



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 276**

51 Int. Cl.:

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00961688 .9**

86 Fecha de presentación : **08.09.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1210434**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.06.2002**

54

Título: **p40 de interleuquina-12 de mamífero e interleuquina B30. Sus combinaciones. Anticuerpos. Usos en composiciones farmacéuticas.**

30

Prioridad: **09.09.1999 US 393090**
10.11.1999 US 164616 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73

Titular/es: **Schering Corporation**
2000 Galloping Hill Road
Kenilworth, New Jersey 07033-0530, US

72

Inventor/es: **Oppmann, Birgit;**
De Waal Malefyt, Rene;
Rennick, Donna, M.;
Kastelein, Robert, A.;
Wiekowski, Maria, T.;
Lira, Sergio, A. y
Narula, Satwant, K.

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 300 276 T3

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

DESCRIPCIÓN

p40 de interleuquina-12 de mamífero e interleuquina B30. Sus combinaciones. Anticuerpos. Usos en composiciones farmacéuticas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de composiciones y métodos relacionados con proteínas, que funcionan en el control de la biología y fisiología de células de mamíferos, por ejemplo células de un sistema inmune de mamífero. En particular, proporciona genes, proteínas, anticuerpos y reactivos relacionados purificados y métodos que son útiles, por ejemplo para regular la activación, el desarrollo, la diferenciación y la función de diversos tipos de células, incluyendo las células hematopoyéticas.

15 **Antecedentes de la invención**

La tecnología de DNA recombinante se refiere en general a las técnicas de integrar la información genética de una fuente donadora en vectores para el procesamiento subsiguiente, tal como a través de la introducción en un hospedante, mediante lo cual la información genética transferida se copia y/o se expresa en el nuevo ambiente. Comúnmente, la información genética existe en forma de DNA complementario (DNAc) derivado de RNA mensajero (RNAm) que codifica un producto proteínico deseado. El vehículo frecuentemente consiste en un plásmido que tiene la capacidad de incorporar el DNAc para su replicación posterior en un hospedante y, en algunos casos, para controlar realmente la expresión del DNAc y dirigir de esta manera la síntesis del producto codificado en un hospedante.

Desde hace algún tiempo, es conocido que la respuesta inmune de un mamífero se basa en una serie de complejas interacciones celulares, denominadas "sistema inmune". Véase por ejemplo, Paul (1998), *Fundamental Immunology* (4ª ed.), Raven Press, NY. Recientes investigaciones han proporcionado nuevos puntos de vista en cuanto al funcionamiento interno de este sistema. Aunque está claro que la mayor parte de la respuesta gira, de hecho, alrededor de las interacciones de tipo reticular de linfocitos, macrófagos, granulocitos y otras células, los inmunólogos sostienen actualmente la opinión de que las proteínas solubles, conocidas como linfoquinas, citoquinas o monoquinas, desempeñan un papel crítico en el control de estas interacciones celulares. Así, existe un considerable interés en el aislamiento, la caracterización, y en los mecanismos de acción de los factores moduladores celulares, la comprensión de los cuales conducirá a obtener significativos avances en el diagnóstico y terapia de numerosas anomalías médicas, por ejemplo, los trastornos del sistema inmune. Algunos de estos factores son factores de desarrollo hematopoyético, por ejemplo, el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF). Véase, por ejemplo, Thomson (ed. 1998) *The Cytokine Handbook* (3ª ed.) Academic Press, San Diego; Mire-Sluis and Thorpe (ed. 1998) *Cytokines*, Academic Press, San Diego; Metcalf y Nicola (1995) *The Hematopoietic Colony Stimulating Factors*, Cambridge University Press; y Aggarwal y Gutterman (1991) *Human Cytokines*, Blackwell Pub. La expresión de citoquinas por células del sistema inmune desempeña un importante papel en la regulación de la respuesta inmune. La mayor parte de las citoquinas son pleiotrópicas y tienen múltiples actividades biológicas incluyendo presentación de antígenos; activación; proliferación y diferenciación de los subconjuntos de células CD4+ T; respuesta a anticuerpos mediante las células B; y manifestaciones de hipersensibilidad. Además las citoquinas pueden usarse para diagnóstico y en la terapia de una amplia gama de estados degenerativos o anormales que implican directa o indirectamente al sistema inmune y/o las células hematopoyéticas.

Las linfoquinas median aparentemente las actividades celulares en una variedad de modos. Han demostrado que mantienen la proliferación, desarrollo y/o diferenciación de las células madres hematopoyéticas pluripotenciales en vastos números de progenitores que comprenden diversos linajes celulares que constituyen un complejo sistema inmune. Son necesarias interacciones adecuadas y equilibradas entre los componentes celulares para obtener una respuesta inmune saludable. Los diferentes linajes celulares responden frecuentemente de diferente modo cuando se administran linfoquinas junto con otros agentes.

Los linajes de células especialmente importantes para la respuesta inmune incluyen dos clases de linfocitos: las células B, que pueden producir y secretar inmunoglobulinas (proteínas con capacidad de reconocer, y unirse a, materia extraña para efectuar su eliminación), y las células T de diversos subconjuntos que secretan linfoquinas y que inducen o suprimen las células B y otras diversas células (incluyendo otras células T) que constituyen el sistema inmune. Estos linfocitos interactúan con muchos otros tipos de células.

De lo que antecede, resulta evidente que el descubrimiento y desarrollo de nuevas linfoquinas, por ejemplo, las relacionadas con G-CSF y/o IL6, podrían contribuir a nuevas terapias para una amplia gama de estados degenerativos o anormales que implican directa o indirectamente al sistema inmune y/o a las células hematopoyéticas. En particular, sería sumamente ventajoso el descubrimiento y desarrollo de linfoquinas que mejoren o que potencien las actividades beneficiosas de las linfoquinas conocidas. Originalmente se identificó el nuevo gen IL-B30 como el de una potencial citoquina en base a su estructura predicha, y se clasificó como una citoquina de cadena larga de tipo IL6 y G-CSF (solicitud de patente internacional PCT/US 98/15423 (WO 99/05280). La IL-6 y las citoquinas relacionadas, tales como la oncostatina M, el factor inhibidor de leucemia (LIF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y la cardiotrofina-1 tienen actividades biológicas sobre la hematopoyesis, trombopoyesis, inducción de una respuesta en fase aguda, formación de osteoclastos, diferenciación de neuronas y supervivencia e hipertrofia cardíaca. La expresión transgénica de IL-B30 en ratones indujo un fenotipo similar al que se observó después de la sobreexpresión de IL-6 en ratones,

ES 2 300 276 T3

que comprende enanismo, inflamación sistémica, infertilidad y muerte. La IL-B30 parece ser una nueva citoquina implicada en la inflamación.

La solicitud de patente internacional WO99/05280 describe la IL-B30.

Presky *et al.*, (*Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, volumen 93, 26 de noviembre de 1996, páginas 14002-14007) describen la IL-12, su receptor y anticuerpos para la misma.

La solicitud de patente europea EP-A-0433827 se refiere a una citoquina denominada factor de maduración de linfocitos citotóxicos (CLMF) que induce células asesinas activadas por linfoquinas (LAK) en presencia de IL-12.

La patente de EE.UU. 5.851.523 se refiere a la adición de IL-12 e IL-6 a células T.

Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento del papel fisiológico de la IL-B30, denominada también en la presente memoria como proteína IL-B30, y su papel en la respuesta inmune. En particular, el papel de la IL-B30 ha sido aclarado en vías que están implicadas en la inflamación, enfermedades infecciosas, desarrollo hematopoyético e infección viral. La invención se refiere específicamente a composiciones que comprenden combinaciones de la subunidad p40 de IL-12, con la interleuquina B30 (IL-B30) y sus actividades biológicas. La invención incluye ácidos nucleicos que codifican tanto polipéptidos como proteínas de fusión, y métodos para su producción y uso. Los ácidos nucleicos de la invención se caracterizan, en parte, por su homología con las secuencias de DNA complementario (DNAc) descritas en este texto y/o por ensayos funcionales. Asimismo se proporcionan polipéptidos, anticuerpos y métodos para usarlos, que incluyen usar métodos de expresión de ácidos nucleicos. Se proporcionan métodos para modular o intervenir en el control de una fisiología que depende del factor de crecimiento o una respuesta inmune.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la subunidad p40 de IL-12 también se asocia con la citoquina IL-B30 descrita previamente, por ejemplo, en las solicitudes de patente de EE.UU. 08/900.905 y 09/122.443, en forma natural. Por lo tanto, la co-expresión de los dos polipéptidos conjuntamente da como resultado unión al receptor funcional y señalización.

Por lo tanto, la presente invención proporciona:

Una composición que comprende un complejo de:

- i) Un polipéptido p40 de IL-12 humano, maduro y sustancialmente puro, y
- ii) Un polipéptido maduro sustancialmente puro de SEQ. ID NO:2.

La invención también proporciona:

un ácido nucleico recombinante que codifica la composición de la invención.

La invención también proporciona un anticuerpo o su fragmento de unión que específicamente se une a una composición de la invención, pero no a un polipéptido p40 de IL-12 humana, maduro o a un polipéptido maduro de la SEQ-ID. NO:2 solo.

La invención también proporciona el uso de la composición de la invención en la fabricación de un medicamento para modular una respuesta inflamatoria, y al uso del anticuerpo o fragmento de unión de la invención en la fabricación de un medicamento para modular la fisiología o desarrollo de una célula, en donde la modulación da como resultado la mejora de:

- a) Un estado autoinmune; o
- b) Un estado inflamatorio crónico.

También se describen en la presente memoria composiciones que comprenden: a) tanto un polipéptido sustancialmente puro que comprende una pluralidad de distintos segmentos de por lo menos 7 aminoácidos contiguos de p40 de IL-12 como un polipéptido sustancialmente puro que comprende una pluralidad de distintos segmentos de por lo menos 7 aminoácidos contiguos de IL-B30; b) tanto un polipéptido sustancialmente puro que comprende por lo menos 11 aminoácidos contiguos de p40 de IL-12 como un polipéptido sustancialmente puro que comprende por lo menos 11 aminoácidos contiguos de IL-B30; c) un polipéptido sustancialmente puro que comprende tanto una pluralidad de distintos segmentos de por lo menos 7 aminoácidos contiguos de p40 de IL-12 como una pluralidad de distintos segmentos de por lo menos 7 aminoácidos contiguos de IL-B30; o d) un polipéptido sustancialmente puro que comprende tanto un segmento de por lo menos 11 aminoácidos contiguos de p40 de IL-12 como un segmento de por lo menos 11 aminoácidos contiguos de IL-B30. Diversas realizaciones de la descripción incluyen dichas composiciones: a) en donde la pluralidad descrita de distintos segmentos de por lo menos 7 aminoácidos contiguos comprende un segmento de por lo menos 9 aminoácidos contiguos; b) en donde la pluralidad descrita de distintos segmentos de por lo menos

ES 2 300 276 T3

7 aminoácidos contiguos, son ambas de por lo menos 9 aminoácidos contiguos; c) en donde el segmento descrito de por lo menos 11 aminoácidos contiguos de p40 de IL-12 es de por lo menos 15 aminoácidos contiguos; d) en donde el segmento descrito de por lo menos 11 aminoácidos contiguos de IL-B30 es de por lo menos 15 aminoácidos contiguos. Las composiciones de la invención comprenden además un vehículo seleccionado de un compuesto acuoso que incluye agua, solución salina y/o un tampón; y pueden estar formuladas para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral; o ser estériles. Otras realizaciones de la invención incluyen aquellas en las cuales: a) en donde por lo menos uno de los polipéptidos descritos: i) está marcado detectablemente; ii) es producido recombinantemente; iii) está no glucosilado; iv) está desnaturalizado; v) está unido a un sustrato sólido; o vi) está conjugado con otro resto químico; b) que comprende tanto un polipéptido p40 de IL-12 sustancialmente puro como un polipéptido de IL-B30 sustancialmente puro; c) que comprende un polipéptido p40 de IL-12 sustancialmente puro fusionado con IL-B30; o d) combinado con IL-18, IL-12, radiación o quimioterapia, un coadyuvante inmune o un anti-viral. Las realizaciones de kit incluyen los que comprenden dicha composición descrita y: a) un compartimento que comprende el polipéptido descrito; o b) instrucciones para el uso o desecho de reactivos en el kit descrito.

Las composiciones de ácido nucleico de la invención incluyen, por ejemplo, un ácido nucleico recombinante o aislado, que codifica: a) tanto un polipéptido sustancialmente puro que comprende una pluralidad de distintos segmentos de por lo menos 7 aminoácidos contiguos de p40 de IL-12 como un polipéptido sustancialmente puro que comprende una pluralidad de segmentos distintos de por lo menos 7 aminoácidos contiguos de IL-B30; b) tanto un polipéptido sustancialmente puro que comprende por lo menos 11 aminoácidos contiguos de p40 de IL-12 como un polipéptido sustancialmente puro que comprende por lo menos 11 aminoácidos contiguos de IL-B30; c) un polipéptido sustancialmente puro que comprende tanto una pluralidad de distintos segmentos de por lo menos 7 aminoácidos contiguos de p40 IL-12 como una pluralidad de distintos segmentos de por lo menos 7 aminoácidos contiguos de IL-B30; o d) un polipéptido sustancialmente puro que comprende tanto un segmento de por lo menos 11 aminoácidos contiguos de p40 de IL-12 y un segmento de por lo menos 11 aminoácidos contiguos de IL-B30. Diversas realizaciones de la descripción incluyen dicho ácido nucleico: a) en donde la pluralidad descrita de segmentos distintos de por lo menos 7 aminoácidos contiguos comprende un segmento de por lo menos 9 aminoácidos contiguos; b) en donde la pluralidad descrita de distintos segmentos de por lo menos 7 aminoácidos contiguos consiste en por lo menos 9 aminoácidos contiguos; c) en donde el segmento descrito de por lo menos 11 aminoácidos contiguos de p40 de IL-12 consiste en que por lo menos 15 aminoácidos contiguos; d) en donde el segmento descrito de por lo menos 11 aminoácidos contiguos de IL-B30 es de por lo menos 15 aminoácidos contiguos; e) en donde p40 de IL-12 descrita es de un primate; f) en donde la IL-B30 descrita es de un primate. El ácido nucleico de la invención puede ser un vector de expresión; puede comprender además un origen de replicación; puede comprender un marcador detectable; puede comprender una secuencia nucleotídica sintética; puede ser menor de 6 kb, preferiblemente menor de 3 kb. También se describe un ácido nucleico de un primate. Asimismo se proporciona una célula que comprende el ácido nucleico recombinante descrito, incluyendo que la célula descrita es: una célula procariota, eucariota, bacteriana, de levadura, de insecto, de mamífero, de ratón, de primate o humana. Las realizaciones de kit incluyen las que comprenden un ácido nucleico descrito y: a) un compartimento que comprende el ácido nucleico descrito; b) un compartimento que comprende además un polipéptido p40 de IL-12 de primate; c) un compartimento que comprende además un polipéptido IL-B30 de primate; o d) instrucciones para uso o desecho de reactivos en el kit descrito.

También se describe en la presente memoria un ácido nucleico que se hibrida: a) en condiciones de lavado de 30 minutos a 50°C y menos de una sal 1M a la porción codificadora madura natural de p40 de IL-12 de primate; y b) en condiciones de lavado de 30 minutos a 50°C y menos de una sal 1M a la porción codificadora madura natural de IL-B30 de primate. Diversas realizaciones de la descripción incluyen dicho ácido nucleico descrito, en donde: a) las condiciones de lavado descritas para p40 de IL-12 son a 60°C y menos de sal 400 mM; b) las condiciones de lavado descritas para IL-B30 son a 60°C y menos de sal 400 mM; c) el ácido nucleico descrito exhibe identidad en un tramo de por lo menos 50 nucleótidos con la secuencia que codifica p40 de IL-12 de primate; y/o d) el ácido nucleico descrito exhibe identidad en un tramo de por lo menos 50 nucleótidos con la secuencia que codifica IL-B30 de primate. Las realizaciones preferidas de la descripción incluyen dicho ácido nucleico en donde: a) las condiciones de lavado descritas para p40 de IL-12 son a 65°C y menos de 150 mM de sal; b) las condiciones de lavado descritas para IL-B30 son a 65°C y menos de sal 150 mM; c) el ácido nucleico descrito exhibe identidad en un tramo de por lo menos 90 nucleótidos con la secuencia que codifica p40 de IL-12 de primate; y/o d) el ácido nucleico descrito exhibe identidad en un tramo de por lo menos 90 nucleótidos con la secuencia que codifica IL-B30 de primate.

Se describen antagonistas de las composiciones p40 de IL-12/IL-B30 combinadas con, por ejemplo un antagonista de α TNF, un antagonista de IL-12, IL-10 o esteroides.

La invención proporciona también un compuesto de unión, es decir un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión, que se une específicamente a una composición p40 de IL-12/IL-B30, de la invención; pero no a cualquier p40 de IL-12 humano maduro o polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 solo. El anticuerpo o su fragmento de unión puede: a) estar en un recipiente; b) puede ser un fragmento Fv, Fab o Fab₂; c) estar conjugado con otro resto químico; o d) el anticuerpo descrito puede; i) ser producido contra una composición p40 de IL-12/IL-B30; ii) ser inmunoseleccionado; iii) ser un anticuerpo policlonal; iv) exhibir una Kd para el antígeno de por lo menos 30 mM; v) estar unido a un sustrato sólido, incluyendo una bolita o una membrana de plástico; vi) estar en una composición estéril; o vii) estar marcado detectablemente, incluyendo un marcador radioactivo o fluorescente. Ciertas formas preferidas incluyen composiciones que comprenden: a) un anticuerpo o fragmento de unión estéril de la invención; o b) el anticuerpo o fragmento de unión de la invención y un vehículo, en donde el vehículo descrito es: i) un compuesto acuoso que incluye agua, solución salina y/o tampón; y/o ii) está formulado para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral.

ES 2 300 276 T3

Adicionalmente, se proporcionan realizaciones de kit que comprenden el anticuerpo descrito y: a) un compartimento que comprende el compuesto de unión descrito; o b) instrucciones para el uso o desecho de reactivos en el kit descrito.

5 También se describen métodos para producir un complejo antígeno:anticuerpo, que comprende poner en contacto, en condiciones apropiadas, una composición de p40 de IL-12/IL-B30 de primate con un compuesto de unión descrito, permitiendo de esta manera que se forme el complejo descrito. Varios métodos incluyen aquellos en donde: a) el complejo descrito se purifica de otras citoquinas; b) el complejo descrito se purifica de otros anticuerpos; c) el contacto descrito se efectúa con una muestra que comprende una citoquina; d) el contacto descrito permite la detección cuantitativa del antígeno descrito; e) el contacto descrito se efectúa con una muestra que comprende el anticuerpo descrito; 10 o f) el contacto descrito permite la detección cuantitativa del anticuerpo descrito.

La invención también se refiere a métodos de modular la fisiología o el desarrollo de una célula o tejido que comprende poner en contacto la célula descrita con una composición p40 de IL-12/IL-B30 o uno de sus antagonistas. Un método preferido consiste en modular la fisiología o desarrollo de una célula que comprende poner en contacto la 15 célula descrita con una composición p40 de IL-12/IL-B30, y el contacto descrito da como resultado un aumento de la producción de IFN γ . Típicamente, la célula descrita es de un organismo hospedante, y el organismo descrito exhibe una respuesta a Th1 mejorada, por ejemplo, una seleccionada de: un efecto antitumoral; un efecto coadyuvante; un efecto anti-viral; o un efecto alérgico antagonizado. Frecuentemente, el contacto se realiza en combinación con: IL-18; IL-12; terapia de radiación o quimioterapia; un coadyuvante inmune; o un agente terapéutico anti-viral. 20

En otra realización de la descripción, el antagonista descrito consiste en un anticuerpo contra la subunidad β 1 del receptor de IL-12. Por lo tanto, la invención abarca también un método, tal como se ha descrito, en donde el contacto descrito es con un antagonista, y el contacto descrito da como resultado una disminución relativa de la producción de IFN γ . Por lo tanto, también se describen métodos para modular la fisiología o desarrollo de una célula en un organismo 25 hospedante, que comprende administrar el antagonista descrito al organismo descrito, en donde el contacto descrito da como resultado una mejora de: un estado autoinmune o un estado inflamatorio crónico.

También, como se describe en la presente memoria, la identificación de la asociación de las dos subunidades proporciona métodos para aumentar la secreción de: a) IL-B30 de primate, comprendiendo dicho método expresar el polipéptido descrito con p40 de IL-12; o b) p40 de IL-12 de primate, comprendiendo dicho método expresar el p40 de IL-12 descrito con IL-B30. Preferiblemente: a) el aumento descrito es de por lo menos 3 veces; o bien b) la expresión descrita es de un ácido nucleico recombinante que codifica IL-B30 y p40 de IL-12. 30

Se proporcionan métodos para escrutar un receptor al que se une a la composición p40 de IL-12/IL-830 descrita, por ejemplo, que comprende poner en contacto el complejo descrito con una célula que expresa el receptor descrito bajo 35 condiciones que permiten que el complejo descrito se una al receptor descrito, formando de este modo una interacción detectable. Preferiblemente, la interacción descrita da como resultado una respuesta fisiológica en la célula descrita.

