27895
50	<400> 20
	gaagtcaact tcgctaagaa ccg
55	<210> 21
	<211> 34
	<212> DNA
60	<213> Secuencia Artificial
	<220>
	<223> Cebador de oligonucleótido ZC29122
65	

33

23

23

ES 2 310 660 T3

<400> 21

5 **ccgctcgagt tatattgaag ttgggcagga agac** 34

<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

<210> 24

40 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC9791

<400> 24

50 **cgtccaaca aaaccagac** 20

<210> 25

55 <211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC9793

<400> 25

65 **tggcgttgac 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	
	<212> DNA	
20	<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	ccctgcagtg atcaacatgg ccaagttgac cagtgccgtt	40
	<210> 29	
50	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador de oligonucleótido ZC13945	
	<400> 29	
60	gcccattggac tagtttcgaa aggtcgagtg tcagtcctgc tctc	45
	<210> 30	
65	<211> 34	
	<212> DNA	

ES 2 310 660 T3

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido ZC18698
 5 <400> 30
 ttttttctc 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 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

 $\langle 220 \rangle$

<223> Señal peptídica Glu-Glu (CEE) sin par resto Gly-Ser

5

<400> 35

Glu Tyr Met Pro Met Glu

1

5

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia peptídica C-terminal FLAG

<400> 36

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 37

<211> 684

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

tcagacaaaa	ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	aagccgaggg	ggcaccgtca	60
gtcttctct	tcccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccgac	ccctgaggtc	120
acatgcgtgg	tggtgagcgt	gagccacgaa	gacctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	180
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	240
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	300
aagtgc aaag	tctccaacaa	agccctccca	tcttccatcg	agaaaacat	ctccaagacc	360
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	420
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catgcgcgtg	480
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	540
tccgacggct	ccttcttct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	600
gggaacgtct	tctcatgtct	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	660
aqcctctccc	tgtctccggg	taaa				684

<210> 38

<211> 2295

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<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	48
	Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp	
	1 5 10 15	
10	acc tgg gca ctg tgg atg ctc cct tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca	96
	Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala	
	20 25 30	
15	gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg	144
	Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg	
	35 40 45	
20	aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc	192
	Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr	
	50 55 60	
25	cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat aat	240
	Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn	
	65 70 75 80	
30	tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tcg tgc tct ttt	288
	Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe	
	85 90 95	
35	ttc ctt cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg gaa	336
	Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu	
	100 105 110	
40	gct gaa aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg aga	384
	Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg	
	115 120 125	
45	tta gag aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg aaa	432
	Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys	
	130 135 140	
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
	225 230 235 240	
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
	305 310 315 320	

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 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

ES 2 310 660 T3

5	ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc agc acc agt Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser	1536
	500 505 510	
10	gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca ttg tca ttc Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe	1584
	515 520 525	
15	agt gtc ttt gag gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc cca Ser Val Phe Glu Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro	1632
	530 535 540	
20	ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe	1680
	545 550 555 560	
25	ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	1728
	565 570 575	
30	aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	1776
	580 585 590	
35	aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	1824
	595 600 605	
40	cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	1872
	610 615 620	
45	gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	1920
	625 630 635 640	
50	tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	1968
	645 650 655	
55	aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	2016

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	680	685	2064
	675			
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	695	700	2112
	690			
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	710	715	2160
	705		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 Leu Ser Pro Gly Lys *	755	760	2295

<210> 39

35 <211> 764

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Polipéptido de fusión zcytor17-Fc4 humano

<400> 39

45

50

55

60

65

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

ES 2 310 660 T3

	50		55		60	
	Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn					
5	65		70		75	80
	Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe					
		85		90		95
	Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu					
10		100		105		110
	Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg					
		115		120		125
	Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys					
15		130		135		140
	Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro					
	145		150		155	160
	Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg					
20		165		170		175
	Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg					
		180		185		190
	Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr					
25		195		200		205
	Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp					
	210		215		220	
	Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro					
30	225		230		235	240
	Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly					
		245		250		255
	Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val					
35		260		265		270
	Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn					
		275		280		285
	Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu					
40		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
	Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp					
50		340		345		350
	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					
55		370		375		380
	Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys					
	385		390		395	400

ES 2 310 660 T3

	Leu	Lys	Pro	Phe	Trp	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	Met	Leu	His
					405					410					415	
5	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			
10	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						480
15	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		
20	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Asn	Phe	Lys	Thr	Leu	Ser	Phe
			515					520					525			
	Ser	Val	Phe	Glu	Glu	Pro	Arg	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
25		530					535					540				
	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
	545					550				555						560
	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
30					565					570					575	
	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
				580				585					590			
35	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
			595					600					605			
	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
		610					615					620				
40	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
	625					630				635						640
	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
				645						650				655		
45	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
				660					665					670		
	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
		675						680				685				
50	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
		690					695					700				
	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
55		705				710				715						720
	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
				725						730				735		
60	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
				740				745					750			
	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
65				755				760								

<210> 40

ES 2 310 660 T3

	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótido ZC29157	
10	<400> 40	
	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 actaaaatca t	21
45	<210> 43	
	<211> 22	
50	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótido ZC41457	
55	<400> 43	
60	aatcacggca gagtccac 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

gtaccttccc gtaaattccct ccccttcccg gaattacacc cgcgtatttc ccagaaaagg 60
aactgtagat ttctaggaat tcaatccttg gccacgcgtc 100

10

<210> 45

<211> 100

15 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZC12748

20

<400> 45

25 tcgagacgcg tggccaagga ttgaattcct agaaatctac agttcctttt ctgggaaata 60
cgcgggtgta attccgggaa ggggagggat ttacgggaag 100

<210> 46

30 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<223> Cebador de oligonucleótido ZC10651

<400> 46

40

agcttttctg cagcagctct 20

<210> 47

45

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

50

<223> Cebador de oligonucleótido ZC10565

<400> 47

55

tttgagaaa aggttgcaaa tgc 23

<210> 48

60

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

65

<223> Cebador de oligonucleótido ZC14063

ES 2 310 660 T3

	<400> 48	
5	caccagacat aatagctgac agact	25
	<210> 49	
	<211> 21	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador de oligonucleótido ZC17574	
	<400> 49	
20	ggtrttgctc agcatgcaca c	21
	<210> 50	
	<211> 24	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador de oligonucleótido ZC17600	
	<400> 50	
35	catgtaggcc atgaggtcca ccac	24
	<210> 51	
40	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótido ZC38065	
	<400> 51	
50	ctttcctggg aatctgtgtc t	21
	<210> 52	
55	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótido ZC38068	
	<400> 52	
65	cctccagctc tgggtgtg	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	ctgtgttggc ccaccgttcc ca	22
	<210> 56	
	<211> 20	
50	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador hacia delante de rRNA	
	<400> 56	
60	cggctaccac atccaaggaa	20
	<210> 57	
65	<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 agactgccc 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 gagtccac 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 gctcgtgtc		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		
	<213> Secuencia Artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador de oligonucleótido ZC39983		
	<400> 65		
55			
	cctgcctacc tgaaaaccag 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	tttgaattcg 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
	<210> 68	
	<211> 2217	
25	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> CDS	
30	<222> (1)...(2217)	
	<400> 68	
35	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	
40	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 144	
	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 192	
	His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln Glu Leu Lys	
	50 55 60	
55	atg gta ttt cag atc cag atc agt agg att gaa aca tcc aat gtc atc 240	
	Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser Asn Val Ile	
	65 70 75 80	
60	tggttg ggg aat tac agc acc act gtg aag tgg aac cag gtt ctg cat 288	
	Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln Val Leu His	
65		