También se describen métodos para modular el tráfico o la activación de un leucocito en un animal, comprendiendo 40 dichos métodos poner en contacto células de linajes de monocito/macrófago en el animal con una cantidad terapéutica de un agonista de una proteína IL-B30 de mamífero; o un antagonista de una proteína IL-B30 de mamífero. Las realizaciones preferidas de la descripción incluyen aquellas en las cuales: la proteína IL-B30 de mamífero es una proteína de primate; y/o el antagonista es un anticuerpo que se une a IL-B30 de mamífero. Ciertas realizaciones incluyen aquellas en las cuales las células de linajes de monocito/macrófago incluyen una célula microglial o una 45 célula dendrítica, o aquellas en donde el animal exhibe signos o síntomas de un estado inflamatorio, leucoproliferativo, neurodegenerativo o post-traumático. Las realizaciones preferidas incluyen aquellas en las cuales el signo o síntoma está en tejido pulmonar; tejido hepático; tejido neural; tejido linfóide; tejido mieloide; páncreas; tejido gastrointestinal; tejido de tiroides; tejido muscular; o piel o tejido colagenoso.

Otros métodos incluyen aquellos en donde la modulación es una función inhibidora de la célula leucocítica; y/o en donde lo que se administra es el agonista. Preferiblemente, el agonista es IL-B30 de mamífero. 50

Ciertas realizaciones incluyen aquellas en las cuales el animal experimenta signos o síntomas de autoinmunidad; un estado inflamatorio; autoinmunidad específica de tejido; autoinmunidad degenerativa; artritis reumatoide; osteoartritis; aterosclerosis; esclerosis múltiple; vasculitis; hipersensibilidades demoradas; injerto de piel; un trasplante; lesiones espinales; ictus; neurodegeneración; una enfermedad infecciosa; isquemia; cáncer; tumores; mieloma múltiple; enfermedad de Castleman; osteoporosis post-menopáusica o enfermedades asociadas con IL-6. La administración puede ser en combinación con: un agonista o antagonista de citoquina anti-inflamatorio; un analgésico; un agente anti-inflamatorio; o un esteroide. 55

Se describen otros diversos métodos en los cuales la modulación es una función potenciadora de la célula leucocítica y/o lo que se administra es el antagonista. Preferiblemente, el antagonista es: un anticuerpo que se une a IL-B30 de mamífero; o una muteína de IL-B30 de mamífero que compite con IL-B30 de mamífero en la unión a un receptor de IL-B30, pero que no señala sustancialmente. En varias realizaciones, se aplica un método en el cual el animal experimenta signos o síntomas de curación de heridas o formación de coágulos. La administración será frecuentemente 60 en combinación con: un factor angiogénico; un factor de crecimiento, que incluye FGF o PDGF; un antibiótico; o un factor de coagulación.

ES 2 300 276 T3

Finalmente se describe un método para inducir la proliferación de células T de memoria administrando IL-B30 o uno de sus agonistas.

5 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Descripción

- 10 I. Aspectos generales
- 15 II. Complejo p40 de IL-12/IL-B30 purificado
- A. Propiedades físicas
- B. Propiedades biológicas
- 20 III. Variantes físicas
- A. Variantes de secuencia, fragmentos
- B. Variantes post-traduccionales
- 25 1. Glucosilación
2. Otros
- 30 IV. Variantes funcionales
- A. Análogos, fragmentos
- 35 1. Agonistas
2. Antagonistas
- B. Miméticos
- 40 1. Proteína
2. Productos químicos
- C. Variantes de especies
- 45 V. Anticuerpos
- A. Policlonales
- 50 B. Monoclonales
- C. Fragmentos, composiciones de unión.
- 55 VI. Ácidos nucleicos
- A. Aislados naturales; métodos
- 60 B. Genes sintéticos
- C. Métodos para aislamiento
- 65

ES 2 300 276 T3

VII. Preparación del complejo p40/IL-B30, mimético

- A. Métodos recombinantes
- B. Métodos de síntesis
- C. Purificación natural

VIII. Usos

- A. Diagnósticos
- B. Terapéuticos

IX. Kits

- A. Reactivos de ácidos nucleicos
- B. Reactivos de proteínas
- C. Reactivos de anticuerpos

X. Aislamiento de receptores para los complejos p40/IL-B30

I. Aspectos generales

La presente invención proporciona descripción y enseñanzas de apareamiento de proteínas de mamíferos para preparar una citoquina soluble, por ejemplo, una molécula secretada que puede mediar una señal entre células inmunes u otras células. Véase, por ejemplo, Paul (1998) *Fundamental Immunology* (4th ed.) Raven Press, N.Y. Ciertos factores solubles están constituidos por polipéptidos heterodímeros, por ejemplo IL-6 e IL-12. Las formas dímeras que son probablemente las formas fisiológicas, y los fragmentos, o antagonistas serán útiles, por ejemplo, en la modulación fisiológica de células que expresan un receptor. Es probable que la citoquina funcional que comprende el complejo p40/IL-B30 tenga efectos estimuladores o inhibidores sobre las células hematopoyéticas, incluyendo por ejemplo, células linfoides, tales como células T, células B, células asesinas naturales (abreviadamente NK por la expresión inglesa *natural killer*), macrófagos, células dendríticas, progenitoras hematopoyéticas, etc. Las proteínas serán también útiles como antígenos, por ejemplo, como inmunógenos, para producir anticuerpos para varios epítomos de la proteína, tanto epítomos lineales como conformacionales.

Ya ha sido descrita la subunidad p40 de IL-12. Véase, por ejemplo, Seiler *et al.*, Patente de EE.UU. 5.547.852; Scott y Trinchieri, Patente de EE.UU. 5.571.515; Gately *et al.*, Patente de EE.UU. 5.650.492; Liesehke y Mulligan, Patente de EE.UU. 5.891.680; Wame *et al.*, Patente de EE.UU. 5.744.132; y los números de acceso gbM86671, gbAF133197, gbU16674, gbU83184, embY07762, embY11129.1, gbM65272, gbAF007576, gbU19841, gbU11815, gbU57752, gbAF004024, gbU49100, gbU19834, y embX97019. Se identificó una secuencia que codifica IL-B30 a partir de una secuencia genómica humana. La molécula fue denominada huIL-B30. También se describió una secuencia de roedor, por ejemplo, de ratón. Véase, por ejemplo, las solicitudes de patentes de EE.UU. números de serie 08/900.905 y 09/122.443. La presente invención abarca composiciones que comprenden complejos de estos dos polipéptidos, por ejemplo, p40 e IL-B30, y construcciones de ácido nucleico que codifican ambas secuencias. También se proporcionan anticuerpos que reconocen las combinaciones, y los métodos para producir los dos mensajes o polipéptidos, por ejemplo, coordinadamente.

El gen IL-B30 humano codifica una pequeña proteína soluble de tipo citoquina, de aproximadamente 198 aminoácidos. La secuencia señal predicha *psort* tiene probablemente aproximadamente 17 residuos, y se extendería desde *Met* hasta aproximadamente *Ala*. Véase la Tabla 1 y las SEQ. ID. NO: 1 y 2. La IL-B30 exhibe restos estructurales característicos de un miembro de las citoquinas de cadena larga. Compárese, por ejemplo, IL-B30, G-CSF e IL-6, secuencias obtenibles de GenBank. Véanse también las solicitudes de patentes de EE.UU. SN 08/900.905 y 09/122.443.

ES 2 300 276 T3

TABLA 1

Ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) que codifica IL-B30 de un primate, por ejemplo, un ser humano.
La secuencia de aminoácidos traducida es LA SEQ ID NO: 2

5	ATG CTG GGG AGC AGA GCT GTA ATG CTG CTG TTG CTG CTG CCC TGG ACA	48
	Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr	
	-21 -20 -15 -10	
10	GCT CAG GGC AGA GCT GTG CCT GGG GGC AGC AGC CCT GCC TGG ACT CAG	96
	Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln	
	-5 1 5 10	
15	TGC CAG CAG CTT TCA CAG AAG CTC TGC ACA CTG GCC TGG AGT GCA CAT	144
	Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His	
	15 20 25	
20	CCA CTA GTG GGA CAC ATG GAT CTA AGA GAA GAG GGA GAT GAA GAG ACT	192
	Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr	
	30 35 40	
25	ACA AAT GAT GTT CCC CAT ATC CAG TGT GGA GAT GGC TGT GAC CCC CAA	240
	Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln	
	45 50 55	
30	GGA CTC AGG GAC AAC AGT CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CAC CAG GGT	288
	Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly	
	60 65 70 75	
35	CTG ATT TTT TAT GAG AAG CTG CTA GGA TCG GAT ATT TTC ACA GGG GAG	336
	Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu	
	80 85 90	
40	CCT TCT CTG CTC CCT GAT AGC CCT GTG GCG CAG CTT CAT GCC TCC CTA	384
	Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala	
	140 145 150 155	
45	GCC CGG GTC TTT GCC CAT GGA GCA GCA ACC CTG AGT CCC TAA	570
	Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro	
	160 165	
	MLGSRAVMLLLLLPWTAAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSOKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEE TTNDVPHIQCGDGDPOGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSSLPDPVAQLHA SLLGLSOLLQPEGHHWETQQIPLSLSPSQPWORLLLRFKILRSLQAFVAVAARVFAHGAATLSP	

Secuencia codificadora:

50	ATGCTGGGGA GCAGAGCTGT AATGCTGCTG TTGCTGCTGC CCTGGACAGC
	TCAGGGCAGA GCTGTGCCTG GGGGCAGCAG CCCTGCCTGG ACTCAGTGCC
	AGCAGCTTTC ACAGAAGCTC TGCACACTGG CCTGGAGTGC ACATCCACTA
	GTGGGACACA TGGATCTAAG AGAAGAGGGA GATGAAGAGA CTACAAATGA
55	TGTTCCCCAT ATCCAGTGTG GAGATGGCTG TGACCCCCAA GGACTCAGGG
	ACAACAGTCA GTTCTGCTTG CAAAGGATCC ACCAGGGTCT GATTTTTTAT
	GAGAAGCTGC TAGGATCGGA TATTTTCACA GGGGAGCCTT CTCTGCTCCC
	TGATAGCCCT GTGGCGCAGC TTCATGCCTC CCTACTGGGC CTCAGCCAAC
60	TCCTGCAGCC TGAGGGTCAC CACTGGGAGA CTCAGCAGAT TCCAAGCCTC
	AGTCCCAGCC AGCCATGGCA GCGTCTCCTT CTCCGCTTCA AAATCCTTCG
	CAGCCTCCAG GCCTTTGTGG CTGTAGCCGC CCGGGTCTTT GCCCATGGAG
65	CAGCAACCCT GAGTCCCTAA

ES 2 300 276 T3

Roedor, por ejemplo ratón, IL-B30 (SEQ ID NO: 3 y 4):

5	CGCTTAGAAG TCGGACTACA GAGTTAGACT CAGAACCAAA GGAGGTGGAT AGGGGGTCCA	60
	CAGGCCTGGT GCAGATCACA GAGCCAGCCA GATCTGAGAA GCAGGGAACA AG ATG Met -21	115
10	CTG GAT TGC AGA GCA GTA ATA ATG CTA TGG CTG TTG CCC TGG GTC ACT Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val Thr -20 -15 -10 -5	163
15	CAG GGC CTG GCT GTG CCT AGG AGT AGC AGT CCT GAC TGG GCT CAG TGC Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys 1 5 10	211
	CAG CAG CTC TCT CGG AAT CTC TGC ATG CTA GCC TGG AAC GCA CAT GCA Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala 15 20 25	259
20	CCA GCG GGA CAT ATG AAT CTA CTA AGA GAA GAA GAG GAT GAA GAG ACT Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr 30 35 40	307
25	AAA AAT AAT GTG CCC CGT ATC CAG TGT GAA GAT GGT TGT GAC CCA CAA Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln 45 50 55 60	355
30	GGA CTC AAG GAC AAC AGC CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CGC CAA GGT Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly 65 70 75	403
35	CTG GCT TTT TAT AAG CAC CTG CTT GAC TCT GAC ATC TTC AAA GGG GAG Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu 80 85 90	451
40	CCT GCT CTA CTC CCT GAT AGC CCC ATG GAG CAA CTT CAC ACC TCC CTA Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu 95 100 105	499
45	CTA GGA CTC AGC CAA CTC CTC CAG CCA GAG GAT CAC CCC CGG GAG ACC Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr 110 115 120	547
50	CAA CAG ATG CCC AGC CTG AGT TCT AGT CAG CAG TGG CAG CGC CCC CTT Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu 125 130 135 140	595
55	CTC CGT TCC AAG ATC CTT CGA AGC CTC CAG GCC TTT TTG GCC ATA GCT Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala 145 150 155	643
60	GCC CGG GTC TTT GCC CAC GGA GCA GCA ACT CTG ACT GAG CCC TTA GTG Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val 160 165 170	691
65	CCA ACA GCT TAAGGATGCC CAGGTTCCCA TGGCTACCAT GATAAGACTA Pro Thr Ala 175	740

ES 2 300 276 T3

```

ATCTATCAGC CCAGACATCT ACCAGTTAAT TAACCCATTA GGACTTGTGC TGTTCCTGTT      800
TCGTTTGT TT TCGTGAAGG GCAAGGACAC CATTATTAAG GAGAAAAGAA ACAAACCCCA      860
5 GAGCAGGCAG CTGGCTAGAG AAAGGAGCTG GAGAAGAAGA ATAAAGTCTC GAGCCCTTGG      920
CCTTGGAAGC GGGCAAGCAG CTGCGTGGCC TGAGGGGAAG GGGGCGGTGG CATCGAGAAA      980
10 CTGTGAGAAA ACCCAGAGCA TCAGAAAAAG TGAGCCAGG CTTTGGCCAT TATCTGTAAG     1040
AAAAACAAGA AAAGGGGAAC ATTATACTTT CCTGGGTGGC TCAGGGAAAT GTGCAGATGC     1100
ACAGTACTCC AGACAGCAGC TCTGTACCTG CCTGCTCTGT CCCTCAGTTC TAACAGAATC     1160
15 TAGTCACTAA GAACTAACAG GACTACCAAT ACGAACTGAC AAA                          1203

MLDCRAVIMLWLLPWVTQGLAVPRSSSPDWAQCQQLSRNLCMLAWNAHAPAGHMNLLREEED
20 EETKNNVPRIQCEDGCDPQGLKDNSQFCLQRIROGLAFYKHLLDSDIFKGE PALLPDSPMEQ
LHTSLLGLSOLLQPEDHPRETQQMPSLSSSQWQRPLLRSKILRSLOAFLAIAARVFAHGAA
TLTEPLVPTA

```

25 La homología estructural de IL-B30 con las proteínas citoquinas relacionadas sugiere una función relacionada para esta molécula. Sin embargo, el reconocimiento de la asociación del polipéptido p40 de IL-12 con el polipéptido IL-B30 permite una valoración biológica de los dímeros de p40/IL-B30 activos. Los complejos p40 de IL-12/IL-B30 pueden estar constituidos ya sea por polipéptidos distintos que representan cada uno de los polipéptidos individuales o las construcciones de fusión de p40 de IL-12 con IL-B30. Las observaciones indican que el dímero es capaz de inducir la producción de interferón- γ (IFN γ) mediante varios tipos de células, por ejemplo, PBMC, que sugiere funciones biológicas para las cuales se usará el dímero. Además, los experimentos indican que la subunidad $\beta 1$ del receptor de IL-12 es un componente del receptor para el dímero p40/IL-B30.

35 El IFN γ activa los macrófagos que estimulan las actividades tumorocidas y microbicidas. También modula la expresión de la molécula MHC de clase I y II incluyendo la regulación ascendente de las moléculas de clase II sobre los monocitos/macrófagos y las células dendríticas, e induce la expresión en las células epiteliales, endoteliales y otras células, convirtiéndolas en capaces de presentación de antígenos. La citoquina es una citoquina de tipo Th1 que promueve el desarrollo de células CDA+ T de tipo Th1, pero inhibe el de las células T de tipo Th2. Es un inhibidor poderoso y relativamente específico de la síntesis de IgE e Ig4 inducida por IL-4 mediante los linfocitos B, aunque en concentraciones más elevadas no inhibe específicamente la producción de todos los isotipos de anticuerpos. El IFN γ aumenta las respuestas inmunes citotóxicas contra los organismos y tumores intracelulares mediados por las células NK y CTL. Análogamente a la IL-12, el IFN γ tiene propensión a promover la respuesta citotóxica mediada por células, mientras que inhibe la inflamación alérgica y la síntesis de IgE. Véase, por ejemplo, Karupiah (ed. 1997) *Gamma Interferon in Antiviral Defense* Chapman & Hall; Jaffe (ed. 1992) *Anti-Infective Applications of Interferon-Gamma*, Marcel Dekker (ISBN: 0824786882); Sutterwala *et al.*, (1999) *J. Leukoc. Biol.* 65:543-551; Billiau *et al.*, (1998) *Ann. NY Acad. Sci.* 856:22-32; y Gessani *et al.*, (1998) *Cytokine Growth Factor Rev.* 9:117-123.

50 Los agonistas o antagonistas de IL-B30 también pueden actuar como antagonistas funcionales o de receptores, por ejemplo, los que bloquean la unión de IL-4 o IL-12 a sus respectivos receptores, o mediar las acciones opuestas. Así, IL-B30, o sus antagonistas, pueden ser útiles para el tratamiento de estados médicos anormales, incluyendo trastornos inmunes, por ejemplo deficiencias inmunes de las células T, inflamación crónica, o rechazo de tejidos, o en estados cardiovasculares o neurofisiológicos. Los agonistas se usarían probablemente en un contexto terapéutico para potenciar la inmunidad mediada por células, por ejemplo en situaciones anti-tumorales, coadyuvantes y anti-virales o para antagonizar las respuestas alérgicas. Los antagonistas se usarían probablemente en el contexto de bloquear dicha inmunidad potenciada, por ejemplo, en contribuciones celulares a las enfermedades autoinmunes o para estados inflamatorios crónicos.

60 Los antígenos naturales son capaces de mediar en varias respuestas bioquímicas que conducen a respuestas biológicas o fisiológicas en células dianas. Las realizaciones preferidas serían de humanos, pero también existen en la naturaleza otras especies correspondientes de primates u otras especies. Las secuencias adicionales para las proteínas en otras especies de mamíferos, por ejemplo, primates, caninos, felinos, y roedores también deben estar disponibles.

65 En particular, la asociación de la subunidad p40 de IL-12 con IL-B30 ha sido confirmada. Las moléculas p40 de IL-12 e IL-B30 deben haber evolucionado conjuntamente. Si las dos se asocian funcionalmente, podrían actuar conjuntamente de la misma manera que IL-12. Véase, por ejemplo, Trinchieri (1998) *Adv. Immunol.* 70:83-243; Gately *et al.*, (1998) *Ann. Rev. Immunol.* 16:495:521; y Trinchieri (1998) *Int. Rev. Immunol.* 16:365-396.

En forma de complejo, sin embargo, se esperaría que el complejo interactuara con dos receptores altos de señales en la familia de los receptores de citoquinas. Esto ha sido confirmado en el caso de la subunidad β -1 del receptor IL-12. Pueden analizarse otros receptores relacionados para la unión con el complejo soluble. Se ha construido una serie de células, por ejemplo BAF/3, que expresan de forma estable varios de estos receptores altos capaces de transducción de señales.

Los sobrenadantes de los transfectantes de tanto p40 de IL-12 como IL-B30 (o una construcción de combinación única) en la misma célula, se usaron para ensayar estas varias células para verificar si esta es una respuesta proliferativa o de otro tipo de señalización. En realidad la mayoría de los efectos fisiológicos de la citoquina pueden deberse al complejo de las proteínas. De este modo, muchas de las descripciones siguientes de biología resultantes de la citoquina pueden estar realmente fisiológicamente afectadas por el complejo que comprende la combinación de las subunidades

Las siguientes descripciones pueden aplicarse también al complejo p40 de IL-12/IL-B30. Se construyó una fusión de la subunidad p40 de IL-12 con IL-B30, tal como por ejemplo, la hiper IL-6. Véase, por ejemplo, Fischer *et al* (1997) *Nature Biotechnol.* 15:42-145; Rakemann *et al.*, (1999) *J. Biol. Chem.* 274:1257-1266; y Peters *et al.*, (1998) *J. Immunol.* 161:3575-3581. Además, el apareamiento del complejo de citoquina con un receptor que comprende la subunidad β 1 del receptor IL-12 permite la identificación de los anticuerpos con esta subunidad como antagonistas del receptor del complejo de citoquinas.

II. Complejo p40/IL-B30 purificado

La secuencia de aminoácidos de IL-B30 humana se muestra como una realización dentro de la SEQ ID NO: 2. Otros ácidos nucleicos naturales que codifican la proteína pueden aislarse mediante procedimientos estándares usando la secuencia proporcionada, por ejemplo, por técnicas de PCR o por hibridación. Estas secuencias de aminoácidos, provistas con grupos amino a carboxi, son importantes para proporcionar la información de secuencia para la subunidad de citoquina que permite distinguir el antígeno de proteína de otras proteínas y ejemplificar numerosas variantes. Además, las secuencias peptídicas permiten la preparación de péptidos para generar anticuerpos para que reconozcan los segmentos y secuencias nucleotídicas que permitan la preparación de sondas oligonucleotídicas, siendo ambas estrategias para la detección o aislamiento, por ejemplo, clonación de genes que codifican dichas secuencias.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "IL-B30 humana soluble" abarca, cuando se usa en un contexto de proteínas, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un polipéptido soluble de la SEQ ID NO: 2. Sus fragmentos significativos frecuentemente retendrán funciones similares, por ejemplo antigenicidad. En este texto se describen realizaciones que comprenden una pluralidad de segmentos distintos, por ejemplo, segmentos no solapantes de la longitud especificada. Típicamente, la pluralidad será de por lo menos dos, más usualmente de por lo menos tres, y preferiblemente 5, 7, o incluso más. Aunque puede indicarse la longitud mínima, pueden ser apropiadas longitudes más largas de varios tamaños, por ejemplo, una de longitud 7, y dos de longitud 12. Características similares pueden aplicarse al polipéptido p40 de IL-12 y a los polinucleótidos de cualquiera o ambos.

Los componentes de unión, por ejemplo, los anticuerpos, se unen típicamente a un complejo p40 de IL-12/IL-B30 con alta afinidad, por ejemplo, de por lo menos aproximadamente 100 nM, usualmente superiores a aproximadamente 30 nM, preferiblemente superiores a aproximadamente 10 nM, y aún más preferiblemente superiores a aproximadamente 3 nM. Se encontrarán complejos de proteínas correspondientes en especies de mamíferos distintas de la humana, por ejemplo, en otros primates, ungulados o roedores. Las especies que no son mamíferos también deben poseer genes y proteínas estructural o funcionalmente relacionados, por ejemplo, aves o anfibios.

También se describen en la presente memoria fragmentos o segmentos de polipéptidos significativos que abarcan un tramo de residuos de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 8 aminoácidos, generalmente de por lo menos aproximadamente 12 aminoácidos, típicamente de por lo menos aproximadamente 16 aminoácidos, preferiblemente de por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos, y, en realizaciones particularmente preferidas de la invención de por lo menos aproximadamente 30 o más aminoácidos, por ejemplo, 35, 40, 45, 50 etc. Dichos fragmentos pueden tener extremos que comienzan y/o terminan en virtualmente todas las posiciones, por ejemplo, que comienzan en los residuos 1, 2, 3, etc., y finalizan en por ejemplo 175, 174, 173, etc., en todas las combinaciones prácticas para IL-B30 o para la subunidad p40 de IL-12. Los péptidos particularmente interesantes tienen extremos que corresponden a los límites de dominios estructurales, por ejemplo hélices A, C, C y/o D de IL-B30 o de los dominios Ig de p40 de IL-12 Véase más adelante.

La expresión "composición de unión" se refiere a moléculas que se unen con especificidad al complejo p40 de IL-12/IL-B30, por ejemplo, en una interacción de anticuerpo-antígeno, pero no a los componentes individuales solos. La especificidad puede ser más o menos inclusiva, por ejemplo, específica para una realización particular o para grupos de realizaciones relacionadas, por ejemplo primates, roedores, etc. El empobrecimiento o las absorciones pueden proporcionar selectividades deseadas, por ejemplo, para empobrecer anticuerpos que se unen a cualquier componente polipeptídico sólo. Asimismo, se describen compuestos, por ejemplo, proteínas que se asocian específicamente con el complejo p40 de IL-12/IL-B30, incluyendo una interacción de proteína-proteína natural relevante fisiológicamente, ya sea en forma covalente o no covalente. La molécula puede ser un polímero o un reactivo químico. Un análogo funcional puede ser una proteína con modificaciones estructurales, o puede ser una molécula que tiene una configuración molecular que interactúa con los determinantes de unión apropiados. Los compuestos pueden servir como agonistas o

ES 2 300 276 T3

antagonistas de una interacción de unión a receptor, véase, por ejemplo, Goodman *et al.*, (eds.) *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics* (edición actual) Pergamon Press.

5 Sustancialmente puro, por ejemplo, en un contexto de proteínas, significa típicamente que la proteína está libre de cualquier otra proteína contaminante, de ácidos nucleicos, o de otros productos biológicos derivados del organismo fuente original. La pureza puede valorarse por métodos convencionales, típicamente por el porcentaje en peso, y comúnmente será por lo menos aproximadamente 40% pura, generalmente por lo menos aproximadamente 50% pura, frecuentemente por lo menos aproximadamente 60% pura, típicamente por lo menos aproximadamente 80% pura, preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% pura, y, en la mayoría de las realizaciones preferidas, por lo
10 menos aproximadamente 95% pura. Frecuentemente pueden añadirse vehículos o excipientes. Una composición que comprende una p40 de IL-12 e IL-B30 sustancialmente pura no tendrá grandes cantidades de polipéptidos extraños que no estarán naturalmente asociados con el complejo de los dos polipéptidos.

15 La solubilidad de un polipéptido o un fragmento depende del ambiente y del polipéptido. Muchos parámetros afectan a la solubilidad del polipéptido, incluyendo la temperatura, el ambiente electrolítico, el tamaño y las características moleculares del polipéptido y la naturaleza del disolvente. Típicamente, la temperatura a la cual se usa el polipéptido está en un intervalo de aproximadamente 4°C hasta aproximadamente 65°C. Usualmente la temperatura de uso es superior a aproximadamente 18°C. Con propósitos de diagnóstico, la temperatura será usualmente la temperatura ambiente o más caliente, pero menor que la temperatura de desnaturalización de los componentes en la valoración.
20 Con propósitos terapéuticos, la temperatura usualmente será la temperatura del cuerpo, típicamente aproximadamente 37°C para seres humanos y ratones, aunque bajo ciertas condiciones la temperatura puede elevarse o disminuirse *in situ* o *in vitro*.

25 El tamaño y la estructura de los polipéptidos generalmente deben corresponder a un estado sustancialmente estable, y usualmente no deben estar en estado desnaturalizado. El polipéptido puede estar asociado con otros polipéptidos en una estructura cuaternaria, para conferirle por ejemplo solubilidad, o asociado con lípidos o detergentes. La invención proporciona un complejo constituido por la asociación de los polipéptidos p40 de IL-12 e IL-B30, preferiblemente una composición de fusión.

30 El disolvente y los electrolitos serán usualmente un tampón biológicamente compatible de un tipo usado para la conservación de las actividades biológicas, y usualmente se aproximará a un disolvente fisiológico acuoso. Usualmente el disolvente tendrá un pH neutro, típicamente entre aproximadamente 5 y 10, y preferiblemente de aproximadamente 7,5. En algunas ocasiones, se añadirán uno o más detergentes, típicamente uno suave no desnaturalizante, por ejemplo CHS (hemisuccinato de colesteroil) o CHAPS (3-[3-colamidopropil]dimetilamonio]-1-propanosulfonato) a una
35 concentración suficientemente baja para evitar un deterioro significativo de las propiedades estructurales o fisiológicas de la proteína. En otros casos, puede usarse un detergente fuerte para efectuar una significativa desnaturalización.

Un polipéptido IL-B30 que se une específicamente, o que es específicamente inmunorreactivo, con un anticuerpo, por ejemplo, tal como un anticuerpo policlonal, generado contra un inmunógeno definido, por ejemplo, tal como un
40 inmunógeno que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o sus fragmentos o un polipéptido generado a partir de un ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 se determina típicamente en un inmunoensayo.

También se describen en la presente memoria secuencias de ácido nucleico que incluyen variantes funcionales que codifican polipéptidos que se unen selectivamente a anticuerpos policlonales generados contra el polipéptido prototípico IL-B30, tal como se define estructural y funcionalmente en esta descripción. El inmunoensayo usa típicamente
45 un antisuero policlonal que se produjo, por ejemplo, para un complejo que comprende una proteína de la SEQ ID NO: 2. Este antisuero se selecciona, o empobrece, para tener baja reactividad cruzada contra otros miembros de familias apropiadas estrechamente relacionadas, preferiblemente de la misma especie, y se elimina cualquier otra reactividad cruzada por inmunoabsorción o por empobrecimiento antes de usarlo en el inmunoensayo. En particular, los anticuerpos que se unen a los polipéptidos p40 de IL-12 o a IL-B30 sola son dianas para el inmunoempobrecimiento. Pueden aislarse y caracterizarse preparaciones apropiadas de suero selectivo.
50

Para producir antisueros para uso en un inmunoensayo, la composición de la invención se aísla, tal como se describe en esta memoria. Por ejemplo, la proteína recombinante puede producirse en una línea de células de mamífero.
55 Un hospedante apropiado, por ejemplo, una raza endógama de ratones, tales como Balb/c, se inmuniza con el complejo que comprende una proteína de la SEQ ID NO: 2 usando un coadyuvante estándar, tal como un coadyuvante de Freund, y un protocolo estándar de inmunización de ratón (véase el trabajo de Harlow y Lane). Alternativamente, puede usarse como inmunógeno una construcción de péptido sintético sustancialmente de longitud completa derivado de las secuencias descritas en este texto. Los sueros policlonales se recogen y se titulan contra la proteína inmunógena en un inmunoensayo, por ejemplo en un inmunoensayo de fase sólida con el inmunógeno inmovilizado en un soporte sólido junto con empobrecimientos o selecciones apropiados. Los antisueros policlonales con un título de 10^4 o superior se seleccionan y se ensayan en cuanto a su reactividad cruzada contra otros miembros de familias estrechamente relacionadas, por ejemplo, LIF, CT-1, CNTF, u otros miembros de la familia IL-6, usando un inmunoensayo de unión competitivo, tal como el descrito en el trabajo de Harlow y Lane, *supra*, en las páginas 570-573. Preferiblemente,
65 se usan por lo menos dos miembros individuales de la familia IL-6/IL-12 en esta determinación conjuntamente con la diana. Estos miembros de la familia de las citoquinas de cadena larga pueden producirse como proteínas recombinantes y pueden aislarse usando biología molecular convencional y técnicas de química de proteínas, tal como se describen en la presente memoria. Por lo tanto, pueden identificarse o producirse preparaciones de anticuerpos que

tengan la selectividad o especificidad deseadas para miembros de los subgrupos de la familia de p40 de IL-12/IL-B30. Alternativamente, pueden prepararse anticuerpos que se unen a las formas de polipéptidos de fusión del complejo que comprende p40 de IL-12 e IL-B30.

5 Pueden usarse inmunoensayos del formato de unión competitiva para las determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, la proteína de fusión puede inmovilizarse en un soporte sólido. Las proteínas añadidas al ensayo compiten con la unión de los antiseros selectivos para el antígeno inmovilizado. La capacidad de las proteínas anteriores para competir con la unión de los antiseros selectivos para la proteína inmovilizada se compara con la proteína de fusión. La reactividad cruzada porcentual para las precedentes proteínas se calcula usando cálculos convencionales.
10 Se seleccionan y reúnen aquellos antiseros con una reactividad cruzada menor del 10% con cada una de las proteínas enumeradas anteriormente. Los anticuerpos selectivos de reacción cruzada se separan luego de los antiseros reunidos mediante inmuoabsorción con las proteínas previamente enumeradas.

15 Los antiseros inmuoabsorbidos y reunidos se usan luego en un inmunoensayo de unión competitiva, tal como se describió antes, para comparar una segunda proteína con la proteína de fusión inmunógena. Para efectuar esta comparación, se ensayan cada una de las dos proteínas en una amplia gama de concentraciones, y se determinó la cantidad de cada proteína necesaria para inhibir el 50% de la unión de los antiseros selectivos a la proteína de fusión inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína requerida es inferior al doble de la cantidad de la proteína de fusión necesaria, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a un anticuerpo selectivo generado para el
20 inmunógeno.

III. Variantes físicas

25 También se describen en esta memoria complejos que comprende proteínas o péptidos que tienen una identidad sustancial de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos del antígeno p40 de IL-12/IL-B30. Las variantes incluyen especies y variantes polimórficas o alélicas.

30 La homología de la secuencia de aminoácidos, o la identidad de secuencias, se determina optimizando las igualdades de residuos, si es necesario, mediante la introducción de huecos según se requiera. Véase también, Needleham *et al.*, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; Sankoff *et al.*, (1983) *Chapter One in Time Warps, String Edits. And Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison*, Addison-Wesley, Reading, MA; y los paquetes de programas de ordenador de IntelliGenetics, Mountain View, CA; y el *University of Wisconsin Genetics Computer Group*, Madison, WI. La identidad de secuencias cambia cuando las sustituciones conservadoras se consideran como identidades. Las sustituciones conservadoras incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina;
35 valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. La conservación puede aplicarse a características biológicas, características funcionales o características estructurales. Las secuencias de aminoácidos homólogas están típicamente destinadas a incluir variaciones naturales, polimórficas o alélicas e interespecies de una secuencia de proteína. Los péptidos o proteínas homólogos típicos tendrán una identidad de 25-100% (si pueden introducirse huecos), hasta una identidad de 50-100% (si se incluyen sustituciones conservadoras), con la secuencia de aminoácido de IL-B30. Las mediciones de identidad serán de por lo menos aproximadamente 35%, generalmente de por lo menos aproximadamente 40%, frecuentemente de por lo menos aproximadamente 50%, típicamente de por lo menos aproximadamente 60%, usualmente de por lo menos aproximadamente 70%, preferiblemente de por lo menos aproximadamente 80% y aún más preferiblemente de por lo
40 menos aproximadamente 90%.

45 El DNA de p40 de IL-12 o de IL-B30 aislado puede ser fácilmente modificado mediante sustituciones de nucleótidos, deleciones de nucleótidos, inserciones de nucleótidos e inversiones de tramos cortos de nucleótidos. Estas modificaciones dan como resultado nuevas secuencias de DNA, que codifican estos antígenos, sus derivados o proteínas que tienen actividad funcional u otra actividad similar fisiológica, inmunógena o antigénica. Estas secuencias modificadas pueden usarse para producir antígenos mutantes o para aumentar la expresión. El aumento de la expresión puede implicar amplificación génica, mayor transcripción, mayor traducción y otros mecanismos. "Mutante IL-B30" abarca un polipéptido que por otra parte entra dentro de la definición de entidad de secuencias de IL-B30 tal como se estableció precedentemente, pero que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de IL-B30 tal como se encuentra normalmente en la naturaleza, ya sea por modo de deleción, sustitución o inserción. Esto incluye
50 generalmente proteínas que tienen identidad significativa con una proteína que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2, y que comparte varias actividades biológicas, por ejemplo antigénicas o inmunógenas, con aquellas secuencias, y en las realizaciones preferidas contiene la mayor parte de las secuencias naturales de longitud total descritas. Se prefieren típicamente secuencias de longitud total, aunque también son útiles versiones truncadas, y asimismo genes o proteínas que se encuentran en fuentes naturales que típicamente son las más deseables. Pueden aplicarse conceptos similares a diferentes proteínas IL-B30, particularmente las que se encuentran en varios animales de sangre caliente, por ejemplo mamíferos y aves. Estas descripciones abarcan generalmente varias proteínas IL-B30, y no se limitan a las realizaciones particulares para primates específicamente analizadas.

65 La mutagénesis de p40 de IL-12 o IL-B30 también puede llevarse a cabo haciendo inserciones o deleciones de aminoácidos. Pueden generarse sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación para llegar hasta una construcción final. Las inserciones incluyen fusiones por los extremos amino o carboxi. La mutagénesis al azar puede llevarse a cabo en un codón diana y los mutantes expresados pueden ser escrutados para la actividad deseada. Los métodos para preparar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en DNA que tienen una secuencia conocida

son bien conocidos en la técnica, por ejemplo mediante mutagénesis del cebador M13 o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, (1989); Ausubel *et al.*, (1987 and Supplements); y Kunkel *et al.*, (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382. Las realizaciones preferidas incluyen por ejemplo 1 vez, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 7 veces, etc., preferiblemente sustituciones conservadoras a los niveles de nucleótido o aminoácido.

5 Preferiblemente, las sustituciones estarán alejadas de las cisteínas conservadas, y frecuentemente estarán en las regiones alejadas de los dominios estructurales helicoidales. Dichas variantes pueden ser útiles para producir anticuerpos específicos, y frecuentemente compartirán muchas o la totalidad de las propiedades biológicas. El reconocimiento de la estructura de citoquinas proporciona importante información para discernir la estructura y las posiciones de los

10 residuos que pueden modificarse para efectuar los cambios deseados en la interacción con el receptor. Asimismo, la interacción de p40 de IL-12 con la proteína IL-B30 requiere características estructurales complementarias en la superficie interactuante. Los análisis estructurales permitirán efectuar una predicción adicional de los residuos superficiales críticos tanto en la formación de complejos como en la interacción del complejo con el receptor.

También se describen proteínas recombinantes, por ejemplo, proteínas de fusión heterólogas usando segmentos de estas proteínas. Una proteína de fusión heteróloga es una fusión de proteínas o segmentos que naturalmente no están normalmente fusionadas de la misma manera. Un concepto similar se aplica a las secuencias heterólogas de ácidos nucleicos.

Además, pueden prepararse nuevas construcciones combinando dominios funcionales similares de otras proteínas. Por ejemplo, pueden intercambiarse uniones a la diana u otros segmentos entre diferentes polipéptidos o fragmentos de fusión. Véase, por ejemplo, Cunningham *et al.*, (1989) *Science* 243:1330-1336, y O'Dowd *et al.*, (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992.

El método del fosforamidito descrito por Beaucage y Carruthers (1981) *Tetra. Letts.* 22:1859-1862, producirá fragmentos de DNA sintéticos apropiados. Frecuentemente obtendrá un fragmento bicatenario ya sea sintetizando la cadena complementaria y reasociando la cadena conjuntamente bajo condiciones apropiadas o añadiendo la cadena complementaria usando DNA-polimerasa con una secuencia cebadora apropiada, por ejemplo, mediante técnicas de PCR.

Puede aplicarse un análisis estructural a este gen, en comparación con la familia IL-6 de citoquinas. La familia incluye, por ejemplo IL-6, IL-11, IL-12, G-CSF, LIF, OSM, CNTF y Ob. La alineación de las secuencias IL-B30 humanas y de ratón con otros miembros de la familia IL-6 debe permitir la definición de las características estructurales. En particular, pueden determinarse los residuos de lámina β y de hélice α usando por ejemplo un programa RASMOL, véase Bazan *et al.*, (1996) *Nature* 379:591; Lodi *et al.*, (1994) *Science* 263:1762-1766; Sayle y Milner-White (1995) *TIBS* 20:374-376; y Gronenberg *et al.*, (1991) *Protein Engineering* 4:263-269 Véase también, Wilkins *et al.*, (eds. 1997) *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Springer-Verlag, NY. Los residuos preferidos para las sustituciones incluyen los residuos expuestos en la superficie que podrían predecir la interacción con el receptor. Otros residuos que deben conservar la función serán sustituciones conservadoras, particularmente en una posición alejada de los residuos expuestos en la superficie.

40

IV. Variantes funcionales

El bloqueo de la respuesta fisiológica a los complejos p40 de IL-12/IL-B30 puede dar como resultado la inhibición competitiva de la unión del ligando a su receptor. La identificación de una subunidad del receptor permite la caracterización adicional tal como se ha descrito, y el uso de anticuerpos para esta subunidad para bloquear la unión y/o la señalización con el complejo.

En los ensayos *in vitro* descritos en la presente invención frecuentemente se usan complejos aislados, proteínas, fragmentos solubles que comprenden segmentos de unión al receptor de estas proteínas o fragmentos unidos a susstratos en fase sólida. Estos ensayos permitirán también la determinación diagnóstica de los efectos de mutaciones y modificaciones del segmento de unión, o bien de mutaciones y modificaciones de citoquinas, por ejemplo, análogos de complejos p40 de IL-12/IL-B30.

Esta invención contempla también el uso de valoraciones competitivas de escrutinio de fármacos, por ejemplo, en donde los anticuerpos neutralizadores para el complejo de citoquina o los fragmentos de unión al receptor compiten con un compuesto de ensayo.