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 Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr His Phe Val 100 105 110	336		
10	aga ata aag agt ttg gtg gac gat gcc aag ttc cct gag cca aat ttc Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu Pro Asn Phe 115 120 125	384		
15	tgg agc aac tgg agt tcc tgg gag gaa gtc agt gta caa gat tct act Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln Asp Ser Thr 130 135 140	432		
20	gga cag gat ata ttg ttc gtt ttc cct aaa gat aag ctg gtg gaa gaa Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu Val Glu Glu 145 150 155 160	480		
25	ggc acc aat gtt acc att tgt tac gtt tct agg aac att caa aat aat Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile Gln Asn Asn 165 170 175	528		
30	gta tcc tgt tat ttg gaa ggg aaa cag att cat gga gaa caa ctt gat Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu Gln Leu Asp 180 185 190	576		
35	cca cat gta act gca ttc aac ttg aat agt gtg cct ttc att agg aat Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe Ile Arg Asn 195 200 205	624		
40	aaa ggg aca aat atc tat tgt gag gca agt caa gga aat gtc agt gaa Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn Val Ser Glu 210 215 220	672		
45	ggc atg aaa ggc atc gtt ctt ttt gtc tca aaa gta ctt gag gag ccc Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro 225 230 235 240	720		
50	aag gac ttt tct tgt gaa acc gag gac ttc aag act ttg cac tgt act Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu His Cys Thr 245 250 255	768		
55	tgg gat cct ggg acg gac act gcc ttg ggg tgg tct aaa caa cct tcc	816		

60

65

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	864
	Gln	Ser	Tyr	Thr	Leu	Phe	Glu	Ser	Phe	Ser	Gly	Glu	Lys	Lys	Leu	Cys	
				275					280					285			
10	aca	cac	aaa	aac	tgg	tgt	aat	tgg	caa	ata	act	caa	gac	tca	caa	gaa	912
	Thr	His	Lys	Asn	Trp	Cys	Asn	Trp	Gln	Ile	Thr	Gln	Asp	Ser	Gln	Glu	
				290					295					300			
15	acc	tat	aac	ttc	aca	ctc	ata	gct	gaa	aat	tac	tta	agg	aag	aga	agt	960
	Thr	Tyr	Asn	Phe	Thr	Leu	Ile	Ala	Glu	Asn	Tyr	Leu	Arg	Lys	Arg	Ser	
	305					310					315					320	
20	gtc	aat	atc	ctt	ttt	aac	ctg	act	cat	cga	gtt	tat	tta	atg	aat	cct	1008
	Val	Asn	Ile	Leu	Phe	Asn	Leu	Thr	His	Arg	Val	Tyr	Leu	Met	Asn	Pro	
					325					330					335		
25	ttt	agt	gtc	aac	ttt	gaa	aat	gta	aat	gcc	aca	aat	gcc	atc	atg	acc	1056
	Phe	Ser	Val	Asn	Phe	Glu	Asn	Val	Asn	Ala	Thr	Asn	Ala	Ile	Met	Thr	
				340					345					350			
30	tgg	aag	gtg	cac	tcc	ata	agg	aat	aat	ttc	aca	tat	ttg	tgt	cag	att	1104
	Trp	Lys	Val	His	Ser	Ile	Arg	Asn	Asn	Phe	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gln	Ile	
				355					360					365			
35	gaa	ctc	cat	ggg	gaa	gga	aaa	atg	atg	caa	tac	aat	gtt	tcc	atc	aag	1152
	Glu	Leu	His	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Met	Gln	Tyr	Asn	Val	Ser	Ile	Lys	
				370				375						380			
40	gtg	aac	ggg	gag	tac	ttc	tta	agt	gaa	ctg	gaa	cct	gcc	aca	gag	tac	1200
	Val	Asn	Gly	Glu	Tyr	Phe	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Glu	Tyr	
	385					390					395					400	
45	atg	gcg	cga	gta	cgg	tgt	gct	gat	gcc	agc	cac	ttc	tgg	aaa	tgg	agt	1248
	Met	Ala	Arg	Val	Arg	Cys	Ala	Asp	Ala	Ser	His	Phe	Trp	Lys	Trp	Ser	
					405				410						415		
50	gaa	tgg	agt	ggg	cag	aac	ttc	acc	aca	ctt	gaa	gct	gct	ccc	tca	gag	1296
	Glu	Trp	Ser	Gly	Gln	Asn	Phe	Thr	Thr	Leu	Glu	Ala	Ala	Pro	Ser	Glu	
				420					425					430			

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 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

ES 2 310 660 T3

att gct tgt tta tta gag aaa aaa aca gga tac tct cag gaa ctt gct 1872
 Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala
 610 615 620
 5
 cct tca gac aac cct cac gtg ctg gtg gat aca ttg aca tcc cac tcc 1920
 Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser
 625 630 635 640
 10
 ttc act ctg agt tgg aaa gat tac tct act gaa tct caa cct ggt ttt 1968
 Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe
 645 650 655
 15
 ata caa ggg tac cat gtc tat ctg aaa tcc aag gcg agg cag tgc cac 2016
 Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His
 660 665 670
 20
 cca cga ttt gaa aag gca gtt ctt tca gat ggt tca gaa tgt tgc aaa 2064
 Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys
 675 680 685
 25
 tac aaa att gac aac ccg gaa gaa aag gca ttg att gtg gac aac cta 2112
 Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu
 690 695 700
 30
 aag cca gaa tcc ttc tat gag ttt ttc atc act cca ttc act agt gct 2160
 Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala
 705 710 715 720
 35
 ggt gaa ggc ccc agt gct acg ttc acg aag gtc acg act ccg gat gaa 2208
 Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu
 725 730 735
 40
 cac tcc tcg 2217
 His Ser Ser

<210> 69

45 <211> 739

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

<400> 69

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
25			115				120					125				
	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
30	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
50			260				265						270			
	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
55	290				295						300					
	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			

65

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					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	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					
	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		
	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				
	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
55				645					650					655		
	Ile	Gln	Gly	Tyr	His	Val	Tyr	Leu	Lys	Ser	Lys	Ala	Arg	Gln	Cys	His
			660				665					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
 690 695 700
 5 Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala
 705 710 715 720
 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 Gln 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 Lys 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 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		

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					320	
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					400	
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

65

ES 2 310 660 T3

5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 ttg tca ttc agt gtc ttt gag 1557
 Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu
 515
 35 <210> 71
 <211> 519
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 71
 45 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
 Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr
 35 40 45
 50 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
 55 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	150 155 160
	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
	Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser	
20	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	230 235 240
	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	310 315 320
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	
50	370	375 380
	Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro	
	385	390 395 400
	Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala	
55	405	410 415
	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
 Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala
 10 485 490 495
 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

<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
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Espaciador Gly-Ser de 12 aminoácidos
 45 <400> 73

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Pro Arg Ser
 1 5 10

50 <210> 74
 <211> 31
 55 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido ZC41557
 60 <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

```
cgactgactc gagtcagtga tggatgatgg gatggccacc tgatccttta cccggagaca 60
gggag                                           65
```

15

<210> 76

<211> 3196

<212> DNA

20

<213> *Mus musculus*

<400> 76

25

```
tgtatgtctg cacagtttgt gtatgcctgg tgcccacaga ggctcgagag tgtcagattc 60
ccccaaaac tggagttaca gttttgagcc gcccctgct tgatagcaat caaacctggg 120
tcctctgaaa gagcatccag tgcattgaac cactgaacca tctctccaaa ccatgaacat 180
cactttaatt tttttaata gttaaaggat attttgattc taaagatgta aaagaacgtc 240
tcacctatit tgaaatttgg taataaatgt ttcttcaaag cttaaaaaaa ttagttcagg 300
tttttttttt ttttcagtca gtgatttgct aagctgccc aactggctta gaatttgtga 360
ccctcttgtc tcagcatact gagtggttaag attacaagtg caccacctac ccagttccca 420
taattaactg atccaccccc acccccatcc caccctactc ccattgcctg ggcaagtaac 480
tcttgagccc cattctggtt cttagagctg aagtcacaaa ggtgcagggt agaacgcaag 540
gacaaggcca ggccctggag cacagatgcc ttctccttat gccttccctg tgttccactag 600
agccatcccc ctgcctccgg aattcccaca gatggatcgc tctgtggctt cttaaaactt 660
ccctgcaggg cactgaccct cagccctctt aagtcacttc ttccccagt attgtacttt 720
tcaatcgggc ttcaaacttt cctctcatta aatcagcaag cactttccaa gaaaagagag 780
atgctcaaga tgccttctg tgtggatgt gtatgcgttt gtgtgtgtgc acgcatgtgt 840
gtgcatgtga ctcaatcttc tgccttgcc ttagggtaac ctcagcattt cttccagcc 900
ctgctttccc caggccgagc cgaggctggc aaccttttga aaatgtttt tggagaaaag 960
ctgagcaatg gttttgcat gggcgggctt ttgatctgct tcctcatgac aaccctttat 1020
atattgcctg gtggccatgg cgaacacacc aggtccaga gaccacaggc aaagcgggcc 1080
```