“Derivados” de antígenos p40 de IL-12/IL-B30 incluyen mutantes de secuencias de aminoácidos a partir de formas naturales, variantes de glucosilación y conjugados covalentes o agregados con otros restos químicos. Pueden prepararse derivados covalentes mediante enlaces de funcionalidades con grupos que se encuentran en las cadenas laterales de los aminoácidos de complejos p40 de IL-12/IL-B30 o en los extremos N- o C-, por ejemplo, por medios estándares. Véase, por ejemplo, Lundblad y Noyes (1988) *Chemical Reagents for Protein Modification*, vols. 1-2, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, Hugli (ed. 1989), *Techniques in Protein Chemistry*, Academic Press, San Diego, CA; y Wong (1991), *Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking*, CRC Press, Boca Raton, FL.

65

En particular, se incluyen alteraciones de glucosilación, preparadas por ejemplo mediante modificación de los patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento, o en etapas de procesamiento posterior-

res. Véase, por ejemplo, Elbein (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56:497-534. Asimismo, están también abarcadas versiones de los péptidos con la misma secuencia primaria de aminoácidos que tienen otras modificaciones menores, incluyendo residuos de aminoácido fosforilados, por ejemplo fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

5 También se proporcionan polipéptidos de fusión entre p40 de IL-12/ILB-30. Muchos receptores de citoquinas u otras proteínas de superficie son multímeros, por ejemplo, son entidades homodímeras, y una construcción de repetición puede tener varias ventajas incluyendo menor susceptibilidad a la escisión proteolítica. Ejemplos típicos están constituidos por fusiones de un polipéptido informador, por ejemplo, luciferasa, con un segmento o dominio de una proteína, por ejemplo, un segmento de unión a un receptor, de modo que la presencia o ubicación del ligando fusionado
10 pueda ser fácilmente determinada. Véase, por ejemplo, Dull *et al.*, Patente de EE.UU. N° 4.859.609. Otras parejas de fusión de genes incluyen β -galactosidasa bacteriana, trpE, Proteína A, β -lactamasa, alfa amilasa, alcohol-deshidrogenasa, factor de apareamiento alfa de la levadura, y detección o purificación de colas (*tails*) tales como la secuencia FLAG de la secuencia His6. Véase, por ejemplo, Godowski *et al.*, (1988) *Science* 241:812-816. También se proporcionan construcciones de fusión con otras entidades terapéuticas, por ejemplo, las que pueden ser co-administradas,
15 pero proteolíticamente escindidas.

Los péptidos de fusión se preparan típicamente por métodos de ácidos nucleicos recombinantes o bien por métodos de polipéptidos sintéticos. Las técnicas para la manipulación y expresión de ácido nucleico han sido descritas de forma general, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.) vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory y Ausubel *et al.*, (eds. 1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene y Wiley, NY. Las técnicas para la síntesis de polipéptidos han sido descritas por ejemplo en Merrifield (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2156; Merrifield (1986) *Science* 232: 341-347; Atherton *et al.*, (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford; y Grant (1992) *Synthetic Peptides: A User's Guide*. W. H. Freeman, NY. Los métodos de re-plegamiento pueden ser aplicables a las proteínas sintéticas.

25 Esta invención contempla también el uso de derivados de proteínas p40 de IL-12 o IL-B30 distintas de las variaciones en la secuencia de aminoácidos o glucosilación. Dichos derivados pueden implicar asociación covalente o agregativa con porciones químicas o vehículos de proteínas. Los derivados covalentes o agregativos serán útiles como inmunógenos, como reactivos en inmunoensayos o en métodos de purificación, tales como para purificación por afinidad de parejas de unión, por ejemplo otros antígenos. Una p40 de IL-12 o IL-B30 puede inmovilizarse mediante unión covalente en un soporte sólido, tal como SEPHAROSE activada por bromuro de cianógeno, por métodos que son bien conocidos en la técnica, o puede ser adsorbida sobre superficies de poliolefina, con o sin reticulación con glutaraldehído, para ser usado en el ensayo o purificación de anticuerpos anti-p40 de IL-12 o IL-B30 o como una composición de unión alternativa. Las p40 de IL-12, IL-B30 o proteínas de fusión también pueden ser marcadas con un grupo detectable, para uso, por ejemplo en ensayos de diagnóstico. La purificación del complejo p40 de IL-12/IL-B30 puede efectuarse por un anticuerpo inmovilizado a un polipéptido o bien a un componente de secuencia o a una pareja de unión complementaria, por ejemplo, la porción de unión de un receptor.

Un polipéptido p40 de IL-12/IL-B30 solubilizado o uno de sus fragmentos de acuerdo con esta invención pueden usarse como inmunógeno para la producción de antisuero o anticuerpos específicos para la unión. Puede usarse antígeno purificado para escrutar anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno, que comprenden fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos naturales, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab)₂, etc. Los antígenos p40 de IL-12/IL-B30 purificados pueden usarse también como reactivo para detectar anticuerpos generados en respuesta a la presencia de niveles elevados del complejo de citoquina, que puede ser un diagnóstico de un estado anormal o un estado fisiológico específico o enfermedad. También se describen anticuerpos creados contra secuencias de aminoácidos codificados por la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1, o fragmentos de proteínas que la contienen. En particular, se describen anticuerpos que tienen afinidad de unión con, o que son producidos contra, dominios específicos, por ejemplo, hélices A, B, C o D del IL-B30 o los dominios Ig de p40 de IL-12.

50 También se describe el aislamiento de variantes de especies adicionales estrechamente relacionadas. El análisis de transferencias Southern y Northern establecerá que existen entidades genéticas similares en otros mamíferos. Es probable que la IL-B30 esté ampliamente extendida en variantes de especies, por ejemplo roedores, lagomorfos, carnívoros, artiodáctilos, perisodáctilos y primates.

55 La invención se refiere también a medios para aislar un grupo de antígenos relacionados que exhiben tanto diversidad como similitud en estructura, expresión y función. La elucidación de muchos de los efectos fisiológicos de las moléculas se acelerará enormemente mediante el aislamiento y caracterización de especies distintas adicionales o sus variantes polimórficas. En particular, la presente invención proporciona sondas útiles para identificar entidades genéticas homólogas adicionales en diferentes especies.

60 Los genes aislados permitirán la transformación de células que carecen de la expresión de una IL-B30, por ejemplo, cualesquiera tipos de especie o células que carecen de las proteínas correspondientes y que exhiben actividad de fondo negativa. Esto debe permitir el análisis de la función de IL-B30 en comparación con células de control no transformadas.

65 La disección de elementos estructurales críticos que efectúan las diversas funciones fisiológicas mediadas a través de estos antígenos es posible usando técnicas convencionales de biología molecular moderna, particularmente en comparar miembros de la clase relacionada. Véase, por ejemplo, la técnica de mutagénesis por escaneo de homólogos

ES 2 300 276 T3

descrita en Cunningham *et al.*, (1989) *Science* 243:1339-1336, y los métodos usado en O'Dowd *et al.*, (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992; y Lechleiter *et al.*, (1990) *EMBO J.* 9:4381-4390.

5 Las funciones intracelulares implicarían probablemente señalización del receptor. Sin embargo, puede ocurrir internalización de la proteína bajo ciertas circunstancias y puede ocurrir interacción entre componentes intracelulares y citoquinas. Los segmentos específicos de interacción de IL-B30 con componentes interactuantes pueden identificarse por mutagénesis o por medios bioquímicos directos, por ejemplo, reticulación o métodos de afinidad. El análisis estructural mediante métodos físicos o cristalográficos también será aplicable. Una investigación adicional del mecanismo de la transducción de señales incluirá el estudio de componentes asociados que pueden ser aislables por métodos de afinidad o por medios genéticos, por ejemplo, análisis de complementación de mutantes.

15 Se proseguirá un estudio adicional de la expresión y control de IL-B30. Los elementos controladores asociados con los antígenos deben exhibir patrones fisiológicos diferenciales, de desarrollo, específicos de tejido u otros patrones de expresión. Son muy interesantes las regiones genéticas hacia el extremo 5' o hacia el extremo 3', por ejemplo, los elementos de control.

20 Los estudios estructurales de los antígenos IL-B30 conducirán al diseño de nuevos antígenos, particularmente análogos que exhiban propiedades agonistas o antagonistas en la molécula. Esto puede combinarse con los métodos de escrutinio previamente descritos para aislar antígenos que exhiben los espectros de actividades deseadas.

V. Anticuerpos

25 Pueden producirse anticuerpos para varios epítomos de las proteínas p40/IL-B30, incluyendo especies, variantes polimórficas o alélicas y sus fragmentos, tanto en sus formas naturales como en sus formas recombinantes. Adicionalmente, pueden crearse anticuerpos para IL-B30 en sus formas activas o en sus formas inactivas, incluyendo versiones naturales o desnaturalizadas. También se contemplan anticuerpos anti-idiotípicos.

30 Los anticuerpos, incluyendo los fragmentos de unión y las versiones de una sola cadena, contra fragmentos predefinidos de los antígenos pueden producirse mediante inmunización de los animales con conjugados de los fragmentos con proteínas inmunógenas. Se preparan anticuerpos monoclonales a partir de células que secretan el anticuerpo deseado. Estos anticuerpos pueden ser escrutados en cuanto a su unión a IL-B30 normales o defectuosas, o pueden escrutarse para determinar la actividad agonística o antagonística, por ejemplo mediada a través de un receptor. Los anticuerpos pueden ser agonísticos o antagonísticos, por ejemplo, bloqueando estéricamente la unión a un receptor. Estos anticuerpos monoclonales usualmente se unirán con por lo menos un K_D de aproximadamente 1 mM, más usualmente de por lo menos aproximadamente 300 μ M, típicamente por lo menos aproximadamente 100 μ M, más típicamente de por lo menos aproximadamente 30 μ M, preferiblemente de por lo menos 10 μ M, y más preferiblemente de por lo menos aproximadamente 3 μ M o menos.

40 Los anticuerpos de esta invención pueden ser también útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o anticuerpos no neutralizadores, dichos anticuerpos pueden ser escrutados en cuanto a su capacidad de unirse a los antígenos sin inhibir la unión a un receptor. Como anticuerpos neutralizadores, pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva. Asimismo serán útiles para detectar o cuantificar la proteína IL-B30 o sus receptores. Véase, por ejemplo, Chan (ed. 1987) *Immunology: A Practical Guide*, Academic Press, Orlando, FL; Price y Newman (eds. 1991) *Principles and Practice of Immunoassay*, Stockton Press, N.Y.; y Ngo (ed. 1988) *Nonisotopic Immunoassay* Plenum Press, N.Y. Las absorciones cruzadas u otros ensayos identificarán anticuerpos que exhiben diversos espectros de especificidades, por ejemplo, especificidades únicas o de especies compartidas.

50 Además, los anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión al antígeno, de esta invención, pueden ser potentes antagonistas que se unen al antígeno y que inhiben la unión funcional, por ejemplo, a un receptor que puede desencadenar una respuesta biológica. También ser útiles como anticuerpos no neutralizadores, y pueden acoplarse a toxinas o radionúclidos de manera que cuando el anticuerpo se une a un antígeno, por ejemplo en su superficie, se mata una célula que lo expresa. Además, estos anticuerpos pueden conjugarse con fármacos o con otros agentes terapéuticos, ya sea en forma directa o en forma indirecta mediante un fragmento enlazador y pueden efectuar el envío de fármacos a sus dianas.

55 Los fragmentos de antígeno pueden unirse a otros materiales particularmente polipéptidos, en forma fusionada o en forma fusionada pueden unirse covalentemente polipéptidos para usarlos como inmunógenos. Un antígeno y sus fragmentos pueden estar fusionados o enlazados covalentemente a una variedad de inmunógenos, tales como hemocianina de la lapa bocallave, seroalbúmina bovina, toxoide del tétanos, etc. Véase *Microbiology*; Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969; Landsteiner (1962) *Specificity of Serological Reactions*, Dover Publications, New York; Williams *et al.*, (1967) *Methods in Immunology and Immunochemistry*, vol. 1, Academic Press, New York; y Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. CSH Press, NY, para las descripciones de los métodos para preparar antisueros policlonales.

65 En algunos casos, es conveniente preparar anticuerpos monoclonales a partir de varios hospedantes mamíferos, tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc. La descripción de las técnicas para preparar dichos anticuerpos monoclonales puede encontrarse en, por ejemplo, Sutes *et al.*, (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4ª ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y las referencias allí citadas; Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A*

Laboratory Manual, CSH Press; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.), Academic Press, New York; y particularmente en Kohler y Milstein (1975) en *Nature* 256:495-497, que describen un método para generar anticuerpos monoclonales.

5 Otras técnicas apropiadas implican la exposición *in vitro* de linfocitos a los polipéptidos antigénicos o alternativa-
mente a selección de genotecas de anticuerpos en fagos o vectores similares. Véase, Huse *et al.*, (1989) "Generation
of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", *Science* 246:1275-1281; y
10 Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden usarse con o
sin modificaciones, incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuer-
pos estarán marcados mediante unión, ya sea en forma covalente o no covalente, a una sustancia que proporciona
una señal detectable. Se conoce una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación de las cuales se in-
forma extensamente tanto en la literatura científica como de patentes. Entre los marcadores apropiados se incluyen
15 radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, porciones fluorescentes, porciones quimioluminiscentes,
partículas magnéticas y similares. Las patentes, donde se explica el uso de dichos marcadores incluyen las patentes de
EE.UU. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Asimismo, pueden producirse
inmunoglobulinas recombinantes, véase Cabilly, Patente de EE.UU. 4.816.567; Moore *et al.*, Patente de EE.UU. N°
4.642.334; y Queen *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033.

Los anticuerpos de esta invención pueden usarse también para cromatografía de afinidad en el aislamiento de pro-
20 teínas. Pueden prepararse columnas en las que los anticuerpos están enlazados a un soporte sólido. Véase, por ejemplo,
Wilchek *et al.*, (1984) *Meth. Enzymol.* 104:3-55. A la inversa, pueden usarse proteínas para el empobrecimiento o ab-
sorciones cruzadas para preparar composiciones de unión selectivamente específicas.

También se describen anticuerpos producidos contra cada IL-B30 que serán útiles para producir anticuerpos anti-
25 idiotípicos. Estos serán útiles para detectar o para diagnosticar diversos estados inmunológicos relacionados con la
expresión de los antígenos respectivos.

VI. Ácidos nucleicos

30 Las secuencias peptídicas y los reactivos relacionados son útiles para detectar, aislar o identificar un clon de DNA
que codifica p40 de IL-12 e IL-B30, por ejemplo, provenientes de una fuente natural. Típicamente, serán útiles para
aislar genes de un mamífero, y podrán aplicarse procedimientos similares a genes aislados de otras especies, por
ejemplo, animales de sangre caliente, tales como aves y mamíferos. La hibridación cruzada permitirá el aislamiento
35 de p40 de IL-12 o IL-B30 a partir de los mismos, por ejemplo variantes polimórficas o de otras especies. Estará
disponible una variedad de diferentes realizaciones para aislar con éxito un clon de ácido nucleico apropiado. Tales
genes permiten la construcción de construcciones de co-expresión o construcciones de fusión.

La proteína o polipéptidos purificados son útiles para generar anticuerpos por métodos estándares, tal como se
40 describió anteriormente. Pueden presentarse proteínas purificadas o péptidos sintéticos a un sistema inmune con el
fin de generar anticuerpos monoclonales o policlonales Véase, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in
Immunology*, Wiley/Greene; y Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press.

Por ejemplo, podría usarse una composición de unión específica para escrutar una genoteca de expresión pre-
45 parada a partir de una línea de células que expresan p40 de IL-12 y también IL-B30. El escrutinio de la expresión
intracelular puede llevarse a cabo mediante diversos procedimientos de tinción o inmunofluorescencia. Podrían usarse
composiciones de unión para purificar por afinidad o para seleccionar células que expresen una proteína de fusión de
superficie.

También pueden usarse segmentos peptídicos para seleccionar o para identificar oligonucleótidos apropiados para
50 escrutar una genoteca. Puede usarse el código genético para seleccionar oligonucleótidos apropiados útiles como son-
das para el escrutinio. Véase, por ejemplo, GenBank y SEQ ID NO: 1. En combinación con las técnicas de reacción
en cadena de la polimerasa (PCR), los oligonucleótidos sintéticos serán útiles para seleccionar los clones correctos de
una genoteca. También se usarán secuencias complementarias como sondas, cebadores o cadenas antisentido. Serían
55 particularmente útiles diversos fragmentos, por ejemplo, acoplados con vectores anclados o técnicas de PCR comple-
mentarias de poli-A o con DNA complementario de otros péptidos.

Esta invención contempla el uso de DNA aislado o de fragmentos que codifican un complejo biológicamente
activo del correspondiente polipéptido p40 de IL-12 e IL-B30, que carece particularmente de la porción que codifica
60 las porciones no traducidas de las secuencias descritas. Además, esta invención cubre DNA aislado o recombinante que
codifica una proteína de fusión o un polipéptido biológicamente activos y que es capaz de hibridarse bajo condiciones
apropiadas con las secuencias de DNA descritas en este texto. Dicha proteína o polipéptido biológicamente activo
puede consistir en un antígeno intacto, o un fragmento, y puede tener una secuencia de aminoácidos descrita en, por
ejemplo, la SEQ ID NO: 2, particularmente un polipéptido maduro secretado. También se describe el uso de DNA
65 recombinantes o aislados o sus fragmentos, que codifican proteínas que exhiben una alta identidad con un complejo
p40 de IL-12/IL-B30 secretado. El DNA aislado puede tener las respectivas secuencias reguladoras en los flancos 5' y
3', por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de adición de poli-A y otros. Alternativamente, la expresión puede
efectuarse uniendo operativamente un segmento codificador con un promotor heterólogo, por ejemplo insertando un

promotor en una posición situada hacia el extremo 5' desde un gen endógeno. Véase, por ejemplo, Treco *et al.*, WO 96/29411 o la solicitud de patente de EE.UU, nº de serie 08/406.030.

Un ácido nucleico "aislado" es un ácido nucleico, por ejemplo, un RNA, DNA, o un polímero mixto, que está sustancialmente separado de otros componentes extraños que acompañan naturalmente a una secuencia natural, por ejemplo, ribosomas, polimerasas, y/o secuencias genómicas flanqueantes de la especie originante. El término abarca una secuencia de ácido nucleico que ha sido separada de su ambiente natural, e incluye aislados de DNA clonados o recombinantes y análogos químicamente sintetizados o análogos biológicamente sintetizados mediante sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula, por ejemplo, distintas de un cromosoma aislado. En general, el ácido nucleico estará en un vector o fragmento de menos de aproximadamente 50 kb, usualmente de menos de aproximadamente 30 kb, típicamente de menos de aproximadamente 10 kb, y preferiblemente de menos de aproximadamente 6 kb.

Un ácido nucleico aislado generalmente será una composición homogénea de moléculas, pero en algunas realizaciones contendrá menor heterogeneidad. Esta heterogeneidad se encuentra típicamente en los extremos o porciones polímeras no críticos para una actividad o función biológica deseada.

Un ácido nucleico "recombinante" se define bien sea por su método de producción o bien por su estructura. Con referencia a su método de producción, por ejemplo, un producto preparado mediante un procedimiento, dicho procedimiento es el uso de técnicas de ácidos nucleicos recombinantes, que implican por ejemplo la intervención humana en la secuencia de nucleótidos, típicamente la selección o la producción. Alternativamente, puede ser unos ácidos nucleicos preparados generando una secuencia que comprende la fusión de dos fragmentos que no son naturalmente contiguos entre sí, pero que significa que excluirán productos naturales, por ejemplo, los mutantes que ocurren en forma natural. Así, por ejemplo, están abarcados los productos preparados por transformación de células con cualquier vector que no se presenta en forma natural, así como lo están también los ácidos nucleicos que comprenden secuencias derivadas mediante el uso de cualquier proceso de oligonucleótidos sintéticos. Esto se efectúa frecuentemente para reemplazar un codón con un codón redundante que codifica el mismo o un aminoácido conservador, mientras que se introduce al mismo tiempo o elimina un sitio de reconocimiento de secuencia.

Alternativamente, se efectúa para unir conjuntamente segmentos de ácidos nucleicos de las funciones deseadas para generar una única entidad genética que comprende una combinación deseada de funciones que no se encuentran en las formas naturales comúnmente disponibles. Frecuentemente la diana de dichas manipulaciones artificiales son los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, pero pueden incorporarse por diseño otras dianas específicas de sitio, por ejemplo promotores, sitios de replicación de DNA, secuencias reguladoras, secuencias de control, u otras características útiles. Se propone un concepto similar para un polipéptido recombinante, por ejemplo de fusión. Específicamente, incluidos están los ácidos nucleicos sintéticos que, por redundancia de código genético, codifican polipéptidos similares a los fragmentos de estos antígenos, y fusiones de secuencias de varias especies o variantes polimórficas diferentes.