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

```

ttcctcactc tcttaccgtc gccatgatct tccacacagg taccgctggc tccacacgca 1140
gctcagcatg gcttcagctc catggctctt atcatggttag gggaaggagc cgggaatggc 1200
tgcctcaggt ggttgctgga cagaggctgt tgtaactgaa gctgggatgg gcaggggcat 1260
5 ctgacctatc agctccatgg tatccttctt tttctccagg aacaacgaag cctaccctgg 1320
tgctgctttg ctgtatagga acctggctgg ccacctgcag cttgtccttc ggtgccccaa 1380
tatcgaagga agacttaaga actacaattg acctcttgaa acaagagtct caggatcttt 1440
10 ataacaacta tgtaagtgcc cttgagattg ttttttctta accatttctt taaaatgtct 1500
tattttgcta tctaagcaca gctatccttt ctcgatataa agccagctat ggaagccaga 1560
gaggcatggg gaaacattgg aattcgggtg gggtgaaatg tttccaaggg ggtaaatgca 1620
ctagcagaag aggcagaggg agactggctc agggactgaa accttggcag cttacgaaac 1680
15 actacaggat gtatgctccc tgaattcttt atctcaaadc caccggctc acagtcccta 1740
ctaaacgagc attcttgctg aaagggcac cttagagaag ggccagcttg attcaggaat 1800
ccccaagag caatgagagc cagtttcagc agccaaagat gtcctagtgg aagcagggtg 1860
tgaggatctt cctttgggtc tccgttgact aactaggcaa ctgtctgtgt gttcttgagg 1920
20 catcctggag ggccctctgc ctggccagag cctggcacag gtacagcaca ggaccagaa 1980
agtgtgaata cttcatttcc ttgggaccgc ttagataact tcagtgaag caagtaacag 2040
ggaaactgat ggagacacag ataacctccc tgcccctctc acttcagtca ctgagcctcc 2100
gagaacaggt tgcagatggc taggggcagc ctcagccaga taggcggagg cagactgggt 2160
25 agaagcatcc tttagaacca cggccaacct ggggtgggtat gccatgtctt ctagctcata 2220
agccaactag accttcgatt cctgtagaca cagagttagt gatggcccaa gcttcagaag 2280
gttggtgtac caattagata aggtctgagg caggctagac acagaggaag ccctggaaat 2340
gagctgttct gagctgtagg gttgttacaa atgtcttcct tacaatattt caaacctcct 2400
30 ctttctacag agcataaagc aggcattctg gatgtcagca gacgaatcaa tacagtgcc 2460
gtgtttcagc ctggaccggg aagcattaac caacatctcg gtcacatag cacatctgga 2520
gaaagtcaaa gtgttgagcg agaacacagt agatacttct tgggtgataa gatggctaac 2580
aaacatcagc tgtttcaacc cactgaattt aaacatttct gtgcctgga atactgatga 2640
35 atcctatgat tgtaaagtgt tcgtgcttac ggttttaag cagttctcaa actgcatggc 2700
agaactgcag gctaaggaca atactacatg ctgagtgatg gggggggggg ggtgcagtgt 2760
cctcagcagt gcctgtcctt cgagggtgta gcttgcaacc caggacttaa ctccaaaggg 2820
actgtgcggt cattactagt catgttattt atgtttttat tttgtccact gaaatcttgt 2880
40 tctgtacacc tgtagggact ggaagtggca gctatattta tttatttatg tactgagttt 2940
gttaacgctc catggaggag ccttcagagt ctatttaata aattatattg acatgatcac 3000
ataatcagtt ttggaatttg tgatggggtt gaaatcaaag attaggaatg ttctggaaat 3060
agtttatgct accctctccc tccattagac agactcatga gcaataatc ccagcagcat 3120
45 cacgtgcatg ataaacatct ttgttccagg tcataagtac aatcactgtc cttttggtat 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 aaaccagtta tacc 24

```

```

65 <210> 78
<211> 23
<212> DNA

```

ES 2 310 660 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótido ZC21195	
5	<400> 78	
10	gaggagacca taacccccga cag	23
	<210> 79	
	<211> 23	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de oligonucleótido ZC21196	
	<400> 79	
25	catagctccc accacacgat ttt	23
	<210> 80	
30	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador de oligonucleótido ZC26358	
	<400> 80	
40	aaaaccaaac gtacaacctc acggg	25
	<210> 81	
45	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador de oligonucleótido ZC26359	
	<400> 81	
55	gagcagccat acaccagagc agaca	25
60	<210> 82	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótido ZC29179	

ES 2 310 660 T3

	<400> 82	
5	gcaggggttg gaacggtg	19
	<210> 83	
	<211> 20	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador de oligonucleótido ZC28917	
	<400> 83	
20	tgcaagatgc tggaattgac	20
	<210> 84	
	<211> 20	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador de oligonucleótido ZC28916	
	<400> 84	
35	agtcaattcc agcatcttgc	20
	<210> 85	
40	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador de oligonucleótido ZC28918	
	<400> 85	
50	tcacagagtc atcagactcc	20
	<210> 86	
55	<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	
	cgtagcgggcc ggccaccatg atcttcaca caggaacaa	39
30	<210> 89	
	<211> 36	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador de oligonucleótido ZC41584	
	<400> 89	
45	tgacgaggcg cgcctcagca tgtagtattg tcctta	36
	<210> 90	
	<211> 650	
50	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<220>	
55	<221> CDS	
	<222> (53)...(542)	
60		
65		

ES 2 310 660 T3

<400> 90

5	ggctccagag accacaggca aagcgggcct tcctcactct 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 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 gggggggtgc agtgtcctca gcagtgcctg tccttcgagg	592
	Cys	
65	gctgagcttg caaccagga cttaactcca aagggaactgt gcggtcatta ctagtcat	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
25      Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys
      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
      115             120             125
35      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

```

<210> 92

45 <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 mcylor17lig y el codón de terminación

55 <400> 92

```

      ggccggccac catgatcttc cacacaggaa caacgaagcc taccctggtg ctgctttgct 60
      gtataggaac ctggctggcc acctgcagct tgtccttcgg tgccccaata tcgaaggaag 120
      acttaagaac tacaattgac ctcttgaaac aagagtctca ggatctttat aacaactata 180
60      gcataaagca ggcattctgg atgtcagcag acgaatcaat acagctgccg tgtttcagcc 240
      tggaccggga agcattaacc aacatctcgg tcacatagc acatctggag aaagtcaaag 300
      tgttgagcga gaacacagta gatacttctt gggtgataag atggctaaca aacatcagct 360
      gtttcaacc actgaattta aacatttctg tgcctggaaa tactgatgaa tcctatgatt 420
65      gtaaagtgtt cgtgcttacg gttttaagc agttctcaaa ctgcatggca gaactgcagg 480
      ctaaggacaa tactacatgc tgaggcgcgc c                               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
 15
 <210> 94
 <211> 24
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido ZC41437
 25 <400> 94

ccagggagca ttgacaactc ttag
 30
 <210> 95
 <211> 516
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido zCyt17Lig-CEE humano
 40 <221> CDS
 <222> (1)...(516)
 45
 50
 55
 60
 65