Tal como se describe en la presente memoria un "fragmento" significativo en un contexto de ácido nucleico es un segmento contiguo de por lo menos aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente de por lo menos aproximadamente 22 nucleótidos, comúnmente de por lo menos aproximadamente 29 nucleótidos, muy frecuentemente de por lo menos aproximadamente 35 nucleótidos, típicamente de por lo menos aproximadamente 41 nucleótidos, usualmente de por lo menos aproximadamente 47 nucleótidos, preferiblemente de por lo menos aproximadamente 55 nucleótidos, y son realizaciones particularmente preferidas las que son de por lo menos aproximadamente 60 o más nucleótidos, por ejemplo, 67, 73, 81, 89, 95, etc., incluyendo cientos y/o miles.

Un DNA que codifica una proteína IL-B30 será particularmente útil para identificar genes, especies de RNAm, y DNAm que codifican proteínas relacionadas o similares, así como también los DNA que codifican proteínas homólogas de diferentes especies. Habrá homólogos en otras especies incluyendo primates, roedores, caninos, felinos, y aves. Varias proteínas IL-B30 deben ser homólogas y también se describen en esta memoria. Sin embargo, incluso proteínas que tienen una relación evolutiva más distante con el antígeno, pueden ser fácilmente aisladas bajo condiciones apropiadas empleando estas secuencias si las mismas son suficientemente homólogas. Las proteínas IL-B30 de primate son particularmente interesantes. También lo son las p40 de IL-12, que son proteínas que constituyen dianas principales para las construcciones de fusión o para composiciones de combinación.

Los clones recombinantes derivados de secuencias genómicas por ejemplo los que contienen intrones, serán útiles para estudios transgénicos incluyendo, por ejemplo, células y organismos transgénicos, y terapia génica. Véase por ejemplo Goodnow (1992) "Transgenic Animals" en Roitt (ed.) *Encyclopedia of Immunology*, Academic Press, San Diego, pp. 1502-1504; Travis (1992) *Science* 256: 1392-1394; Kuhn *et al.*, (1991) *Science* 254:707-710; Capecchi (1989) *Science* 244:1288; Robertson (ed. 1987) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; y Rosenberg (1992) *J. Clinical Oncology* 10:180-199.

Homología sustancial, por ejemplo identidad, en el contexto de comparación de secuencias de ácido nucleico, significa que cualquiera de los segmentos, o sus cadenas complementarias, cuando se comparan, son idénticos cuando están alineados óptimamente con inserciones o deleciones apropiadas de nucleótidos en por lo menos aproximadamente 50% de los nucleótidos, generalmente por lo menos aproximadamente 58%, comúnmente por lo menos aproximadamente 65%, frecuentemente por lo menos aproximadamente 71%, típicamente por lo menos aproximadamente 77%,

usualmente por lo menos aproximadamente 85%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 95 ó 98% o más, y en realizaciones particulares, tan alta como 99% o más de los nucleótidos. Alternativamente, existe homología sustancial cuando los segmentos se hibridan bajo condiciones de hibridación selectivas, a una cadena, o a su complemento, usando típicamente una secuencia de p40 de IL-12 y/o IL-B30, por ejemplo en SEQ ID NO: 1. Típicamente, ocurrirá una hibridación selectiva cuando existe por lo menos una identidad de aproximadamente 55% en una extensión de por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos, preferiblemente de por lo menos aproximadamente 75% en una extensión de aproximadamente 25 nucleótidos, y aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% en aproximadamente 20 nucleótidos. Véase, Kanehisa (1984) *Nuc. Acids Res.* 12:203-213. La longitud de la comparación de la identidad, tal como se describe, puede ser de tramos más largos y en algunas realizaciones de esta descripción será en un tramo de por lo menos aproximadamente 17 nucleótidos, usualmente, por lo menos aproximadamente 28 nucleótidos, típicamente por lo menos aproximadamente 40 nucleótidos, y preferiblemente por lo menos aproximadamente 75 a 100 o más nucleótidos.

Condiciones rigurosas, cuando se hace referencia a homología en el contexto de hibridación, consisten en condiciones combinadas rigurosas de sal, temperatura, disolventes orgánicos y otros parámetros, típicamente los controlados en las reacciones de hibridación. Las condiciones de temperatura rigurosas usualmente incluirán temperaturas superiores a aproximadamente 30°C, usualmente superiores a aproximadamente 37°C, típicamente superiores a aproximadamente 55°C y más típicamente superiores a aproximadamente 60 o 65°C y preferiblemente superiores a aproximadamente 70°C. Condiciones salinas rigurosas serán comúnmente las de aproximadamente 1000 mM, usualmente de menos de aproximadamente 400 mM, típicamente menos de aproximadamente 250 mM, preferiblemente menos de aproximadamente 150 mM incluyendo aproximadamente 100, 50 o incluso 20 mM. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medición de cualquier parámetro solo. Véase, por ejemplo, Wetmur y Davidson (1968) *J. Mol. Biol.* 31:349-370. La hibridación bajo condiciones rigurosas debe dar una base de por lo menos el doble con respecto a la base, preferiblemente por lo menos 3-5 o más.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se diseñan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se diseñan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula luego el porcentaje de identidad de secuencias para las secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros de programa diseñados.

Una alineación óptica de secuencias para comparación puede llevarse a cabo por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante la búsqueda del método de similaridad de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones por ordenador de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (véase en general Ausubel *et al.*, *supra*).

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. El PILEUP crea un alineamiento de secuencias múltiples desde un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas, en pares para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencias. También representa gráficamente un árbol o dendrograma que muestra las relaciones de agrupaciones usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35:351-360. El método usado es similar al método descrito por Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-153. El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineamiento múltiple comienza con el alineamiento en pares de las dos secuencias más similares, que producen una agrupación de dos secuencias alineadas. Esta agrupación se alinea luego con las siguientes secuencias próximas más relacionadas o agrupación de secuencias alineadas. Dos agrupaciones de secuencias están alineadas mediante una simple extensión del alineamiento en pares de dos secuencias individuales. El alineamiento final se logra mediante una serie de alineamientos progresivos, en pares. El programa se hace funcionar diseñando secuencias específicas y sus coordenadas de nucleótidos o de aminoácidos para regiones de comparación de secuencias y mediante diseño de los parámetros del programa. Por ejemplo, una secuencia de referencia puede compararse con otras secuencias de ensayo para determinar el porcentaje de relación de identidad de secuencia usando los parámetros siguientes: ponderación (peso) del hueco por omisión (3,00), ponderación de la longitud del hueco por omisión (0,10), y huecos finales promediados.

Otro ejemplo de algoritmo que es apropiado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y la similitud de secuencias es el algoritmo BLAST que ha sido descrito por Altschul *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. El programa de ordenador para llevar a cabo los análisis BLAST está disponible para el público en el *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primeramente pares de secuencias de alta puntuación (abreviadamente HSP por la expresión inglesa *High Scoring Pairs*) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de interrogación, que igualan o satisfacen algunas puntuaciones T valor umbral de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se define como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, *supra*). Estos resultados positivos (*hits*) de palabra vecina inicial cercana actúan como siembra para iniciar búsquedas hasta llegar a una HSP más larga que la contiene. Los resultados positivos de palabras se extienden luego en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta llegar tan lejos como pueda ser aumentada la puntuación del alineamiento acumulativo. La extensión de los resultados positivos de palabras en cada dirección se detiene cuando: el resultado del alineamiento

acumulativo cae la cantidad X desde su valor máximo logrado; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLO-SUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencias, el algoritmo BLAST efectúa también un análisis estadístico de la similitud entre las dos secuencias (véase por ejemplo Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Una medida de la similitud provista por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual ocurriría por casualidad una igualdad entre dos nucleótidos o secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01, y aún más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico de polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico tiene inmunológicamente reacción cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico tal como se describe a continuación. Así, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico al segundo polipéptido, por ejemplo cuando los dos péptidos difieren únicamente por las sustituciones conservadoras. Otra indicación de que las dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que se hibridan entre sí bajo condiciones rigurosas tal como se describe a continuación.

El gen IL-B30 de otras especies de mamíferos puede ser clonado y aislado mediante hibridación de especies cruzadas entre especies estrechamente relacionadas. La homología puede ser relativamente baja entre especies distantemente relacionadas, y por lo tanto la hibridación de las especies relacionadas de forma relativamente íntima es aconsejable. Alternativamente la obtención de una preparación de anticuerpos que exhiba menos especificidad de especies puede ser útil en métodos de clonación con expresión.

VII. Preparación de combinaciones de p40/IL-B30; Miméticos

El DNA que codifica p40 de IL-12 o IL-B30 o sus fragmentos puede obtenerse mediante síntesis química, escrutinio de genotecas de cDNA o escrutinios de genotecas genómicas preparadas a partir de una amplia variedad de muestras de líneas de células o de tejidos. Véase por ejemplo Okayama y Berg (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2:161-170; Gubler y Hoffman (1983) *Gene* 25:263-269; y Glover (ed. 1984) *DNA Cloning: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford. Alternativamente, las secuencias indicadas en este texto proporcionan cebadores de PCR útiles o permiten una preparación sintética u otra preparación de genes apropiados que codifican una p40 de IL-12 o IL-B30; incluyendo las realizaciones que ocurren de forma natural.

Este DNA puede expresarse en una amplia variedad de células hospedantes para las síntesis de una p40 de IL-12 y IL-B30 de longitud total o fragmentos que a su vez pueden usarse por ejemplo para generar anticuerpos policlonales o monoclonales; para estudios de unión; para la construcción y expresión de moléculas modificadas; y para estudios de estructura/función.

Vectores tales como los usados aquí comprenden plásmidos, virus, bacteriófagos, fragmentos de DNA integrables, y otros vehículos que permiten la integración de fragmentos de DNA en el genoma del hospedante. Véase por ejemplo Pouwels *et al.*, (1985 and Supplements) *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y.; y Rodríguez *et al.*, (eds. 1988) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworth, Boston, MA.

Para los propósitos de esta invención, las secuencias de DNA están unidas operativamente cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el DNA para una pre-secuencia o líder secretora está unido operativamente a un polipéptido si se expresa como pre-proteína o si participa en dirigir el polipéptido hasta la membrana celular o en la secreción del polipéptido. Un promotor está unido operativamente a una secuencia codificadora si controla la transcripción del polipéptido; un sitio de unión de ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificadora si está situado para permitir la traducción. Usualmente, "unido operativamente" significa contiguo y en marco de lectura, pero sin embargo ciertos elementos genéticos, tales como los genes represores no están unidos contiguamente sino que están todavía unidos a secuencias operativas que controlan a su vez la expresión. Véase por ejemplo Rodríguez *et al.*, Chapter 10, pp. 205-236; Balbas y Bolivar (1990) *Methods in Enzymology*, 185:14-37; y Ausubel *et al.*, (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene y Wiley, NY. La co-expresión de las dos secuencias codificadoras es particularmente interesante en esta invención.

Ejemplos representativos de vectores de expresión apropiados incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama *et al.*, (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:1136-1142; pMC1neo Poly-A, véase Thomas *et al.*, (1987) *Cell* 51:503-512; y un vector de baculovirus, tal como pAC373 o pAC610. Véase, por ejemplo, Miller (1988) *Ann. Rev. Microbiol.* 42:177-199.

Frecuentemente será deseable expresar un polipéptido p40 de IL-12 y/o IL-B30, en un sistema que proporciona un patrón de glucosilación específico o definido. Véase por ejemplo, Luckow y Summers (1988) *Bio/Technology* 6:47-55; y Kaufman (1999) *Meth. Enzymol.* 185:487-511.

El p40 de IL-12 y/o IL-B30 o uno de sus fragmentos puede manipularse por ingeniería genética para que sea fosfatidil-inositol (PI) unido a una membrana celular, pero puede separarse de las membranas mediante tratamiento con una enzima escindidora del fosfatidil-inositol por ejemplo fosfatidil-inosol-fosfolipasa C. Esta libera al antígeno en una forma biológicamente activa, y permite la purificación mediante procedimientos estándares de la química de proteínas. Véase por ejemplo Low (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 988:427-454; Tse *et al.*, (1985) *Science* 230:1003-1008; y Brunner *et al.*, (1991) *J. Cell Biol.* 114:1275-1283.

Ahora que han sido caracterizados p40 de IL-12 y/o IL-B30, sus fragmentos o derivados pueden prepararse por procedimientos convencionales para sintetizar péptidos. Estos incluyen procedimientos tales como los descritos en Stewart y Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky y Bodanszky, (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, New York; Bodanszky (1984) *The Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, New York; y Villafranca (ed. 1991) *Techniques in Protein Chemistry II*, Academic Press, San Diego, Ca.

VIII. Usos

La presente invención proporciona reactivos que son útiles para aplicaciones de diagnóstico, tal como se describe en otra parte en este texto, por ejemplo en las condiciones mediadas por el complejo p40 de IL-12/IL-B30 o en lo que sigue más adelante en la descripción de los kits para diagnóstico. El gen puede ser útil en ciencias forenses, por ejemplo, para distinguir roedores de humanos, o como un marcador para distinguir entre diferentes células que exhiben patrones de modificación o expresión diferenciales. Las composiciones proporcionadas son reactivos útiles para, por ejemplo, ensayos *in vitro*, investigación científica, y para la síntesis o fabricación de ácidos nucleicos, polipéptidos o anticuerpos.

Esta invención proporciona también reactivos con significativo potencial comercial y/o terapéutico. El complejo p40 de IL-12/IL-B30 (natural o recombinante), sus fragmentos, y sus anticuerpos junto con compuestos identificados por su afinidad de unión al complejo o a sus componentes individuales deben ser útiles como reactivos para las técnicas de enseñanza de biología molecular, inmunología o fisiología. Pueden prepararse kits apropiados con los reactivos, por ejemplo, en ejercicios de prácticas de laboratorio para la producción o uso de proteínas, anticuerpos, métodos de clonación, histología, etc.

Los reactivos serán también útiles en el tratamiento de estados asociados con desarrollo o fisiología anormal incluyendo estados inflamatorios. Pueden ser útiles en ensayos *in vitro* para determinar la presencia o ausencia de componentes interactuantes, que pueden estar correlacionados con éxitos de estrategias de tratamiento particulares. En particular, la modulación de la fisiología de varias células, por ejemplo las hematopoyéticas o linfoides, se logrará mediante métodos apropiados para el tratamiento usando las composiciones descritas en este texto. Véase por ejemplo Thomson (1994; ed.) *The Cytokine Handbook* (2d ed.) Academic Press., San Diego; Metcalf y Nicola (1995) *The Hematopoietic Colony Stimulating Factors*, Cambridge University Press; y Aggarwall y Gutterman (1991) *Human Cytokines*, Blackwell Pub.

Las observaciones de que el complejo de citoquina puede inducir niveles de IFN γ proporciona una comprensión útil del potencial terapéutico. En particular, la producción de IFN γ da como resultado mejor inmunidad mediada por células. Véase, por ejemplo, Paul (1998) *Fundamental Immunology*, (4^a ed.) Raven Press, NY; y Delves y Roitt (eds. 1998) *The Encyclopedia of Immunology* Academic Press (ISBN: 0122267656). Por lo tanto, el aumento de las respuestas celulares será útil en el contexto de mejorar la actividad antitumoral, mejorar las respuestas a vacunas (tanto de inmunidad humoral como celular), potenciar los efectos anti-virales, y antagonizar las respuestas alérgicas en ciertas ventanas de desarrollo. Véase, por ejemplo, Rose y Mackay (eds. 1998) *The Autoimmune Diseases*, (3d ed.) Academic Press, San Diego; y Kay (ed. 1997) *Allergy and Allergic Diseases*, Blackwell Science, Malden MA. A la inversa, los antagonistas podrían usarse para bloquear o para evitar dicho potenciamiento de IFN γ , reduciendo de esta manera la resistencia o intensidad del potenciamiento celular. Esto sería útil por ejemplo en situaciones de autoinmunidad (tal como esclerosis múltiple o psoriasis) o en estados inflamatorias crónicos (tal como artritis reumatoide o enfermedad inflamatoria del intestino). Véase, por ejemplo, Samter *et al.*, (eds.) *Immunological Diseases*, vols. 1 y 2, Little, Brown and Co. Los resultados iniciales sugieren que el papel de p40/IL-B30 es más crítico para el mantenimiento del estado inflamatorio crónico. Por lo tanto el bloqueo puede ser eficaz después del desarrollo inicial del estado.

Con tales dianas terapéuticas, los agonistas o antagonistas se combinarán con la terapéutica existente, por ejemplo con otros moduladores de inflamación. Por lo tanto, los agonistas frecuentemente se combinarán por ejemplo con IL-18, IL-12, tratamientos de radiación o quimioterapia, coadyuvantes de vacuna y/o terapéutica antiviral. Alternativamente los antagonistas podrán combinarse con antagonistas de TNF α , antagonistas de IL-12, con IL-10, y/o esteroides. También podrían usarse homólogos virales de las citoquinas.

Por ejemplo, una enfermedad o trastorno asociado con expresión anormal o con señalización anormal mediante p40 de IL-12/IL-B30 debe ser una diana probable para un agonista o antagonista. Las nuevas citoquinas deben jugar un papel en la regulación o desarrollo de las células hematopoyéticas, por ejemplo células linfoides, que afectan a las respuestas inmunológicas, por ejemplo inflamación y/o trastornos de autoinmunidad. Alternativamente pueden afectar a la fisiología o desarrollo vascular o los efectos neuronales. También puede ser importante la programación del tiempo de administración del agente terapéutico en relación a la iniciación o al mantenimiento del estado. En particular, el complejo de citoquina debe mediar, en varios contextos, la síntesis de citoquinas por parte de las células,

la proliferación, etc. Los antagonistas de p40 de IL-12/IL-B30 tal como las variantes de muteína de una forma natural o de anticuerpos bloqueadores, podría proporcionar una vía selectiva y poderosa para bloquear las respuestas inmunes, por ejemplo en situaciones tales como respuestas inflamatorias o autoinmunes. Véase también Samter *et al.*, (eds.) *Immunological Diseases*, vols. 1 y 2, Little, Brown and Co.

5 Las dianas particulares para aplicación terapéutica incluyen por ejemplo estados pulmonares, tanto asma como fibrosis, en modelos EAE (los cuales pueden ser modelos útiles para la esclerosis múltiple), diabetes e inflamaciones intestinales. Véase, por ejemplo, Barnes *et al.*, (1998) *Mol. Med. Today* 4:452-458; Pauwels *et al.*, (1998) *Clin. Exp. Allergy*, Aug. 28 Suppl 3:1-5; Durham (1998) *Clin. Exp. Allergy* Jun. 28 Suppl 2:11-16; Leung (1997) *Pediatr. Res.* 42: 559-568; Pretolani *et al.*, (1997) *Res. Immunol* 148:33-38; Lamkhieoued *et al.*, (1996) *Ann. NY Acad. Sci.* 796:203-208; Erb *et al.*, (1996) *Immunol. Cell. Biol.* 74:206-208; y Anderson *et al.*, (1994) *Trends Pharmacol. Sci.* 15:324-332 para asma; Coker *et al.*, (1998) *Eur. Respir. J.* 11:1218-1221; y Bienkowski *et al.*, (1995) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209:118-140 para fibrosis pulmonar; Pearson y Mc Devitt (1999) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 238:79-122; Miller y Shevach (1998) *Res. Immunol.* 149:753-759; Hoffman y Karpus (1998) *Res. Immunol.* 149:790-794 (con discusión 846-847 y 855-860); Segal (1998) *Res. Immunol.* 149:811-820 (con discusión 850-851 y 855-60); Liblau *et al.*, (1997) *Immunol. Today*, 18:599-604 Gold *et al.*, (1997) *Crit. Rev. Immunol* 17:507-510; Spack (1997) *Crit. Rev. Immunol.* 17:529-536; y Leonard *et al.*, (1997) *Crit. Rev. Immunol.* 17:545-553 para modelos EAE (para esclerosis múltiple); Almawi *et al.*, (1999) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:1497-1502; Rabinovitch *et al.*, (1998) *Biochem. Pharmacol.* 55:1139-1149; y Rabinovitch (1998) *Diabetes Metab. Rev.* 14:129-151 para diabetes; y Leach *et al.*, (1999) *Toxicol. Pathol.* 27:123-133; Braun *et al.*, (1999) *Curr. Opin. Rheumatol.* 11:68-74; Rugtveit *et al.*, (1997) *Gastroenterology* 112:1493-1505; Strober *et al.*, (1997) *Immunol. Today*, 18:61-64; and Ford *et al.*, (1996) *Semin. Pediatr. Surg.* 5:155-159 para estados inflamatorios de vientre/intestino.