21

24

ES 2 310 660 T3

<400> 95

5	atg gcc tct cac tca ggc ccc tcg acg tct gtg ctc ttt ctg ttc tgc	48
	Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys	
	1 5 10 15	
10	tgc ctg gga ggc tgg ctg gcc tcc cac acg ttg ccc gtc cgt tta cta	96
	Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu	
	20 25 30	
15	cga cca agt gat gat gta cag aaa ata gtc gag gaa tta cag tcc ctc	144
	Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu	
	35 40 45	
20	tcg aag atg ctt ttg aaa gat gtg gag gaa gag aag ggc gtg ctc gtg	192
	Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu Glu Glu Lys Gly Val Leu Val	
	50 55 60	
25	tcc cag aat tac acg ctg ccg tgt ctc agc cct gac gcc cag ccg cca	240
	Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro	
	65 70 75 80	
30	aac aac atc cac agc cca gcc atc cgg gca tat ctc aag aca atc aga	288
	Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg	
	85 90 95	
35	cag cta gac aac aaa tct gtt att gat gag atc ata gag cac ctc gac	336
	Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp Glu Ile Ile Glu His Leu Asp	
	100 105 110	
40	aaa ctc ata ttt caa gat gca cca gaa aca aac att tct gtg cca aca	384
	Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr	
	115 120 125	
45	gac acc cat gaa tgt aaa cgc ttc atc ctg act att tct caa cag ttt	432
	Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe	
	130 135 140	
50	tca gag tgc atg gac ctc gca cta aaa tca ttg acc tct gga gcc caa	480
	Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln	
	145 150 155 160	
55	cag gcc acc act gaa gaa tac atg ccg atg gaa taa	516
	Gln Ala Thr Thr Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu *	
	165 170	

<210> 96

<211> 171

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido zCyt17Lig-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	
5	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
10			35					40					45			
	Ser	Lys	Met	Leu	Leu	Lys	Asp	Val	Glu	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	Ile	Glu	His	Leu	Asp
				100					105					110		
25	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				
30	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						

<210> 97

<211> 49

<212> DNA

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZCZC41607

45 <400> 97

tccaggggaat tcatatagggc cggccacat ggcctctcac tcaggcccc

49

50

<210> 98

<211> 82

55 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido ZCZC41605

60

<400> 98

caacccaga gctgttttaa ggcgcgcctc tagattatta ttccatcggc atgtattctt 60
cagtggtagc ctgttgggct cc 82

65

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      aaccccttgg 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 agt ggc cgg gat acc cac cgt tta acc aga 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 agc 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

65

ES 2 310 660 T3

ctt aac gat ctg gag aca gtg cta acc tct aga cca cct cag ccc gca 486
 Leu Asn Asp Leu Glu Thr Val Leu Thr Ser Arg Pro Pro Gln Pro Ala
 140 145 150

tct ggc tcc gtc tct cct aac cgt gga acc gtg gaa tgt taa 528
 Ser Gly Ser Val Ser Pro Asn Arg Gly Thr Val Glu Cys *
 155 160 165

aacagcaggc agagcaccta aagtctgaat gttcctcatg gcccatggtc aaaaggattt 588
 tacattcctt tatgccatca aatgtcttat caatttatct a 629

<210> 100

<211> 166

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 100

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
 Asp Thr His Arg Leu Thr Arg Thr Leu Asn Cys Ser Ser Ile Val Lys
 35 40 45
 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
 Lys Ser Asn Leu Gln Lys Leu Asn Cys Cys Leu Pro Thr Ser Ala Asn
 100 105 110
 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
 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

<210> 101

<211> 674

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (10)...(464)

ES 2 310 660 T3

<400> 101

```

5      gatccaaac atg agc cgc ctg ccc gtc ctg ctc ctg ctc caa ctc ctg gtc 51
      Met Ser Arg Leu Pro Val Leu 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 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 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 Leu 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 ttagtccaac gtccagctcg 484
      Gln Gln Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile
      145          150

55     ttctctgggc cttctcacca cagcgctctg ggacatcaaa aacagcagaa cttctgaaac 544
      ctctgggtca tctctcacac attccaggac cagaagcatt tcaccttttc ctgcggcatc 604
      agatgaattg ttaattatct aatttctgaa atgtgcagct cccatttggc cttgtgcggt 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	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

<220>

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 zCytot17Lig(m)-CEE de ratón

<221> CDS

60 <222> (1)...(513)

65

ES 2 310 660 T3

<400> 104

5	atg atc ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc	48
	Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys	
	1 5 10 15	
10	tgt ata gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca	96
	Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro	
	20 25 30	
15	ata tcg aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag	144
	Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu	
	35 40 45	
20	tct cag gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg	192
	Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met	
	50 55 60	
25	tca gca gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa	240
	Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu	
	65 70 75 80	
30	gca tta acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa	288
	Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys	
	85 90 95	
35	gtg ttg agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta	336
	Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu	
	100 105 110	
40	aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct	384
	Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro	
	115 120 125	
45	gga aat act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt	432
	Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val	
	130 135 140	
50	tta aag cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat	480
	Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn	
	145 150 155 160	
55	act aca tgc gaa gaa tac atg ccg atg gaa tga	513
	Thr Thr Cys Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu *	
	165 170	

<210> 105

<211> 170

<212> PRT

65 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido zCytol17Lig(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 tccaggaat tcatataggc cggccacat gatctccac acaggaaca 49

<210> 107

55 <211> 85

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Cebador de oligonucleótido ZC41641

65

ES 2 310 660 T3

<400> 107

5 caacccaga gctgttttaa ggcgcgctc tagattatca ttccatcggc atgtattctt 60
cgcattagt attgtcctta gcctg 85

<210> 108

10 <211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> Cebador de oligonucleótido ZC38,239

<400> 108

20 gccgactaag ccagagaac 19

<210> 109

25 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cebador de oligonucleótido ZC38.245

<400> 109

35 ctgttgacag ttctgaaccg 20

 $\langle 210 \rangle$ 110

40 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cebador de oligonucleótido ZC38,238

 $\langle 400 \rangle$ 110

50 cgcggtttcc attgatctg 20

<210> 111

<211> 2748

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

60 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (237)...(2222)

ES 2 310 660 T3

<400> 111

5	gatggggccc tgaatgttga tctgacagaa ttccagacca acctggtggt tattgtcctt 60	
	ttcatctggt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaaggctgct gctgtccggg 120	
	ctctcagaga aggcagtgtc ggaggcgttc ctggcccggg tctcctccta ctgttccttg 180	
	tagcccagcc ttctcggggt ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239	
10		Met 1
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	cgg ttc aga act gtc aac agt agc cgc tgg acg gaa gtc aat ttt gaa 815 Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu 180 185 190
10	aac tgt aaa cag gtc tgc aac ctc aca gga ctt cag gct ttc aca gaa 863 Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr Glu 195 200 205
15	tat gtc ctg gct cta cga ttc agg ttc aat gac tca aga tat tgg agc 911 Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp Ser 210 215 220 225
20	aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtg act atg gag gaa gtt cca cat 959 Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro His 230 235 240
25	gtc ctg gac ctg tgg aga att ctg gaa cca gca gac atg aac gga gac 1007 Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly Asp 245 250 255
30	agg aag gtg cga ttg ctg tgg aag aag gca aga gga gcc ccc gtc ttg 1055 Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val Leu 260 265 270
35	gag aaa aca ttt ggc tac cac ata cag tac ttt gca gag aac agc act 1103 Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser Thr 275 280 285
40	aac ctc aca gag ata aac aac atc acc acc cag cag tat gaa ctg ctt 1151 Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu Leu 290 295 300 305
45	ctg atg agc cag gca cac tct gtg tcc gtg act tct ttt aat tct ctt 1199 Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser Leu 310 315 320
50	ggc aag tcc caa gag acc atc ctg agg atc cca gat gtc cat gag aag 1247 Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu Lys 325 330 335
55	acc ttc cag tac att aag agc atg cag gcc tac ata gcc gag ccc ctg 1295 Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro Leu

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		

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 Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu	1871
	530 535 540 545	
10	ctt cta ctt agc atc aaa aca gtg act ttt ggc ctc aga aag cca aac Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro Asn	1919
	550 555 560	
15	cgg ttg act ccc ctg tgt tgt cct gat gtt ccc aac cct gct gaa agt Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser	1967
	565 570 575	
20	agt tta gcc aca tgg ctc gga gat ggt ttc aag aag tca aat atg aag Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met Lys	2015
	580 585 590	
25	gag act gga aac tct ggg aac aca gaa gac gtg gtc cta aaa cca tgt Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro Cys	2063
	595 600 605	
30	ccc gtc ccc gcg gat ctc att gac aag ctg gta gtg aac ttt gag aat Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Asn	2111
	610 615 620 625	
35	ttt ctg gaa gta gtt ttg aca gag gaa gct gga aag ggt cag gcg agc Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala Ser	2159
	630 635 640	
40	att ttg gga gga gaa gcg aat gag tat atc tta tcc cag gaa cca agc Ile Leu Gly Gly Glu Ala Asn Glu Tyr Ile Leu Ser Gln Glu Pro Ser	2207
	645 650 655	
45	tgt cct ggc cat tgc tgaagctacc ctcagggtcc aggacagctg tcttggtggc Cys Pro Gly His Cys	2262
	660	
50	acttgactct ggcaggaacc tgatctctac tttctttctc cctgtctccg gacactttct ctccttcattg cagagaccag gactagagcg gattcctcat ggtttgccag gtccttcagt ccttgctcgg gctcaggatc ttcaacaatg ccctttctgg gacactccat catccactta tatttatitt ttgcaacatt gtggattgaa cccagggact tgtttatgcg cgcaacttca	2322 2382 2442 2502
55	gtaactgtgg cagagactta ggaatggaga tctgaccctt tgcagaaggt ttctggacat ccgtccctgt gtgagcctca gacagcattg tctttacttt gaatcagctt ccaagttaat aaaagaaaaa cagagaggtg gcataacagc tctgcttcc tgacctgctt gaggttccagt tctgacttcc ttggtgatg aacagcaatg tgggaagtgt aagctgaata aaccttttcc	2562 2622 2682 2742
60	tcacca	2748

<210> 112

65 <211> 662

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

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		
	His	Val	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	Asn	Ala	Gly	Ile	Met	Trp	Thr	Leu	Ala
			20					25					30			
10	Leu	Trp	Ala	Phe	Ser	Phe	Leu	Cys	Lys	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Leu	Pro
		35					40					45				
	Thr	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Cys	Val	Phe	Tyr	Phe	Asp	Arg	Asn	Leu
	50					55						60				
15	Thr	Cys	Thr	Trp	Arg	Pro	Glu	Lys	Glu	Thr	Asn	Asp	Thr	Ser	Tyr	Ile
	65				70						75				80	
	Val	Thr	Leu	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Lys	Ser	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asn	Ala
				85						90					95	
20	Thr	Glu	Ala	Ser	Tyr	Ser	Phe	Pro	Arg	Ser	Cys	Ala	Met	Pro	Pro	Asp
				100					105					110		
	Ile	Cys	Ser	Val	Glu	Val	Gln	Ala	Gln	Asn	Gly	Asp	Gly	Lys	Val	Lys
			115					120					125			
25	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
30	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
35				180					185					190		
	Glu	Asn	Cys	Lys	Gln	Val	Cys	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Phe	Thr
			195					200					205			
	Glu	Tyr	Val	Leu	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg	Phe	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Trp
40		210					215					220				
	Ser	Lys	Trp	Ser	Lys	Glu	Glu	Thr	Arg	Val	Thr	Met	Glu	Glu	Val	Pro
	225				230						235				240	
45	His	Val	Leu	Asp	Leu	Trp	Arg	Ile	Leu	Glu	Pro	Ala	Asp	Met	Asn	Gly

ES 2 310 660 T3

				245					250				255
	Asp	Arg	Lys	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly
				260					265				270
5	Leu	Glu	Lys	Thr	Phe	Gly	Tyr	His	Ile	Gln	Tyr	Phe	Ala
				275				280					285
	Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Gln	Gln
10				290				295					300
	Leu	Leu	Met	Ser	Gln	Ala	His	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Ser
	305												310
	Leu	Gly	Lys	Ser	Gln	Glu	Thr	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Asp
15													315
													320
	Lys	Thr	Phe	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ser	Met	Gln	Ala	Tyr	Ile
													325
													330
													335
													340
20	Leu	Leu	Val	Val	Asn	Trp	Gln	Ser	Ser	Ile	Pro	Ala	Val
													345
													350
	Ile	Val	Glu	Trp	Leu	Pro	Glu	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Phe
													355
													360
													365
25	Ser	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Val	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile
													370
													375
													380
													385
	Lys	Leu	Lys	Pro	Phe	Thr	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr
													390
													395
													400
30	Gly	His	Arg	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr
													405
													410
													415
													420
													425
													430
35	Gly	Thr	Pro	Leu	Lys	Gly	Pro	Glu	Thr	Arg	Val	Glu	Asn
													435
													440
													445
	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser
													450
													455
													460
40	Gly	Phe	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Val	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu
													465
													470
													475
													480
	Glu	Leu	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	His	Ala	Leu	Gln	Cys
													485
													490
													495
45	Ser	Leu	Thr	Arg	Arg	Thr	Ser	Tyr	Thr	Val	Trp	Val	Met
													500
													505
													510
	Arg	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Val	Arg	Ile	Asn	Phe	Lys
													515
													520
													525
50	Ile	Ser	Val	Phe	Glu	Ile	Val	Leu	Leu	Thr	Ser	Leu	Val
													530
													535
													540
	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Ile	Lys	Thr	Val	Thr	Phe	Gly	Leu
													545
													550
													555
55	Asn	Arg	Leu	Thr	Pro	Leu	Cys	Cys	Pro	Asp	Val	Pro	Asn
													560
													565
													570
													575
60	Ser	Ser	Leu	Ala	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Gly	Phe	Lys	Lys
													580
													585
													590

65

ES 2 310 660 T3

Lys Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro
 595 600 605
 5 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> *Mus musculus*
 <220>
 <221> CDS
 25 <222> (237)...(1877)
 <400> 113

30 gatggggccc tgaatgttga tctgacagaa ttccagacca acctggtggt tattgtcctt 60
 ttcattctggt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaagggtgct gctgtccggg 120
 ctctcagaga aggcagtgtt ggaggcgttc ctggcccggg tctcctccta ctgttccttg 180
 35 tagcccgacc ttctcggggt ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239
 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	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	911
55	aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtg act atg gag gaa gtt cca cat				959

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	1007
	Val	Leu	Asp	Leu	Trp	Arg	Ile	Leu	Glu	Pro	Ala	Asp	Met	Asn	Gly	Asp	
				245					250					255			
10	agg	aag	gtg	cga	ttg	ctg	tgg	aag	aag	gca	aga	gga	gcc	ccc	gtc	ttg	1055
	Arg	Lys	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val	Leu	
				260				265					270				
15	gag	aaa	aca	ttt	ggc	tac	cac	ata	cag	tac	ttt	gca	gag	aac	agc	act	1103
	Glu	Lys	Thr	Phe	Gly	Tyr	His	Ile	Gln	Tyr	Phe	Ala	Glu	Asn	Ser	Thr	
		275					280					285					
20	aac	ctc	aca	gag	ata	aac	aac	atc	acc	acc	cag	cag	tat	gaa	ctg	ctt	1151
	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Gln	Gln	Tyr	Glu	Leu	Leu	
	290					295					300				305		
25	ctg	atg	agc	cag	gca	cac	tct	gtg	tcc	gtg	act	tct	ttt	aat	tct	ctt	1199
	Leu	Met	Ser	Gln	Ala	His	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Ser	Phe	Asn	Ser	Leu	
				310						315				320			
30	ggc	aag	tcc	caa	gag	acc	atc	ctg	agg	atc	cca	gat	gtc	cat	gag	aag	1247
	Gly	Lys	Ser	Gln	Glu	Thr	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Asp	Val	His	Glu	Lys	
				325					330					335			
35	acc	ttc	cag	tac	att	aag	agc	atg	cag	gcc	tac	ata	gcc	gag	ccc	ctg	1295
	Thr	Phe	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ser	Met	Gln	Ala	Tyr	Ile	Ala	Glu	Pro	Leu	
			340					345					350				
40	ttg	gtg	gtg	aac	tgg	caa	agc	tcc	att	cct	gcg	gtg	gac	act	tgg	ata	1343
	Leu	Val	Val	Asn	Trp	Gln	Ser	Ser	Ile	Pro	Ala	Val	Asp	Thr	Trp	Ile	
		355					360					365					
45	gtg	gag	tgg	ctc	cca	gaa	gct	gcc	atg	tcg	aag	ttc	cct	gcc	ctt	tcc	1391
	Val	Glu	Trp	Leu	Pro	Glu	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Phe	Pro	Ala	Leu	Ser	
	370					375				380					385		
50	tgg	gaa	tct	gtg	tct	cag	gtc	acg	aac	tgg	acc	atc	gag	caa	gat	aaa	1439
	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Val	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Glu	Gln	Asp	Lys	
				390					395					400			

55

60

65

ES 2 310 660 T3

cta aaa cct ttc aca tgc tat aat ata tca gtg tat cca gtg ttg gga 1487
 Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu Gly
 405 410 415
 5
 cac cga gtt gga gag ccg tat tca atc caa gct tat gcc aaa gaa gga 1535
 His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly
 420 425 430
 10
 act cca tta aaa ggt cct gag acc agg gtg gag aac atc ggt ctg agg 1583
 Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu Arg
 435 440 445
 15
 aca gcc acg atc aca tgg aag gag att cct aag agt gct agg aat gga 1631
 Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn Gly
 450 455 460 465
 20
 ttt atc aac aat tac act gta ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gaa 1679
 Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Glu
 470 475 480
 25
 ctc tcc aag act gtt aac tct cat gcc ctg cag tgt gac ctg gag tct 1727
 Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu Ser
 485 490 495
 30
 ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga 1775
 Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg
 500 505 510
 35
 gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc 1823
 Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile
 515 520 525
 40
 agt gag tac tgg ctt cag gcc tca ttc tgg agt tta ctt cgg gtt gga 1871
 Ser Glu Tyr Trp Leu Gln Ala Ser Phe Trp Ser Leu Leu Arg Val Gly
 530 535 540 545
 45
 aat gtt tgacaggagc aaggagagcc agcagagggc agcagagcat ggcttctcct 1927
 Asn Val
 50
 gctctctctg gctcactcac ctcccaggag ttactgagga gctggcaaag ggagggctga 1987
 gttagaccaa caggccattt tgatccttgc tggttaagcag ccacaaataa tcttaagatg 2047
 aagcaagcaa catccacttc agcctcagcc acgtcaaagg ctggtgcctg agctcacact 2107
 55
 60
 65

ES 2 310 660 T3

5 ggccagttcc taaatgtcag gagttgtgca atagaacctg ggaaggaaca actggttgat 2167
 cagaggtcac tgacaagga cttaatgtta ccatctgcgg tggggctttt gtttcgtttt 2227
 gtttgtttgt tatgtgtatt caacttatca gcttttacgt tgaaaacatg aaaagcaaga 2287
 caaatttgtt agataacaca tataatgtga aatataatag ttttaataatt gagtaggaaa 2347
 gctgagggca tgtaatagac agagggaaaa gaagaggaaa gccagtctgg tctacaaagt 2407
 gagttccagg acagccaggg ctacatggag aaaccctgtc tcaatcaatc aatcaatcaa 2467
 10 tcaatcagtc aatcaatcaa aattcaagca gcattgacaa gttttgcaat aactactata 2527
 aaccaaaaaa gtcatcttga tgtatctcag aagccccttg ttatttatgt tcctgaagac 2587
 taaagtagac cgtggctctg agaaccatga gcaagataac acgttctgtc ctgcagccta 2647
 acaatgcctt cttggtattc ttttgatac aacttctaaa ataactttt tttaaaaaaa 2707
 15 ataaaaatca tgttacagct a 2728

<210> 114
 <211> 547
 20 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 114
 25

Met Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala
 1 5 10 15
 30 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 35 40 45
 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
 Ser Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro
 50 130 135 140
 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
 180 185 190
 60 Glu Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr

65

ES 2 310 660 T3

		195		200		205			
		Glu Tyr Val	Leu Ala Leu	Arg Phe Arg	Phe Asn Asp	Ser Arg Tyr	Trp		
5		210		215		220			
		Ser Lys Trp	Ser Lys Glu	Glu Thr Arg	Val Thr Met	Glu Glu Val	Pro		
		225		230		235		240	
		His Val Leu	Asp Leu Trp	Arg Ile Leu	Glu Pro Ala	Asp Met Asn	Gly		
10			245		250		255		
		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		
15			275		280		285		
		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		
20			305		310		315		320
		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		
25			340		345		350		
		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		
30			370		375		380		
		Ser Trp Glu	Ser Val Ser	Gln Val Thr	Asn Trp Thr	Ile Glu Gln	Asp		
			385		390		395		400
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		480
		Glu Leu Ser	Lys Thr Val	Asn Ser His	Ala Leu Gln	Cys Asp Leu	Glu		
50			485		490		495		
		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		
55			515		520		525		
		Ile Ser Glu	Tyr Trp Leu	Gln Ala Ser	Phe Trp Ser	Leu Leu Arg	Val		
			530		535		540		

<210> 115

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador ZC41.764

ES 2 310 660 T3

	<400> 115	
5	atcgaattca gaccaatggc ttctctgtg	30
	<210> 116	
	<211> 24	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador ZC41,598	
	<400> 116	
20	acagtagtgt tctgactcag ttgg	24
	<210> 117	
	<211> 21	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador ZC41,948	
	<400> 117	
35	ggtactgttc tcttgtctc g	21
	<210> 118	
40	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador ZC41.766	
	<400> 118	
50	atctctagat gtttactgtt caccttg	27
	<210> 119	
55	<211> 4026	
	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<220>	
60	<221> CDS	
	<222> (780)...(3692)	
65		

ES 2 310 660 T3

<400> 119