25 La estimulación con p40/IL-B30 de células activadas de memoria da como resultado cambios fenotípicos que incluyen moléculas de adhesión. La CD69L está altamente expresada después de la estimulación con p40/IL-B30, y la CD54 disminuye muy apreciablemente. Estos cambios en la expresión de las moléculas de adhesión pueden permitir modular las células de memoria para que entren en la región rica en células T/DC de los nódulos linfáticos primarios y secundarios, por ejemplo a través de vénulas endoteliales superiores (abreviadamente HEV por la expresión inglesa *high endothelial venules*). Las células de memoria también son cebadas para volverse sensibles a la estimulación con 30 IL- 12. Por lo tanto, una rápida y elevada producción de IFN seguiría rápidamente a la inducción con IL-12 por el antígeno. Por lo tanto, p40/IL-30 puede acelerar una respuesta inmune por las células de memoria, ya sea aumentando la velocidad de respuesta o aumentando el número de células de memoria, o ambos. La p-40/IL-B30 puede tener efectos diferenciales específicos para las células de memoria con menor o ningún efecto sobre las células indiferentes. A la inversa, en muchos estados inflamatorios crónicos, tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del 35 intestino, psoriasis, etc., las lesiones activas son dependientes de las células CD45Rb^{bajas}. Como tales, los antagonistas pueden bloquear efectivamente la fase crónica de dicho estado inflamatorio.

Se conocen varios estados anormales en cada uno de los tipos de células que demostraron que producen tanto mRNA de p 40 de IL-12 como de IL-B30 mediante transferencia Northern. Véase Berkow (ed.) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn *et al.*, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, N.Y.; y Weatherall *et al.*, (eds.) *Oxford Textbook of Medicine*, Oxford University Press, Oxford. Muchos otros estados médicos y enfermedades implican la activación por parte de macrófagos o monocitos, y muchos de estos serán sensibles al tratamiento con un agonista o antagonista de los que se proporcionan en la presente invención. Véase, por ejemplo, Stites y Terr (eds.; 1991) *Basic and Clinical Immunology*, Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut; 45 y Samter *et al.*, (eds.) *Immunological Diseases*, Little, Brown and Co. Estos problemas deben ser susceptibles de prevención o tratamiento usando las composiciones que se proporcionan en la presente invención.

El complejo de citoquinas p40 de IL-12/IL-B30, los antagonistas, los anticuerpos, etc. pueden purificarse y luego administrarse a un paciente, tanto veterinario o humano. Estos reactivos pueden combinarse para uso terapéutico 50 con ingredientes adicionales activos o inertes, como por ejemplo en diluyentes o vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo coadyuvantes inmunógenos, junto con estabilizadores fisiológicamente inocuos, excipientes o conservantes. Estas combinaciones pueden filtrarse en forma estéril y pueden colocarse en formas de dosificación mediante liofilización en frascos para dosificación o pueden almacenarse en preparaciones acuosas estabilizadas. Esta invención contempla también el uso de anticuerpos o sus fragmentos de unión, incluyendo formas que 55 no son de unión al complemento.

El escrutinio de fármacos usando p40 de IL-12/IL-B30, proteína de fusión o sus fragmentos, pueden efectuarse para identificar compuestos con los cuales tienen afinidad de unión o con otros efectos biológicos relevantes sobre las funciones de p40 de IL-12/IL-B30, incluyendo el aislamiento de los componentes asociados. Luego pueden usarse 60 subsiguientes ensayos biológicos para determinar si un compuesto candidato tiene una actividad estimulante intrínseca y si por lo tanto es un bloqueador o antagonista porque bloquea la actividad del complejo de citoquinas. Asimismo, un compuesto que tiene actividad estimulante intrínseca puede activar la vía de señales y es por consiguiente un agonista porque estimula la actividad del complejo de citoquinas. Esta invención contempla además el uso terapéutico de anticuerpos bloqueantes para el complejo p40 de IL-12/IL-B30 como antagonista y de anticuerpos estimulantes 65 como agonistas. Este método debe ser particularmente útil con otras variantes de especies de p40 de IL- 12 o IL-B30.

Las cantidades de reactivos necesarias para una terapia eficaz dependerán de muchos factores diferentes, que incluyen los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados.

Por lo tanto, las dosis de tratamiento deben valorarse para optimizar la seguridad y la eficacia. Típicamente las dosis usadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil con relación a las cantidades que son útiles para la administración *in situ* de estos reactivos. El ensayo en animales de dosis eficaces para el tratamiento de trastornos particulares proporcionará una indicación adicional predictiva de la dosis para seres humanos. Se han descrito diversas consideraciones, por ejemplo en Gilman *et al.*, (eds. 1990) *Goodman y Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8th Ed., Pergamon Press; y *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th. ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn. Los métodos para administración se estudian en dicho texto y a continuación, por ejemplo para administración oral, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular, difusión transdérmica y otros. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluirán agua, solución salina, tampones y otros compuestos descritos, por ejemplo, en *The Merck Index*, Merck and Co. Rahway, New Jersey. Los intervalos de dosificación, se esperaría comúnmente que estuvieran en cantidades inferiores a concentraciones de 1 mM, típicamente concentraciones de menos de aproximadamente 10 μ M, usualmente de menos de aproximadamente 100 nM, preferiblemente de menos de aproximadamente 10 pM (picomolar), y aún más preferiblemente de menos de aproximadamente 1 fM (femtomolar), con un vehículo apropiado. Frecuentemente se utilizarán formulaciones de liberación lenta o un aparato de liberación lenta para una administración continua o a largo plazo. Véase por ejemplo, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533.

El complejo de citoquinas p40 de IL-12/IL-B30, las proteínas de fusión y los anticuerpos para las mismas o sus fragmentos, los antagonistas y agonistas, pueden ser administrados directamente al hospedante al que es necesario tratar, o dependiendo del tamaño de los compuestos, puede ser conveniente conjugarlos con proteínas portadoras, tales como ovoalbúmina o seroalbúmina antes de su administración. Pueden administrarse formulaciones terapéuticas en muchas formulaciones de dosificación convencional. Aunque es posible administrar el ingrediente activo solo, se prefiere presentarlo como una formulación farmacéutica. Las formulaciones comprenden típicamente por lo menos un ingrediente activo, tal como se definió anteriormente conjuntamente con uno o más de sus vehículos aceptables. Cada vehículo debe ser farmacéutica y fisiológicamente aceptable en el sentido de que debe ser compatible con los otros ingredientes y no ser perjudicial para el paciente. Las formulaciones incluyen las que son apropiadas para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral (incluyendo administración subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria, y pueden prepararse mediante muchos métodos que son bien conocidos en la técnica farmacéutica. Véase por ejemplo Gilman *et al.*, (eds. 1990) *Goodman y Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8th. ed., Pergamon Press; y *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn; Avis *et al.*, (eds. 1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Dekker, New York; Lieberman *et al.*, (eds. 1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Dekker, New York; y Lieberman *et al.*, (eds. 1990) *Pharmaceutical dosage Forms: Disperse Systems*, Dekker, New York. La terapia de esta invención puede combinarse o puede usarse en asociación con otros agentes, por ejemplo otras citoquinas incluyendo IL-6 o G-CSF, o sus respectivos antagonistas.

Ambas formas, la natural y la recombinante de las IL-B30 de esta invención, son particularmente útiles en kits y en métodos de ensayo que son capaces de escrutar compuestos para determinar la actividad de unión a las proteínas. En años recientes se han desarrollado varios métodos de ensayos automáticos que permiten el escrutinio de decenas de miles de compuestos en un corto período. Véase por ejemplo, Fodor *et al.*, (1991) *Science* 251:767-773, el cual describe medios para el ensayo de afinidad de unión mediante una pluralidad de polímeros definidos sintetizados sobre un sustrato sólido. El desarrollo de ensayos apropiados puede facilitar enormemente la disponibilidad de grandes cantidades del complejo de citoquinas p40 de IL-12/IL-B30 solubles, tal como el proporcionado por esta invención.

Pueden usarse otros métodos para determinar los residuos críticos en las interacciones del complejo IL-12p40/IL-B30-receptor. Puede efectuarse un análisis mutacional, por ejemplo véase, Somoza *et al.*, (1993) *J. Exptl. Med.* 178:549-558, para determinar los residuos específicos críticos en la interacción y/o señalización. PHD (Rost y Sander (1994) *Proteins*, 19:55-72) y DSC (King y Sternberg (1996) *Protein Sci.* 5:2298-2310) pueden proporcionar predicciones de estructura secundaria de hélice- α (H), láminas- β (E), o arrollamientos (L). Las hélices A y D son típicamente las más importantes en la interacción del receptor, siendo la región más importante la de la hélice D.

Por ejemplo, los antagonistas pueden encontrarse normalmente una vez definido estructuralmente el antígeno y/o receptor, por ejemplo mediante datos de estructura terciaria. El ensayo de los potenciales análogos de interacción es ahora posible mediante el desarrollo de métodos de ensayo sumamente automatizados empleando un complejo purificado p40 de IL-12/IL-B30. En particular, se descubrirán nuevos agonistas y antagonistas usando las técnicas de escrutinio descritas en este texto. Son particularmente importantes los compuestos que demuestran tener afinidad de unión combinada para un espectro de moléculas de p40 de IL-12/IL-B30, por ejemplo, compuestos que pueden servir como antagonistas para variantes de especies del complejo de citoquinas.

Un método para escrutar fármacos utiliza células hospedantes eucariotas o procariotas que están transformadas establemente con moléculas de DNA recombinante que expresan una IL-20p40/IL-B30. Pueden aislarse células que expresan una p40 de IL-12/IL-B30 aislada a partir de otras moléculas. Dichas células, ya sea en forma viable o fija pueden usarse para ensayos de unión de pareja de unión estándar. Véase también Parce *et al.*, (1989) *Science* 246:243-247; y Owicki, *et al.*, (1990) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 87:4007-4011, las cuales describen métodos sensibles para detectar respuestas celulares.

Otra técnica para el escrutinio de fármacos implica una realización que proporciona un elevado resultado de escrutinio para compuestos que tienen la afinidad de unión apropiada con una p40 de IL-12/IL-B30 y que ha sido descrita en forma detallada por Geysen, en la solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En

primer lugar, se sintetizan grandes cantidades de diferentes compuestos de ensayo que consisten en pequeños péptidos sobre un sustrato sólido, por ejemplo varillas de plástico o alguna otra superficie apropiada, véase Fodor *et al.*, (1991). Luego todas las varillas se hacen reaccionar con p40/IL-B30 solubilizado, no purificado o solubilizado, purificado, y se lavan. La etapa siguiente comprende detectar la p40/IL-B30 unida.

5 Un diseño racional de fármacos puede basarse también en estudios estructurales de las configuraciones moleculares de p40/IL-B30 y de otros efectores o análogos. Los efectores pueden ser otras proteínas que median otras funciones en respuesta a la unión, u otras proteínas que interactúan normalmente con p40/IL-B30, por ejemplo un receptor. Un medio para determinar que sitios interactúan con otras proteínas específicas es una determinación de la estructura física, por ejemplo cristalografía de rayos X o técnicas de RMN bidimensional. Estos proporcionarán una guía en lo que se refiere a cuales son los residuos de aminoácidos que forman regiones de contacto molecular, como modelado, por ejemplo contra otros modelos de citoquina-receptor. Para una descripción detallada de la determinación estructural de proteínas, véase por ejemplo Blundell y Johnson (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, New York.

15 IX. Kits

Esta invención también se refiere al uso de proteínas p40/IL-B30, sus fragmentos, péptidos y sus productos de fusión en una variedad de kits de diagnóstico y a métodos para detectar la presencia de otra p40/IL-B30 o pareja de unión. Típicamente, el kit tendrá un compartimiento que contiene un péptido p40, p40/IL-B30 o IL-B30 definido o un segmento génico o un reactivo que reconoce a uno o al otro, por ejemplo anticuerpos o fragmentos de fusión de p40/IL-B30.

Un kit para determinar la afinidad de unión de un compuesto de ensayo con una p40 de IL-12/IL-B30 comprendería típicamente un compuesto de ensayo; un compuesto marcado, por ejemplo un pareja de unión o un anticuerpo que tiene afinidad de unión conocida para p40/IL-B30; una fuente de p40/IL-B30 (natural o recombinante); y medios para separar el compuesto unido del compuesto marcado libre, tal como una fase sólida para inmovilizar la molécula. Una vez escrutados los compuestos, los que tienen afinidad de unión apropiada para el antígeno pueden evaluarse en ensayos biológicos apropiados, tal como es bien conocido en la técnica para determinar si actúan como agonistas o antagonistas para la vía de señalización de p40/IL-B30. La biodisponibilidad de los polipéptidos de fusión p40 de IL-12/IL-B30 recombinantes proporciona también patrones bien definidos para calibrar dichos ensayos.

Un kit preferido para determinar la concentración de, por ejemplo un p40/IL-B30 en una muestra comprendería típicamente un compuesto marcado, por ejemplo una pareja de unión a un anticuerpo que tiene afinidad de unión conocida para el antígeno, una fuente de citoquina (natural o recombinante) y medios para separar el compuesto unido del compuesto marcado libre, por ejemplo una fase sólida para inmovilizar el p40/IL-B30. Normalmente se proporcionarán compartimientos que contienen reactivos e instrucciones.

Los anticuerpos, incluyendo los fragmentos de unión al antígeno, específicos para p40/IL-B30 o los fragmentos son útiles en aplicaciones de diagnóstico para detectar la presencia de niveles elevados de p40, IL-B30, p40/IL-B30 y/o sus fragmentos. Dichos ensayos de diagnóstico pueden emplear lisados, células vivas, células fijas, inmuno-fluorescencia, cultivos de células, fluidos corporales, y además pueden implicar la detección de antígenos relacionados con el antígeno en suero o similares. Los ensayos para diagnóstico pueden ser homogéneos (sin etapa de separación entre el reactivo libre y el complejo de antígeno-pareja de unión) o heterogéneos (con una etapa de separación). Existen varios ensayos comerciales tales como radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA), e inmunoensayo de enzimas (EIA), técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas (EMIT), inmunoensayo fluorescente marcado con sustrato (SLFIA), y similares. Véase por ejemplo Van Vunakis *et al.*, (1980) *Meth. Enzymol.* 70:1-525; Harlow y Lane (1980) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, NY; y Coligan *et al.*, (eds. 1993) *Current Protocols in Immunology*, Greene y Wiley, NY.

Los anticuerpos anti-idiotípicos pueden tener un uso similar para diagnosticar la presencia de anticuerpos contra p40/IL-B30, tal como puede ser el diagnóstico de diversos estados anormales. Por ejemplo, la sobreproducción de p40/IL-B30 puede dar como resultado la producción de diversas reacciones inmunológicas que pueden ser el diagnóstico de estados fisiológicos anormales, particularmente en estados celulares proliferativos, tales como cáncer o activación o diferenciación anormal.

Frecuentemente, los reactivos para los ensayos de diagnóstico se proporcionan en kits para optimizar la sensibilidad del ensayo. Para la presente invención, dependiendo de la naturaleza del ensayo, el protocolo y el marcador se proporciona cualquiera de un anticuerpo marcado o no marcado, o un pareja de unión o p40/IL-B30 marcado. Esto es usualmente junto con otros aditivos, tales como tampones, estabilizadores, materiales necesarios para la producción de señales, tales como sustratos para enzimas y similares. Preferiblemente el kit contendrá también instrucciones para un uso adecuado y desecho de los contenidos después del uso. Típicamente el kit tiene compartimientos para cada reactivo útil. Convenientemente los reactivos se proporcionan en forma de un polvo seco liofilizado, en donde dichos reactivos pueden ser reconstituidos en un medio acuoso con la condición de proporcionar concentraciones apropiadas de reactivos para llevar a cabo el ensayo.

Muchos de los constituyentes antes mencionados del escrutinio de fármacos y de los ensayos para diagnóstico pueden usarse sin modificación o pueden modificarse de diversas maneras. Por ejemplo, el marcado puede llevarse a cabo uniendo de forma covalente o no covalente una porción que directa o indirectamente proporciona una señal

detectable. En muchos de estos ensayos la pareja de unión, el compuesto de ensayo, p40/IL-B30 o los anticuerpos para los mismos pueden marcarse de forma directa o indirecta. Las posibilidades para el marcado directo incluyen grupos de marcadores: radiomarcadores, tales como ^{125}I , enzimas tales como peroxidasa y fosfatasa alcalina, y marcadores fluorescentes (patente de EE.UU. 3.940.475) que son capaces de monitorizar el cambio en la intensidad de fluorescencia, el desplazamiento de la longitud de onda o la polarización por fluorescencia. Las posibilidades para un marcado indirecto incluyen biotilación de un constituyente seguida de unión a avidina acoplada con uno de los grupos marcadores precedentes.

Existen también numerosos métodos para separar la p40/IL-B30 unida de la libre o alternativamente la p40/IL-B30 unida del compuesto de ensayo libre. El p40/IL-B30 puede inmovilizarse sobre varias matrices después de lavarlos. Entre las matrices apropiadas se incluyen las de plástico tales como una placa ELISA, filtros, y bolitas. Véase por ejemplo Coligan *et al.*, (eds. 1993) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, capítulo 2, Greene y Wiley, NY. Otras técnicas de separación apropiadas incluyen sin limitación el método de partículas magnetizables de anticuerpo con fluoresceína descrito en Rattle *et al.*, (1984) *Clin. Chem.* 30:1457-1461, y la separación de partículas magnéticas con anticuerpo doble descrita en la patente de EE.UU, n° 4.659.678.

Los métodos para unir proteínas o sus fragmentos a los diversos marcadores han sido extensamente descritos en la literatura y no requieren en esta descripción un análisis detallado. Muchas de las técnicas implican el uso de grupos carboxilo activados ya sea a través del uso de carbodiimida o de ésteres activos para formar enlaces peptídicos, la formación de tioéteres por reacción de un grupo mercapto con un halógeno activado, tal como cloroacetilo o una olefina activada, tal como maleimida, para enlace o similares. Las proteínas de fusión serán también útiles en estas aplicaciones.

Otra característica de diagnóstico relacionada con esta invención implica el uso de secuencias de oligonucleótidos o polinucleótidos tomadas de la secuencia de un p40/IL-B30. Estas secuencias pueden usarse como sondas para detectar los niveles de los mensajes de p40 ó IL-B30 en muestras de pacientes que se sospecha que tienen un estado anormal, por ejemplo enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Puesto que la citoquina puede ser un marcador o mediador para activación, puede ser útil para determinar, por ejemplo, cuando puede utilizarse terapia adicional, por ejemplo, de manera preventiva antes de que aparezcan los efectos y avancen hasta un punto significativo. La preparación de ambas secuencias de nucleótidos de RNA y DNA, el marcado de las secuencias, y el tamaño preferido de las secuencias, ha recibido una amplia descripción y discusión en la literatura. Véase por ejemplo, Langer-Safer *et al.*, (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:4381-4385; Caskey (1987) *Science* 236:962-967; y Wilchek *et al.*, (1988) *Anal. Biochem.* 171:1-32.

Los kits de diagnóstico que sirven también para determinar la expresión cualitativa cuantitativa de otras moléculas han sido también contemplados. El diagnóstico o prognosis puede depender de la combinación de múltiples indicaciones usadas como marcadores. Por lo tanto, los kits pueden analizar combinaciones de marcadores. Véase por ejemplo, Viallet *et al.*, (1989) *Progress in Growth Factor Res.* 1:89-97. Otros kits pueden usarse para evaluar otros subgrupos de células.

X. Aislamiento de un receptor de p40/IL-B30

Habiendo aislado un ligando de una interacción específica ligando-receptor, existen métodos para aislar el receptor. Véase Gearing *et al.*, (1989) *EMBO J.* 8:3667-3676. Por ejemplo, pueden determinarse medios para marcar la citoquina IL-B30 sin interferir con la unión a su receptor. Por ejemplo, puede fusionarse un marcador de afinidad al extremo amino o carboxilo del ligando. Dicho marcador puede ser una cola (*tag*) de epítipo FLAG, o, por ejemplo, un dominio Ig o Fc. Puede escrutarse una genoteca de expresión para la unión específica de la citoquina, por ejemplo, clasificando células, u otros escrutinios para detectar la subpoblaciones que expresen dicho componente de unión. Véase por ejemplo, Ho *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11267-11271; y Lui *et al.*, (1994) *J. Immunol.* 152:1821-1829. Alternativamente, puede usarse un método que usa una placa sensibilizada de plástico con antígeno o anticuerpo (*panning method*). Véase por ejemplo, Seed y Aruffo (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:3365-3369.

Las técnicas de reticulación de proteínas con marcadores pueden aplicarse para aislar las parejas de unión del complejo de citoquina p40/IL-B30. Esto permitiría la identificación de proteínas que interactúan específicamente con la citoquina, por ejemplo en una manera de tipo ligando-receptor.

Se efectuarán previamente experimentos para determinar si los componentes conocidos del receptor de IL-6 o G-CSF están implicados en las respuestas a p40/IL-B30. También es muy posible que estos complejos receptores funcionales puedan compartir muchos o todos los componentes con el complejo receptor de p40/IL-B30, ya sea como subunidad receptora específica o como una subunidad receptora accesoria.