```

5      ctgtggacat tttaccatgc agccataaag agaggtcaaa aatgtctttc aagtgcccg 60
      ttagtaaaga tctgatggcg ttctaaggag agaaaggaac ttggatcttc gtggacaaag 120
      aattcaggtc tgtagctgaa ggaggcgtgg ccacacaggg cgtttccagg tcctgtagag 180
      gaagcacagt tcatagatct ctgttctaac acgtctgtct tgctctgaac gccgaaagtc 240
      aactcgatca caagtttgat ccaacagttt gacatttcag gtaattttca gacggagcgc 300
10     tggggttgga tctcccaagc aacacaattg gctctgtgca ggacacctgg cacggggcac 360
      tgggtcgag ctcgtccctt ctccctccag gaacaacgat gctcaaggac cagcttttcc 420
      tcccaggcct ctcccacttc ccttctcacc ggtgctgccc gcccggtccc gggaaccgcg 480
      cccgtcgag ggtcccgatc gttcccccta catcccttgg gaccaggagc aaattcctgt 540
15     ggggtcccagg agtgccaaaa gtgctcagcg agacgggaaa ttgcaacagt acttggccct 600
      tcggccctcc cccggcgctt tcccgtaact cccgccctg gacacttgtc ccgtagtga 660
      ttcatagctg gggcgcgggg ccgcctccac acgcctggac agacgtccgc gcccggtccc 720
      ctgtgaggcc gaggaccggc aaggctccgg agcaggtcgc caggcgggta atcagacca 779
20     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 Lys 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	ggg 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 Lys Asn Val	1499

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	245	250	255	1547
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	260	265	270	1595
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	275	280	285	1643
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	290	295	300	1691
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	305	310	315	1739
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	325	330	335	1787
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	340	345	350	1835
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	355	360	365	1883
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	370	375	380	1931
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	385	390	395	1979
55	gtg cgc tgt gca agt gcc aac cac ttc tgg aaa tgg agc gac tgg acc				2027