Ejemplos

1. Métodos generales

Muchos de los métodos estándares que se indican a continuación han sido descritos o citados como referencia, por ejemplo, en Maniatis *et al.*, (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2ª ed.) Vol. 1-3, CSH Press NY; Ausubel *et al.*, *Biology*, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; Ausubel *et al.*, (1987 and

Supplements) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley/Greene, NY; Innis *et al.*, (eds. 1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, NY; Bonifacino *et al.*, *Current Protocols in Cell Biology*, Wiley, NY; y Doyle *et al.*, *Cell and Tissue Culture: Laboratory Protocols*, Wiley, NY. Los métodos para purificación de proteínas incluyen métodos tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna, electroforesis, centrifugación, cristalización y otros. Véase por ejemplo Ausubel *et al.*, (1987 and periodical Supplements); Deutscher (1990) “*Guide to Protein Purification*”, *Methods in Enzymology*, vol. 182, y otros volúmenes en esta serie; Coligan, *et al* (1995 and Supplements). *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons, New York, NY; Matsudaira (ed. 1993), *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*, Academic Press, San Diego, CA; y en la literatura del fabricante sobre el uso de productos para purificación de proteínas, por ejemplo, Pharmacia, Piscataway, NJ, o Bio-Rad, Richmond CA. La combinación con técnicas recombinantes permite la fusión para segmentos apropiados (colas de epitopos), por ejemplo, para una secuencia FLAG o un equivalente que puede fusionarse, por ejemplo, a través de una secuencia separable por proteasa. Véase por ejemplo, Hochuli (1990) “*Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent*” en Setlow (ed.), *Genetic Engineering Principle and Methods* 12:87-98, Plenum Press, NY; and Crowe *et al.*, (1992) *OIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System*, QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA.

El análisis de secuencias por ordenador, por ejemplo, se realiza usando programas, disponibles que incluye los de University of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, el NCBI en NIH, y GenBank, NCBI, EMBO, y otras fuentes de secuencias públicas. Otras fuentes de análisis incluyen, por ejemplo el programa PASMOL, véase Bazan *et al.*, (1996) *Nature*, 379:591; Lodi *et al.*, (1994) *Science*, 263:1762-1766; Sayle and Milner-White, (1995) *TIBS* 20:374-376; y Gronenberg *et al.*, (1991) *Protein Engineering*, 4:263-269; y DSC, Véase King y Sternberg (1996) *Protein Sci.* 5:2298-2310. Véase también, Wilkins *et al.*, (eds. 1997) *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Springer-Verlag, NY; Salzberg *et al.*, (eds. 1998) *Computational Methods in Molecular Biology*, Elsevier, NY; y Birren *et al.*, (eds. 1997) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

Se describen técnicas inmunológicas convencionales, por ejemplo en Hertzberg *et al.*, (eds. 1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*, vols. 1-4, Blackwells Science; Coligan (1991 y actualizaciones) *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene, NY; y *Methods in Enzymology*, vols. 70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162, y 163. Ensayos de citoquinas se describen, por ejemplo, en Thomson (ed. 1994) *The Cytokine Handbook*, (2nd ed.) Academic Press, San Diego; Metcalf y Nicola (1995) *The Hematopoietic Colony Stimulating Factors*, Cambridge University Press y Aggarwal y Gutterman, (1991) *Human Cytokines*, Blackwell Pub.

Los ensayos para las actividades biológicas vasculares son bien conocidos en la técnica. Los mismos cubren actividades angiogénicas y angiostáticas en tumores o en otros tejidos, por ejemplo, proliferación de la musculatura lisa arterial, (véase, por ejemplo Koyoma *et al.*, (1996) *Cell*, 87:1069-1078), adhesión de monocitos al epitelio vascular (véase McEvoy *et al.*, (1997) *J. Exp. Med.* 185:2069-2077), etc. Véase también Ross (1993) *Nature*, 362:801-809; Rekhter y Gordon, (1995) *Am. J. Pathol.*, 147:668-677; Thyberg *et al.*, (1990) *Atherosclerosis*, 10:966-990; y Gumbiner (1996) *Cell*, 84:345-357.

Los ensayos para las actividades biológicas de células neurales han sido descritas, por ejemplo, en Wouterlood, (ed.1995) *Neuroscience Protocols* módulos 10, Elsevier; *Methods in Neurosciences*, Academic Press; y *Neuromethods Humana Press*, Totowa, NJ. La metodología de los sistemas del desarrollo se describe, por ejemplo, en Meisami (ed.) *Handbook of Human Growth and Developmental Biology*, CRC Press; y Chrispeels (ed.) *Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology*, Interscience.

Los análisis FACS se describen en Melamed *et al.*, (1990) *Flow Cytometry and Sorting*, Wiley-Liss, Inc., New York, NY; Shapiro (1988) *Practical Flow Cytometry*, Liss, New York, NY; y Robinson *et al.*, (1993) *Handbook of Flow Cytometry Methods*, Wiley-Liss, New York, NY.

II. Clonación de p40 y/o IL-B30 humano

Las secuencias p40 de IL-12 están disponibles en varias bases de datos de secuencias, tal como se describió anteriormente. La secuencia del gen IL-B30 se proporcionan en la Tabla 1. La secuencia deriva de una secuencia humana genómica.

Estas secuencias permiten la preparación de los cebadores de PCR, o sondas, para determinar la distribución de los genes celulares. Las secuencias permiten el aislamiento del DNA genómico que codifica los mensajeros.

Usando la sonda o los cebadores de PCR, se sondan varios tejidos o tipos de células para determinar la distribución celular. Se clonan los productos de PCR usando, por ejemplo, un kit de clonación TA (Invitrogen). Los plásmidos resultantes de DNAC se secuencian desde ambos extremos en un secuenciador automático (Applied Biosystems).

III. Expresión celular de p40 y de IL-B30

Se prepara una sonda o cebadores apropiados específicos para DNAC que codifica los respectivos genes. Típicamente, la sonda se marca, por ejemplo, mediante cebado al azar. La expresión coordinada de ambas subunidades es la más importante cuando es de interés el complejo p40/IL-B30.

ES 2 300 276 T3

IV. Purificación de la proteína p40/IL-B30

Se escrutaron líneas de células transfectadas múltiples para la que expresa la citoquina o el complejo a un alto nivel en comparación con otras células. Alternativamente, puede prepararse una combinación de la construcción recombinante. Se escrutaron varias líneas de células y se seleccionaron por sus propiedades favorables de manipulación. El aislamiento individual de las respectivas subunidades y la combinación posterior puede dar como resultado cierta formación de dímeros. Puede aislarse la IL-B30 natural de fuentes naturales o mediante la expresión de una célula transformada usando un vector de expresión apropiado. También puede usarse construcciones de adenovirus para la producción/expresión.

La purificación de las subunidades expresadas o del complejo se logra mediante procedimientos estándares, o puede combinarse con medios de manipulación genética para una purificación eficaz con alta eficacia a partir de sobrenadantes o lisados de células. En particular, la fusión de p40 con IL-B30 con o sin fragmento enlazador apropiado puede dar como resultado métodos de alta eficacia para procesamiento o purificación. Pueden usarse segmentos FLAG o His₆ para dichos aspectos de purificación. Alternativamente, la cromatografía de afinidad puede usarse con anticuerpos específicos, véase más adelante

La proteína se produce en *E. coli*, células de insectos o sistemas de expresión de mamíferos, según se desee.

V. Preparación de anticuerpos específicos para p40/IL-B30

Se presentan péptidos sintéticos o proteínas purificadas para un sistema inmune para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véase, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Green; y Harlow and Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. La inmunoselección o los métodos de empobrecimiento pueden aplicarse para tener la seguridad de que los anticuerpos resultantes son específicos para los determinantes antigénicos presentados por el complejo de polipéptidos, distintos de los presentados por los propios componentes individuales. Puede prepararse suero policlonal o hibridomas. En situaciones apropiadas, el reactivo de unión está marcado tal como se describió anteriormente, por ejemplo, por fluorescencia o en otra forma, o bien está inmovilizado en un sustrato mediante métodos que usan una placa sensibilizada de plástico con antígeno o anticuerpo. La inmunoselección, immuno-empobrecimiento y las técnicas relacionadas están disponibles para preparar reactivos selectivos, según se desee, por ejemplo, para el complejo entre las dos subunidades.

VI. Coprecipitado de p40 de IL-12 y IL-B30

Se preparó una construcción de fusión p40 de IL-12-Ig de ratón en un vector de expresión. El dominio Ig se une a Proteína A, y puede precipitar este polipéptido. También se preparó una construcción IL-B30Etag (epítipo marcado con una cola (tag) de un resto de FLAG en el extremo N), cuyo polipéptido es inmunoprecipitable con el anticuerpo M2. Las construcciones de expresión fueron transfectadas en células 293 T, con la construcción p40 de IL-12-Ig sola, la construcción IL-B30Etag sola, o ambas conjuntamente. Las células fueron marcadas con ³⁵S-metionina. Con la construcción p40 de IL-12 sola, no se detectó proteína soluble en el sobrenadante de la célula usando proteína A. Análogamente, con la construcción FLAG-IL-B30, no se detectó ninguna proteína soluble en el sobrenadante de la célula usando el anticuerpo M2. Sin embargo, con la co-transfección de las dos construcciones de expresión, el sobrenadante de la célula produjo un complejo soluble el cual fue precipitable con el reactivo proteína A o con el anticuerpo M2. El análisis PAGE del complejo reveló que el complejo precipitado con proteína A estaba constituido por polipéptidos que correspondían a los dos polipéptidos esperados, el de la fusión p40 de IL-12-Ig y los polipéptidos FLAG-IL-B30. Correspondientemente, el complejo precipitado con el anticuerpo M2 estaba constituido por el polipéptido FLAG-IL-B30 y la proteína de fusión p40 de IL-12-Ig.

Experimentos similares con una construcción de expresión p40 de IL-12 humana y una construcción FLAG-IL-B30 humana proporcionaron los resultados esperados. La transfección con la construcción FLAG-IL-B30 no dio como resultado ninguna proteína soluble significativa. La co-transfección de ambos vectores de expresión en células primate dio como resultado una secreción eficaz de un complejo el cual fue inmunoprecipitable con el anticuerpo M2. El análisis PAGE del complejo resultante confirmó que el complejo estaba constituido por el polipéptido FLAG-IL-B30 y el polipéptido p40 de IL-12.

VII. Identificación del receptor

El receptor de IL-12 está constituido por las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ del receptor IL-12. Una construcción de fusión p40/IL-B30 se une a células que expresan la subunidad $\beta 1$ del receptor.

Un homodímero de las subunidades p40 de IL-12 puede bloquear la unión de IL-12 a la subunidad $\beta 1$ de ratón, pero no a la subunidad $\beta 2$. La subunidad p40 es un componente de complejo p40/IL-B30, de manera que se analiza si la subunidad $\beta 1$ del receptor IL-12 podría ser un componente del receptor para una construcción de fusión de p40/IL-B30. Los anticuerpos para la subunidad $\beta 1$ del receptor de IL-12 bloquean la unión de la construcción de fusión a células que expresan la subunidad $\beta 1$ del receptor. Los anticuerpos contra el complejo p40/p70, que reconocen principalmente la subunidad p40 pueden bloquear el efecto de la composición p40/IL-B30, lo cual sugiere que el componente p40 es importante en la interacción del receptor. Estas observaciones sugieren que la subunidad $\beta 1$ del receptor se une a la construcción de fusión p40/IL-B30. Experimentos similares que analizan la implicación de la subunidad gp130 común

compartida entre receptores relacionados sugieren que gp130 no es una subunidad relevante del receptor para p40/IL-B30.

5 Habiendo identificado una subunidad del receptor, han sido iniciados intentos de clonación con expresión. Las células que expresan esta subunidad pero que no muestran unión se usarán para la clonación de expresión de una subunidad adicional. Otros homólogos $\beta 2$ de la subunidad receptora están siendo escrutados. Alternativamente, pueden usarse genotecas de células apropiadas en métodos de clonación con expresión estándares.

VIII. Evaluación de la amplitud de las funciones biológicas

10 Se analizaron las actividades biológicas del complejo p40/IL-B30, basándose, por ejemplo, en la secuencia y homología estructural entre L-B30 y IL-6 y G-CSF. Inicialmente, se examinaron ensayos que habían mostrado actividades biológicas de IL-6 o G-CSF. Los ensayos se efectuaron en un complejo recombinante o en una construcción de fusión. La construcción de fusión consistía en una construcción con la secuencia señal de p40 de IL-12 unida a un epítipo FLAG N terminal fusionado con la secuencia p40 de IL-12 madura fusionada a su vez con una secuencia enlazadora rica en Ser/Gly de la longitud apropiada fusionada con la secuencia madura de IL-B30. Esta construcción expresa ambas bien, es secretada, y la cola de epítipo permite la purificación y la localización. Se generaron ambas formas de secuencia la de ratón y la de ser humano. Las construcciones de expresión de adenovirus de ambos polipéptidos separados y las proteínas de fusión también fueron asequibles.

20 Los tipos de célula diana incluyen tipos de células linfoides, mieloides, mastoides, pre-B, pre-T, y fibroblastos-endoteliales. Por ejemplo, las células de macrófago/monocito serán evaluadas para determinar los cambios de marcador de superficie de célula, por ejemplo MHC clase II, B7, CD40, y familias relacionadas; producción de citoquinas y quimioquinas; y capacidad de presentación de antígenos. Las células CD4 + T, tanto células CD45Rb^{alto} y naturales como las células CD45Rb^{bajo} T de memoria, fueron ensayadas, por ejemplo, para los marcadores de desarrollo y activación, y para las funciones efectoras, por ejemplo para la producción de citoquinas y quimioquinas. Las células citotóxicas CD4+, CD8+ y las células NK se evaluarán para determinar los efectos sobre la generación y función. Los efectos sobre la producción de anticuerpos se ensayarán, por ejemplo, en células B MLN y esplénicas. Se evaluarán las células dendríticas para la generación, maduración, y función, incluyendo la producción de factores. También se están desarrollando ensayos de apoptosis.

30 Los cultivos de médula ósea a largo plazo, se ensayarán para determinar los efectos sobre la modulación de células estromales y para la generación de células madres y la diferenciación (cultivos Dexter), para la modulación de células estromales y para la diferenciación y generación de células progenitoras B (Cultivos Whitlock-Witte), y para la evaluación del potencial para regular las poblaciones de linfoides B y de mieloides primitivas.

A. Efectos sobre la proliferación de células

40 El efecto sobre la proliferación de varios tipos de células se evaluó con varias concentraciones de citoquinas. Se efectuó un análisis de respuesta a la dosis, en combinaciones con las citoquinas relacionadas IL-6, G-CSF, etc. Puede usarse una máquina citosensora, que detecta el desarrollo y metabolismo de las células (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

45 La proteína de fusión humana p40/IL-B30 mejora la proliferación de los blastos PHA humanos estimulados con anti-CD3 o tanto con anti-CD3 como anti-CD28. La estimulación anti-CD3 parece ser esencial. La proteína de fusión humana p40/IL-B30 también potenció la proliferación de los clones de células Th1 o Th2 activados, pero no los clones de células Th1 o Th2 en reposo.

50 Cualquiera de las proteínas de fusión de ratón o humana, funcionará en las células diana de ratón. La proteína de fusión soportó la proliferación de células CD4+ CD4SRb^{bajo}CD62^{bajo} CD44^{alto} (células T de memoria/activadas), cuando fueron estimuladas con anti-CD3. La estimulación mediante la proteína de fusión no aumentó por coestimulación de anti-CD28. Esto no depende en gran manera de la presencia de IL-2. Esto sugiere que p40/IL-B30 puede ser un importante factor para expandir una población de células con un fenotipo de memoria y/o generar o mantener la memoria inmunológica. Esta citoquina parece soportar selectivamente las células de memoria activadas con un fenotipo Th1, por ejemplo, células que producen IFN, pero no IL4 o IL-5.

B. Efectos sobre la diferenciación de células T naturales

60 Se recogieron células de sangre de cordón humano y se aislaron células CD4+ T sin tratar. Estas fueron cultivadas, por ejemplo, durante dos semanas, en presencia de anti-CD3 y de IL-2 y con fibroblastos irradiados que expresan CD32, CD58, y CD80, activando de esta manera y proliferando las células T. El cultivo de células T se evaluó para determinar los efectos de varias citoquinas sobre la proliferación o diferenciación. Se evaluaron las células individuales para la producción de citoquinas mediante análisis FACS. La proteína de fusión p40/IL-B30 soportó la proliferación y diferenciación de células T productoras de IFN γ y no de IL-4, un perfil de expresión de citoquina característico de las células Th1.

ES 2 300 276 T3

C. Efectos sobre la expresión de moléculas en la superficie de células

Los monocitos se purifican por selección negativa de células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos normales. Resumiendo, 3×10^8 de células mononucleares dispuestas en banda con Ficoll se incubaron en hielo con un cóctel de anticuerpos monoclonales (Becton-Dickinson; Mountain View, CA) que consistían, por ejemplo en $200 \mu\text{l}$ de αCD2 (Leu-5A), $200 \mu\text{l}$ de αCD3 (Leu-4), $100 \mu\text{l}$ de αCD8 (Leu2a), $100 \mu\text{l}$ de αCD19 (Leu-12), $100 \mu\text{l}$ de αCD20 (Leu-16), $100 \mu\text{l}$ de αCD56 (Leu-19), $100 \mu\text{l}$ de αCD67 ; (IOM 67; Immunotech, Westbrook, ME), y anticuerpo anti-glicoforina (10F7MN, ATCC, Rockville, MD). Las células unidas al anticuerpo se lavaron y luego se incubaron con bolitas magnéticas acopladas a IgG anti-ratón de oveja (Dynal, Oslo, Noruega) en una relación de bolita a célula de 20:1. Las células unidas a los anticuerpos se separaron de los monocitos por aplicación de un campo magnético. Subsiguientemente, se cultivaron los monocitos humanos en un medio de Yssel (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) que contenía 1% de AB humano en ausencia o en presencia de IL-B30, IL-6, G-CSF o sus combinaciones.

Los análisis de la expresión de moléculas en la superficie de células pueden efectuarse por inmunofluorescencia directa. Por ejemplo, 2×10^5 monocitos humanos purificados se incubaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 1% de suero humano en hielo durante 20 minutos. Las células se sedimentaron a $200 \times g$. Las células se resuspendieron en 20 ml de mAb marcado con PE o FITC. Después de una incubación adicional de 20 minutos en hielo, las células se lavaron en PBS que contenía 1% de suero humano seguido de dos lavados con PBS solo. Las células se fijaron en PBS que contenía 1% de paraformaldehído y se analizaron en un citómetro de flujo FACScan Dickinson, Mountain View, CA). Se usaron anticuerpos monoclonales ilustrativos, por ejemplo: CD11b (anti-mac 1), CD11c (agp 150/95), CD14 (Leu-Me), CD54 (Leu 54), CD80 (anti-BB1/B7), HLA-DR (L243) de Becton-Dickinson y CD86 (FUN 1; Pharmingen), CD64 (32.2. Medarex), CD40 (mAb89; Schering-Plough France).

D. Efectos sobre la producción de citoquina por células humanas

Se aislaron monocitos humanos tal como se describió y se cultivaron en un medio de Yssel (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) que contenía suero de AB humano al 1% en ausencia a presencia de IL-B30 (material expresado en baculovirus con dilución 1/100). Además, los monocitos se estimularon con LPS (*E. coli* 0127:B8 Difco) en ausencia o en presencia de IL-B30 y la concentración de las citoquinas (IL-1 β , IL-6, TNF α , GM-CSF, y IL-10) en el sobrenadante del cultivos de células determinada por ELISA.

Para la tinción intracitoplásmica para citoquinas, se cultivaron monocitos (1 millón/ml) en un medio de Yssel en ausencia o en presencia de IL-B30 y LPS (*E. coli* 0127:B8 Difco) y 10 mg/ml de Brefeldin A (Epicentre Technologies Madison WI) durante 12 horas. Se lavaron las células en PBS y se incubaron en una solución al 2% de formaldehído/PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Subsiguientemente se lavaron las células, se resuspendieron en tampón de permeabilización (saponina al 0,5% (Sigma) en PBS/BSA (0,5%)/Azida (1 mM)) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células (2×10^5) se centrifugaron y resuspendieron en 20 ml de anticuerpos monoclonales anti-citoquinas directamente conjugados diluidos 1:10 en solución tampón de permeabilización durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pueden usarse los siguientes anticuerpos: IL-1 α -PE (364-3B3-14); IL-6-PE (MQ2-13A5); TFN-PE (MAb11); GM-CSF-PE (BVD2-21C11); e IL-12-PE (C11.5.14; Pharmingen San Diego, CA). Subsiguientemente, se lavaron las células dos veces en tampón de permeabilización y una vez en PBS/BSA/Azida y se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Dickinson, Mountain View, CA).

Los blastos PHA humanos produjeron IFN γ en respuesta al contacto con la construcción de fusión p40/IL-B30 humana. Los efectos fueran sinérgicos con IL-2. El producto de fusión mejoró la producción de IFN γ mediante células T activadas, pero no en reposo, clones de células Th1 en reposo, o clones Th2 en reposo.