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	

ES 2 310 660 T3

	acc aca agc acc acc atc acc tca gat gat ttt aaa cca ggc gtc cgt	2555
	Thr Thr Ser Thr Thr Ile Thr Ser Asp Asp Phe Lys Pro Gly Val Arg	
5	580 585 590	
	tac aac ttc aga att ttt gaa agg tct gtg gaa cac aaa gct cgg tta	2603
	Tyr Asn Phe Arg Ile Phe Glu Arg Ser Val Glu His Lys Ala Arg Leu	
10	595 600 605	
	gta gag aaa caa aga gga tac acc cag gaa ctg gct cct ttg gtg aat	2651
	Val Glu Lys Gln Arg Gly Tyr Thr Gln Glu Leu Ala Pro Leu Val Asn	
15	610 615 620	
	cca aaa gtg gag att cct tac tcg acc cct aac tcc ttc gtt cta aga	2699
	Pro Lys Val Glu Ile Pro Tyr Ser Thr Pro Asn Ser Phe Val Leu Arg	
20	625 630 635 640	
	tgg cca gat tat gac agc gac ttc cag gct ggt ttt ata aaa ggg tac	2747
	Trp Pro Asp Tyr Asp Ser Asp Phe Gln Ala Gly Phe Ile Lys Gly Tyr	
25	645 650 655	
	ctc gtg tat gtg aaa tcc aag gag atg cag tgc aac caa ccc tgg gaa	2795
	Leu Val Tyr Val Lys Ser Lys Glu Met Gln Cys Asn Gln Pro Trp Glu	
30	660 665 670	
	agg acc ctc ctt cca gat aat tca gtc ctc tgt aaa tac gac atc aat	2843
	Arg Thr Leu Leu Pro Asp Asn Ser Val Leu Cys Lys Tyr Asp Ile Asn	
35	675 680 685	
	ggc tca gag aca aag aca ctc acc gtg gaa aac ctt cag cca gag tcc	2891
	Gly Ser Glu Thr Lys Thr Leu Thr Val Glu Asn Leu Gln Pro Glu Ser	
40	690 695 700	
	ctc tat gag ttt ttc gtc act ccg tac acc agc gct ggc cca gga ccc	2939
	Leu Tyr Glu Phe Phe Val Thr Pro Tyr Thr Ser Ala Gly Pro Gly Pro	
45	705 710 715 720	
	aat gaa acg ttc aca aag gtc aca act cca gat gca cgc tcc cac atg	2987
	Asn Glu Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Ala Arg Ser His Met	
50	725 730 735	
	ctg ctg cag atc ata cta ccc atg acc ctc tgc gtc ttg ctc agc atc	3035
	Leu Leu Gln Ile Ile Leu Pro Met Thr Leu Cys Val Leu Leu Ser Ile	
55	740 745 750	

ES 2 310 660 T3

att gtc tgc tac tgg aaa agt cag tgg gtg aag gag aag tgc tac cct 3083
 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
 Asp Ile Pro Asn Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser Leu Ile Lys Ser
 770 775 780

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 gcacaaataa 3712
Ser Thr Val Leu Leu Gly Gln Gly Glu Gln *
965 970

20 atgcactcca cacactatag gcactttggg agatgtagct gttaccatgc caacaccacg 3772
tgccctgggt ggttccaggg gtgggggttg aggggagact cattatctgc agtgctgatt 3832
tatcaacgat cactacagac caacagactt aaggaccata taatatggtg ttcaccctga 3892
aggcgttccc tagaaatggc agatccgaga gcatgctgac cttgctatta ttggtccag 3952
gtcaccctt attgcagttag cttgacatag ggtgtacacc agtcatttcg cagagcctac 4012
25 ctactcaaaa ctac 4026

<210> 120

<211> 970

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 120

Met Ala Phe Ser Val Val Leu His Pro Ala Phe Leu Leu Ala Val Leu
1 5 10 15
40 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
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
50 65 70 75 80
Val Glu Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Arg Glu Glu Ala Val Arg Trp
85 90 95
55 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

60

65

ES 2 310 660 T3

Gly Asn Trp Ser Ser Trp Lys Glu Val Asn Ala Lys Val Ser Val Glu
 130 135 140
 5 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
 165 170 175
 10 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
 195 200 205
 15 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
 225 230 235 240
 20 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
 260 265 270
 25 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
 340 345 350
 40 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
 370 375 380
 45 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
 405 410 415
 50 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
 435 440 445
 55 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						
30	625		630		635		640
	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						
35		660		665		670	
	Arg Thr Leu Leu Pro Asp Asn Ser Val Leu Cys Lys Tyr Asp Ile Asn						
		675		680		685	
40	Gly Ser Glu Thr Lys Thr Leu Thr Val Glu Asn Leu Gln Pro Glu Ser						
		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 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						
		740		745		750	
50	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	

65

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

<211> 2910

35

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido degenerado que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 120.

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

atggcnttyw sngtngtnyt ncayccngcn ttyytntyng cngtnytws nytnmgngcn 60
 wsnmgwnsng argtnytnga rgarccnytn ccnytnacnc cngarathca yaargtnwsn 120
 ttycarytna arytnarga rgtnaaytn gartggacng tccngcnyt nacncaygar 180

60

65

ES 2 310 660 T3

5 garytnaaya tgathttyca rathgarath wsmngnytna ayathwsnaa yacnathtgg 240
 gtngaraayt aywsnacnac ngtnaarmgn gargargcng tnmngntggaa ytggacnwsn 300
 gayathccny tngartgygt naarcaytty athmgnathm gngcnytngt ngaygayacn 360
 aarwsnytn cncarwsnws ntggggnaay tggwsnwsnt ggaargargt naaygcnaar 420
 gtwnsngtn arcngayaa rwsnytnath ttyccnaarg ayaargtnyt ngargarggn 480
 10 wsnaaygtna cnathtgyyt natgtayggn caraaygtnt ayaaygtnws ntgyaarytn 540
 cargaygarc cnathcaygg ngarcarytn gaywsncayg tnwsnytnyt naarytnaay 600
 aaygtngtnt tyytnwsnga yacnggnacn aayathaayt gycargcnac naarggnccn 660
 aarmgnatht tyggnacngt nytnnttygt wsnargtny tngargarcc naaraaygt 720
 wsntgygara cmngngaytt yaaracnytn gaytgywsnt ggarccngg ntngayacn 780
 15 acnytnacnt gmgnaarca rmngnttycar aaytayacny tntgygarws nttywsnaar 840
 mgntgygarg tnwsnaayta ymgnaaywsn tayacntggc arathacnga rggnwsncar 900
 garatgtaya ayttayacny nacngcngar aaycarytnm gnaarmgnws ngtnaayath 960
 aayttyaay tncncaymg ngtnccayccn aargcncnc argaygtnac nytnaarath 1020
 20 athggngcna cnaargcnaa yatgacntgg aargtncayw sncaayggnaa yaaytayacn 1080
 ytnytnngyc argtnaaryt ncartayggn gargtnathc aygarcayaa ygtwnsngtn 1140
 cayatgwsng cnaaytayt nttywsngay ytngayccng ayacnaarta yaargcntty 1200
 gtnmgntgyg cnwsngcnaa ycayttytg aartggwsng aytggacnca raargartty 1260
 25 wsnacnccng aracngcnc nwsncargcn ytngaygtnt gmgncargt ntggwsngar 1320
 aayggnmgm gnathgtnac nytnnttytg aarcnytny tnaarwsnca rgcnaayggn 1380
 aarathathw sntayaayat hgtngtngar aaygargcna arccnacnga rwsngarcay 1440
 taytggtnt gggcncncg nytnwsnacn aaytnwsny tngayytnc rccntayaar 1500
 30 athmgnatha cngcnaayaa ywsnatgggn gcnwsnccng arwsnytnat ggtnytnwsn 1560
 aaygaywsng gncaygargt naargaraar acnathaarg gnathaarga ygcnttyaay 1620
 athwsntggg arccngtnws ngngayacn atgggntayg tngtngaytg gtgygcncay 1680
 wsnargayc armgntgyga ytncartgg aaraaytng gncnaayac nacnwsnacn 1740
 35 acnathacnw sngaygayt yaarccnggn gtnmgntaya ayttymgnat httygarmgn 1800
 wsngtngar ayaargcnmg nytngtngar aarcarmgng gntayacnca rgarytnngcn 1860
 ccnytngtna ayccnaargt ngarathccn taywsnacnc cnaaywsntt ygtnytnmgn 1920
 tggccngayt aygaywsnga yttycargcn ggnttyatha arggntayyt ngntaygt 1980
 40 aarwsnaarg aratgcargt yaaycarccn tgggarmgna cnytnytncc ngayaaywsn 2040
 gtnytngtga artaygayat haayggnwsn garacnaara cnytnacngt ngaraaytn 2100
 carccngarw snytnayga rttytygt acncntaya cnwsngcngg nccnggnccn 2160
 aaygaracnt tyacnaargt nacnacncn gaycngmgnw sncaayatgt nytnarath 2220
 45 athytnccna tgacnytngt ygtnytnytn wsnathathg tntgytaytg gaarwsncar 2280
 tgggtnaarg araartgyta yccngayath ccnaayccnt ayaarwsnws nathytnwsn 2340
 ytnathaarw snaaraaraa yccncaytn athatgaayg tnaargaytg yathccngay 2400
 gtnytnarg tnathaayaa rgcngarggn wsnaracnc artgygtngg nwsnggnaar 2460
 50 ytncaayathg argaygtnc nacnaarccn ccnathgtnc cnacngaraa rgaywsnwsn 2520
 ggncngtnc cntgyathtt ytygaraay tyaacntayg aycarwsngc nttygaywsn 2580
 ggwsncayg gnytnathcc nggncnytn aargayacng cncaycaryt nggnytnytn 2640
 gncncncna ayaarttyca raaygtnytn aaraaygayt ayatgaarcc nytngtngar 2700
 55 wsnccnacng argaracnws nytnathtay gtnwsncary tngcnwsncc natgtgyggn 2760

60 gayaargaya cnytnngnac ngarccncn gtnccngtnc ayggnwsnga rtayaarmgn 2820
 caratggtng tncnggnws nytnngnwsn ccnwsnytna argargayaa ywsnytnacn 2880
 wsnacngtny tnytnngnca rgngarcar 2910

<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 gtgctacgt	19
	<210> 124	
	<211> 24	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Sonda OSMRbeta ZC43896	
	<400> 124	
40	tcatccggag tcgtgacctt cgtg	24
	<210> 125	
45	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador ZC43280	
	<400> 125	
55	gagcacgccc ttctcttct	20
	<210> 126	
60	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador ZC43281	

ES 2 310 660 T3

<400> 126

cgttgcccg t ccgtttacta

20

5

<210> 127

<211> 40

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda zcytor17lig ZC43275

15

<400> 127

ctgtaattcc tcgactattt tctgtacatc atcacttggt

40

20

<210> 128

<211> 22

25 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador ZC40574

30

<400> 128

ctcatttgga atttgccga tt

22

35

<210> 129

40 <211> 22

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Cebador ZC40575

<400> 129

ccgagtgaag atccccttt ta

22

50

<210> 130

55 <211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Sonda GUS ZC43017

<400> 130

tgaacagtca ccgacgagag tgctgg

26

65

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 cgtagcactg 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 cttgctctct	20
	<210> 135	
65	<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

gctggatatca ttggttcct tctc

24

25

<210> 137

<211> 24

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador ZC43273

35 <400> 137

cattctcttt cctctgcaaa ttca

24

40

<210> 138

<211> 34

45 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda zcytor17 ZC43478

50

<400> 138

tagagaacat ttctgcgtc tttacttcg acag

34

55

<210> 139

<211> 30

60 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Cebador ZC43278

ES 2 310 660 T3

	<400> 139	
5	aaacaagagt ctcaggatct ttataacaac	30
	<210> 140	
	<211> 21	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador ZC43279	
15	<400> 140	
20	acggcagctg tattgattcg t	21
	<210> 141	
	<211> 26	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda zcytor17lig ZC43276	
30	<400> 141	
35	taaagcaggc atctgggatg tcagca	26
	<210> 142	
	<211> 33	
40	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador ZC43045	
	<400> 142	
50	aaacatgata ttccagatag agatcagtag act	33
	<210> 143	
55	<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	
	ctgtgcgttg gaactggacg tctgatatc	29
15		
	<210> 145	
	<211> 21	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador ZC43004	
25	<400> 145	
	gaaacccgcc gcatattact t	21
30		
	<210> 146	
	<211> 19	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador ZC43005	
	<400> 146	
45	tggcgttgct cacaaaggt	19
	<210> 147	
	<211> 24	
50	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Sonda GUS ZC43018 de múdo.	
	<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	
	gccagtttca cacactcctc ttt	23
10	<210> 149	
	<211> 26	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador ZC40268	
20	<400> 149	
	gcagctattg cactagtcat ttctt	26
25	<210> 150	
	<211> 29	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda ZC40298 del Receptor de la Transferrina	
35	<400> 150	
	cccaggtagc cactcatgaa tccaatcaa	29
40	<210> 151	
	<211> 20	
45	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador ZC43140	
50	<400> 151	
	ttcttccaca gcaatcgcac	20
55	<210> 152	
	<211> 21	
60	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador ZC43139	

ES 2 310 660 T3

<400> 152

5 **atgcatgctt cgggtcagaa c** 21

<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 atttcagtg 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 taca** 24

ES 2 310 660 T3

	<210> 157	
	<211> 40	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Enlazador	
10	<400> 157	
	tgatgatgaa gccctgaaag acgcgcagac taattcgagc	40
15	<210> 158	
	<211> 60	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Enlazador	
25	<400> 158	
	acgcgcagac taattcgagc tcccaccatc accatcacca cgccaattcg gtaccgctgg	60
30	<210> 159	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Enlazador	
40	<400> 159	
	actcactata gggcgaattg cccgggggat ccacgcggaa ccagcggtag cgaattcgcg	60
45	<210> 160	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Enlazador	
	<400> 160	
55	acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tg	42
60	<210> 161	
	<211> 825	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
65	<221> CDS	
	<222> (48)...(518)	

ES 2 310 660 T3

<400> 161

```

5      atcactctct ttaatcacta ctacattaa cctcaactcc tgccaca atg tac agg 56
                                           Met Tyr Arg
                                           1

10     atg caa ctc ctg tct tgc att gca cta att ctt gca ctt gtc aca aac 10
Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu Val Thr Asn
      5              10              15

15     agt gca cct act tca agt tcg aca aag aaa aca aag aaa aca cag cta 15
Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Lys Lys Thr Gln Leu
      20              25              30              35

20     caa ctg gag cat tta ctg ctg gat tta cag atg att ttg aat gga att 20
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
              40              45              50

25     aat aat tac aag aat ccc aaa ctc acc agg atg ctc aca ttt aag ttt 24
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
              55              60              65

30     tac atg ccc aag aag gcc aca gaa ctg aaa cag ctt cag tgt cta gaa 29
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Cys Leu Glu
              70              75              80

35     gaa gaa ctc aaa cct ctg gag gaa gtg ctg aat tta gct caa agc aaa 34
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
      85              90              95

40

45     aac ttt cac tta aga ccc agg gac tta atc agc aat atc aac gta ata 392
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100              105              110              115

50     gtt ctg gaa cta aag gga tct gaa aca aca ttc atg tgt gaa tat gca 440
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
              120              125              130

55     gat gag aca gca acc att gta gaa ttt ctg aac aga tgg att acc ttt 488
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
              135              140              145

60     tgt caa agc atc atc tca aca cta act tga taattaagtg cttcccactt 538
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr *
              150              155

65     aaaacatac aggccttcta tttatttatt taaatatatta aattttatat ttattgttga 598
atgtatggtt gctacctatt gtaactatta ttcttaatct taaaactata aatatggatc 658
ttttatgatt ctttttgtaa gccctagggg ctctaaaatg gtitacctta tttatcccaa 718
aaatatattat tattatgttg aatgttaa atagtatcta ttagatttgg 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
        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)

50

55

60

65

ES 2 310 660 T3

<400> 163

```

5      gatcgttagc ttctcctgat aaactaattg cctcacattg tcactgcaaa 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 tgc agc tga atattttaat ttatgagttt 545
      Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser *
              145          150

55     ttgatagctt tatttttttaa gtattttatat atttataact catcataaaaa taaagtatat 605
      atagaatct 614

```

<210> 164

<211> 153

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

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

```

30

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 gcc agc ctc acc aag ctc aag gcc 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 cctgggccac actgacctg atacagccat 603
      ggcagaagaa tgggaatatt ttacttgac agaaatcagt aatatttata tatttatatt 663
      tttaaaatat ttatttattt atttatttaa gttcatattc catatttatt caagatgttt 723
60     taccgtaata attattatta aaaatatgct tct 756

```

<210> 166

<211> 144

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 310 660 T3

<400> 166

```

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
 1           5           10           15
5 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
 35           40           45
10 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
20 Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
 100          105          110
Cys Ala Thr Gln Thr Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
 115          120          125
25 Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 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

<222> (1)...(60)

45 <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
 1           5           10           15

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