E. Efectos sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)

Se aisló PBMC total a partir de capas superficiales de coágulos de plasma de donantes sanos normales por centrifugación a través de Ficoll-Hypaque descrito por (Boym *et al.*). Las PBMC se cultivaron en $200 \mu\text{l}$ de medio de Yssel (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) que contenía suero con 1% de AB humano en placas de 96 pocillos (Falcon, Becton-Dickinson, NJ) en ausencia o en presencia de IL-30. Se cultivaron células en un medio solo o en combinación con 100U/ml de IL-2 (R&D Systems) durante 120 horas. Se añadió ^3H -timidina (0,1 mCi) durante las últimas seis horas de cultivo y se determinó la incorporación de ^3H -timidina mediante recuento por centelleo de líquido.

Las proteínas naturales, recombinantes y de fusión se ensayaron para determinar la actividad agonista y antagonista en mucho otros sistemas de ensayo biológicos, por ejemplo, en células T, células B, NK, macrófagos, células dendríticas, progenitores hematopoyéticos, etc. Debido a la relación estructural de IL-6 y G-CSF, los ensayos relacionados con dichas actividades deben ser analizados.

Se evaluó p40/IL-B30 para determinar la actividad agonista y antagonista sobre las células transfectadas que expresaban el receptor de IL-6 o G-CSF y los controles. Véase, por ejemplo, Ho *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11267-11271; Ho *et al.*, (1995) *Mol. Cell. Bol.* 15:5043-5053; y Liu *et al.*, (1994). *J. Immunol.* 152:1821-1829.

Se evaluó p40/IL-B30 para determinar el efecto en la activación de células macrófagos/dendríticas y en los ensayos de presentación de antígenos, en la producción de citoquinas de células T y en la proliferación en respuesta a los

ES 2 300 276 T3

estímulos antigénicos o alogénicos. Véase por ejemplo, Waal Malefy *et al.*, (1991) *J. Exp. Med.* 174:1209-1220; de Waal Malefy *et al.*, (1991) *J. Exp. Med.* 174:915-924; Fiorentino *et al.*, (1991) *J. Immunol.* 147, 3815-3822; Fiorentino *et al.*, (1991) *J. Immunol.* 146:3444-3451; y Groux *et al.*, (1996) *J. Exp. Med.* 184:19-29.

5 También se evaluó p40/IL-B30 para determinar los efectos sobre la estimulación de las células NK. Los ensayos pueden basarse, por ejemplo, en Hsu *et al.*, (1992) *Internat. Immunol.* 4:563-569; y Schwarz *et al.*, (1994) *J. Immunother* 16:95-104.

10 Los efectos de diferenciación y desarrollo de células B se analizarán, por ejemplo, mediante la metodología descrita, por ejemplo, en DeFrance *et al.*, (1992). *J. Exp. Med.* 175:671-682; Rousset *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:1890-1893; incluyendo los ensayos del factor de cambio IgG2 e IgA2.

IX. Generación y análisis de animales genéticamente alterados

15 Pueden generarse ratones transgénicos por métodos convencionales. Dichos animales son útiles para determinar los efectos de la sobreexpresión de los genes en tejidos específicos o completamente a través el organismo. Pueden proporcionar interesantes puntos de vista en el desarrollo de los tejidos particulares o de animales en varias etapas. Además, puede evaluarse el efecto sobre varias respuestas al estrés biológico. Véase, por ejemplo, Hogan *et al.*, (1995) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (2d ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

20 Se encuentran disponibles técnicas de adenovirus para la expresión de los genes en varias células y órganos. Véase por ejemplo, Hitt *et al.*, (1997) *Adv. Pharmacol.* 40:137-195; y textos de Quantum Biotechnologies, Montreal, Canadá. Los animales pueden ser útiles para determinar los efectos de los genes sobre varios sistemas de animales en lo que respecta al desarrollo o las funciones fisiológicas.

25 El ejemplo siguiente cae fuera del alcance de las reivindicaciones anexas, pero se da como información fundamental relevante.

30 Un cDNA de 0,5kb que codifica IL-B30 se clonó como un fragmento de EcoRI en un vector de expresión que contenía el promotor de β -actina del mejorador de CMV y la señal de poliadenilación de β -globina de conejo, previamente descrita por Niwa *et al.*, (1991) *Gene* 108:193-200. La separación del transgen de la secuencia vectora se llevó a cabo mediante centrifugación zonal en gradiente de sacarosa, tal como fue descrita por Mann *et al.*, (1993) *"Factor Influencing Production Frequency of Transgenic Mice"*, *Methods in Enzymology* 225:771-781 Se reunieron las fracciones que contenía el transgen, se efectuó microcentrifugación a través de filtros Microcon-100 y se lavó 5 veces con solución tampón de microinyección (Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, NaCl 5 mM, EDTA 0,1 mM).

35 El transgen se resuspendió en el tampón de microinyección (Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, NaCl 5 mM, EDTA 0,1 mM) hasta una concentración final de 1-5 ng/ml, se microinyectó en óvulos ([C57BL/6J x DBN2]F₁; The Jackson Laboratory), que luego fueron transferidos a oviductos de madres sustitutas ICR (Sprague-Dawley), de acuerdo con los procedimientos publicados por Hogan *et al.*, (1994) *Manipulation of the Mouse Embryo*, Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. A los 10 días de vida, se pinzó un trozo de la cola de los animales resultantes para análisis de DNA. La identificación de los fundadores transgénicos se llevó a cabo mediante análisis por reacción en cadena de polimerasa (PCR) tal como ha sido previamente descrito por Lira *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:7215-7219. La identificación de ratones transgénicos con IL-B30 se llevó a cabo mediante amplificación del DNA de cola de ratón. Se usaron cebadores como control interno para la reacción de amplificación para el gen LDL endógeno. Los cebadores amplifican un segmento de 200bp del transgen IL-B30 y un segmento de 397bp del gen LDL. Las condiciones de PCR fueron: 95°C, 30 segundo, 60°C, 30 segundos; 72°C, 60 segundos para 30 ciclos. Los animales transgénicos se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos.

50 *Análisis de ratones transgénicos IL-B30*

55 Se extrajo RNA de tejidos usando RNA STAT-60, siguiendo las especificaciones el fabricante (TEL-TEST, Inc. Friedswood, TX). El RNA total (20 μ g) se desnaturalizó y se transfirió a una membrana Biotrans (ICN Biomedicals Costra Mesa, CA). Se determinó la expresión transgénica por hibridación con cDNA de L-30 marcado al azar (Stratagene, La Jolla, CA). La expresión del gen de hígado en fase aguda expresado se determinó mediante hibridación del RNA total con segmentos de PCR marcados al azar del gen de hemopexina de múridos, de glicoproteína alfa-1-ácido de múridos y el gen de haptoglobina de múridos.

60 Se adquirieron kits ELISA de fuentes comerciales y se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los kits ELISA para IL-2 de múridos (sensibilidad < 3 pg/ml), IL-1b de múridos (sensibilidad < 3 pg/ml), IFN-gamma de múridos (sensibilidad < 2 pg/ml) y TNF-alfa de múridos (sensibilidad < 5,1 pg/ml) se adquirieron a R & D Sytems (Minneapolis, MN). Los kits ELISA para IL-6 de múridos (sensibilidad < 8 pg/ml) se adquirieron a Biosource International (Camarillo, CA). Los kits ELISA para IL-1 α de múridos (sensibilidad < 6 pg/ml) se adquirieron a Endogen (Cambridge, MA).

65 Los ensayos ELISA para determinar los niveles de inmunoglobulina del suero se llevaron a cabo usando pares de anticuerpos adquiridos a PharMingen (San Diego, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron como anticuerpos de captura IgM anti-ratón (clon 11/41), IgA anti-ratón (clon R5-140), IgG1 anti-ratón (clon A85-3), IgG2a

ES 2 300 276 T3

anti-ratón (clon R11-89) e IgG2b anti-ratón (clon R9-91). Se usaron IgM de ratón (clon G155-228), IgA (clon M18-254), IgG1 (clon 107.3), IgG2a (clon G155-178) e IgG2b (clon 49.2) purificadas para generar curvas patrones. Se usaron como anticuerpos de detección IgM anti-ratón de biotina (clon R6-60.2), IgA anti-ratón de biotina (clon R5-140), IgG1 anti-ratón de biotina (clon A85-1), IgG2a anti-ratón de biotina (clon R19-15) e IgG2b anti-ratón de biotina (clon R12-3).

Los niveles de IGF-1 en suero de ratón se determinaron usando un radioinmunoensayo comercialmente obtenible para IGF-1 humano que reconoce también IGF-1 de muridos después de que se extrajeran las muestras de suero con ácido-etanol de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el fabricante (Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA).

Después del sacrificio, los tejidos fueron congelados instantáneamente con medios congelantes para criosección, o bien se fijaron por inmersión en formalina tamponada con fosfato al 10%. Los tejidos fijados con formalina se procesaron rutinariamente a 5 mm, y luego se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E). Para la inmunotinción las secciones instantáneamente congeladas se fijaron con acetona y se secaron al aire.

Se recogieron muestras de sangre del seno infra-orbital en tubos esterilizados al vacío con EDTA añadido (Vacutainer Systems, Becton Dickinson, Rutherford, NJ). Los valores hematológicos se determinaron con un sistema automático (Abbot Cell-Dyn 3500, Abbot Park, IL). Se efectuaron recuentos de plaquetas manualmente cuando el instrumento no pudo proporcionar recuentos de plaquetas exactos debido a un excesivo agrupamiento o a plaquetas excesivamente grandes. Frotis de sangre se tiñeron con colorante de Wright-Giemsa modificado (Hema-Tk Stain Pack, Bayer Corp., Elkhart, IN) usando una dispositivo de tinción automático (Bayer Hema-Tek 2000, Elkhart, IN) y se examinaron manualmente para determinar la morfología de células inmaduras y plaquetas, glóbulos rojos y glóbulos blancos.

Transferencia de médula ósea

Se limpiaron el fémur y la tibia de músculo y se expulsó la médula ósea haciendo circular PBS sobre el hueso. Las células de médula ósea se lavaron una vez, y se inyectaron i.v. en ratones receptores que habían sido letalmente irradiados (1000 RAD).

Fenotipo de ratones transgénicos con IL-B30

Para analizar la función biológica de IL-30, el gen se expresó bajo el control del potenciador de CMV/promotor de actina, descrito por Niwa *et al.*, (1991) *Gen* 108:193-200, en ratones transgénicos. Este casete de potenciador/promotor dirige altos niveles de expresión transgénica principalmente al músculo esquelético y al páncreas, pero el transgen puede expresarse en virtualmente en todos los órganos y células. Véase Lira *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7215-7219.

Los ratones transgénicos con IL-B30 eran enanos en comparación con los de la misma camada de control. La tasa de ganancia de peso del cuerpo en los ratones transgénicos con IL-B30 varió ampliamente pero fue claramente inferior a la que se encontró en los de la camada de control. El análisis por transferencia Northern de RNA extraído de cualquier músculo o piel de ratones transgénicos con IL-B30 y el de los de la camada de control hibridado a cDNA de IL-B30, reveló que el mRNA de IL-B30 se detectó tanto en el músculo como en la piel de todo los ratones transgénicos con IL-B30, mientras que no se detectó mRNA de IL-B30 en sus compañeros de la camada de control. Esto demuestra que el desarrollo atrofiado estaba siempre asociado con la expresión de IL-B30.

De los ratones transgénicos con IL-B30 obtenidos, 25% sobrevivieron hasta la adultez y fueron afectados por la expresión de IL-B30 ya que exhibieron un deterioro del crecimiento, un abdomen hinchado, piel arrugada, infertilidad y muerte súbita. Por lo tanto, la expresión transgénica de IL-30 causó un fenotipo que evitó la generación de progenie transgénica de IL-B30. Los resultados presentados aquí derivan del análisis preliminar de los ratones fundadores transgénicos con IL-B30.

Análisis histológico de ratones transgénicos con IL-B30

El examen microscópico de tejidos recogidos de ratones transgénicos con IL-B30 reveló una inflamación que va de mínima a moderada en múltiples sitios, incluyendo pulmones, piel, esófago, intestino delgado e hígado (conductos biliares), intestino grueso, y páncreas. Los infiltrados inflamatorios consistían en neutrófilos, linfocitos y/o macrófagos. La inflamación en la piel estaba asociada con acantosis y/o ulceración en algunos ratones. En los pulmones, los infiltrados de células mononucleares peribronquiales eran algunas veces prominentes, las paredes alveolares contenían cantidades crecientes de leucocitos y el revestimiento epitelial de las vías respiratorias era hiperplástico. También eran comunes en el hígado infiltrado de células mononucleares periportales mínimas. La corteza de los nódulos linfáticos eran algunas veces escasamente celular y carecía de desarrollo folicular.

Se observó hematopoyesis extramedular (EMH) en el hígado, bazo, y nódulos linfáticos. La EMH estaba especialmente marcada en el bazo. Los bazos de tres ratones transgénicos y un ratón de control fueron examinados después de tinción inmunohistológica para las células T (anti-CD3), células B (anti-B220), y macrófagos (anti-F4/80). En los ratones transgénicos, las células positivas CD3-, B220-, y F4/80- estaban presentes en sus lugares normales. Sin em-

bargo, se separó la pulpa blanca mediante EMH en la pulpa roja y las células que se tiñeron positivamente dentro de la pulpa roja estaban interdispersadas con células hematopoyéticas que se tiñeron con menos intensidad, o que no se tiñeron positivamente, con los diversos anticuerpos. Estas observaciones demuestran que la expresión transgénica de IL-B30 induce a una inflamación sistémica que está asociada con EMH.

Para analizar el efecto de IL-B30 sobre los recuentos de plaquetas y leucocitos en la sangre periférica, se efectuó un análisis de sangre completa. El número de neutrófilos en la sangre de los ratones transgénicos con IL-B30 se aumentó de 3 a 11 veces sobre el recuento más elevados de neutrófilos en los compañeros de la camada de control. Los aumentos de neutrófilos en sangre periféricas son típicos de la inflamación y están correlacionados con la infiltración de neutrófilos observada en varios tejidos. Por consiguiente, la relación de mielóide (granulocítica)/eritroide se aumentó en la médula ósea.

Además, aumentó la cantidad de plaquetas circulantes hasta tres veces en los ratones transgénicos con IL-B30 con respecto a la camada de control. Un número aumentado de plaquetas podría originarse a partir de cualquier número aumento de megacariocitos o un aumento en la producción de plaquetas por los megacariocitos. Para ensayar cualquiera de estas posibilidades, se analizaron microscópicamente la sangre periférica, la médula ósea y el bazo de ratones transgénicos con IL-B30. En la sangre periférica, frecuentemente se detectaron plaquetas de morfología extraña, incluyendo plaquetas de forma alargada y en forma de huso. En la médula ósea y el bazo de algunos ratones los megacariocitos estaban ensancharon debido a cantidades crecientes de citoplasma. En contraste, no aumentó el número de megacariocitos, en la médula ósea y en el bazo. Esto sugiere que la IL-B30 induce un aumento en el número de plaquetas acelerando su producción por megacariocitos.

Todos los ratones transgénicos con IL-B30 examinados sufrían también anemia hipocrómica microcítica que iba desde suave a moderada, con esquistocitos y varios grados de regeneración evidente. Los valores del hematocrito fueron inferiores al valor medio de control en 36 a 70%. La presencia de anemia hipocrómica microcítica sugiere un defecto en la producción de hemoglobina.

Perfil de citoquina de ratones transgénicos con IL-B30

Para analizar si la inflamación sistémica observada en los ratones transgénicos con IL-B30 está correlacionada con la expresión alterada de las citoquinas pro-inflamatorias, los autores de la invención han determinado las concentraciones de IL-1, TNF- α , IL-6 y IFN γ en la sangre periférica. En todos los ratones transgénicos con IL-B30 ensayados, aumentaron los niveles de TNF- α y IFN- γ . Además, aumentó el nivel de IL-1 en 25% de los ratones transgénicos con IL-B30 ensayados. Las concentraciones de IL-1 y TNF- α encontradas en los ratones transgénicos con IL-B30 alcanzaron niveles asociados con la inducción de una respuesta inflamatoria aguda por LPS. Sorprendentemente, no se detectó IL-6 en la sangre periférica de ratones transgénicos IL-B30, incluso a pesar de que la expresión IL-6 está muy inducida en estados inflamatorios (Reinecker *et al.*, (1993) *Clin. Exp. Immunology*, 94: 174-181; Stevens *et al.*, (1992) *Dig. Dis. Sci.* 37: 818-826) y pueden ser inducida directamente por TNF- α , IL-1 y IFN γ (Helle *et al.*, (1988) *Eur. J. Immunol.* 18: 957-959).

Genes en fase aguda en los hígados de ratones transgénicos con IL-B30

El cuerpo reacciona a la inflamación con una respuesta en fase aguda caracterizada por la expresión de proteínas plasmáticas definidas en el hígado. Debido a que los ratones transgénicos con IL-B30 exhiben un fenotipo característico de la inflamación sistémica, los autores del invento han examinado la expresión de genes en fase aguda en los hígados de ratones transgénicos con IL-B30 y en camadas de control. Los genes del hígado en fase aguda de alfa-1-ácido glicoproteína, haptoglobina y hemopexina estaban altamente expresados en todos los ratones transgénicos con IL-B30 ensayados, mientras que no se detectó ninguna expresión en las camadas de control. Esto demostró que los genes de hígado en fase agua estaban constitutivamente expresados en los animales transgénicos con IL-B30.

Inmunoglobulinas del suero de ratones transgénicos con IL-B30

Durante una respuesta inmune, algunas citoquinas inducen la diferenciación de células B y la subsiguiente síntesis de inmunoglobulinas. Para analizar si la síntesis de inmunoglobulina se alteraba en los ratones transgénicos con IL-B30, se determinaron las concentraciones de los isotipos de inmunoglobulina en la sangre periférica. En 2 de 7 ratones transgénicos con IL-B30, aumentó la concentración de IgA de 6 a 9 veces cuando se comparó con las camadas de control. Además, aumentaron las concentraciones de IgG1, IgG2a y IgG2b de 2,5 a 6 veces en todos los ratones transgénicos con IL-B30 cuando se compararon con las camadas de control. En contraste, no pudo detectarse ningún aumento significativo en los títulos de IgM o IgE en cualquiera de los ratones transgénicos con IL-B30 analizados. En realidad, 4 de 7 ratones con IL-B30 transgénicos exhibieron niveles marcadamente disminuidos de síntesis de IgM. Resumiendo, un subgrupo de ratones transgénicos con IL-B30 exhibió un aumento de 6 a 9 veces la concentración de los isotipos IgA e IgG, de inmunoglobulina, mientras que no se detectó ningún aumento significativo en las concentraciones de los isotipos de inmunoglobulina IgM e IgE.

Niveles de IGF-1 en el suero en ratones transgénicos con IL-B30

Los estados inflamatorios crónicos (Kirschner y Sutton (1986) *Gastroenterology*, 91:830-836; Laursen *et al.*, (1995) *Arch. Dis. Child.* 72: 494-497) o la sobreexpresión de las citoquinas en animales transgénicos (De Benedetti *et*

al., (1994) *J. Clin. Invest.* 93: 2114-2119) pueden causar un deterioro del desarrollo que está asociado con una disminución del factor de crecimiento 1 de tipo insulina (IGF-1). Para analizar si el desarrollo atrofiado del ratón transgénico con IL-B30 podría ser escrutado a niveles reducidos de IGF-1, se analizaron muestras de suero de ratones transgénicos para determinar los niveles de IGF-1. En todos los ratones transgénicos con IL-B30 analizados, la cantidad de IGF-1 en el suero fue 12 a 14% del nivel que se encontró en los compañeros de camada de control de igual edad. Estos sugiere que la expresión transgénica de IL-B30, así como también la subsiguiente respuesta inflamatoria producida da como resultado la reducción de IGF-1 en ratones transgénicos con IL-B30, y que podría consecuentemente ser la causa de desarrollo deteriorado e infertilidad (Gay *et al.*, (1997) *Endocrinology*, 137(7):2937-2947).

10 *Expresión de IL-30 biológicamente activa en células hematopoyéticas*

Las citoquinas son proteínas secretadas que regulan el sistema inmune localmente o median los efectos a largo plazo. Para determinar si la IL-B30 funciona como una citoquina, y puede inducir inflamación multi-orgánica distante y una respuesta en fase aguda en el hígado, los autores de la invención transfirieron médula ósea de ratones transgénicos con IL-B30 a ratones receptores de tipo natural letalmente irradiados.

Los receptores de médula ósea fueron monitorizados semanalmente para determinar la inducción de una respuesta en fase aguda. El aumento de las concentraciones de la proteína amiloide asociada al suero (abreviadamente en lo sucesivo SAA por la expresión inglesa *Serum Amyloid-Associated*) en fase aguda pudo detectarse en los ratones receptores de médula ósea con IL-B30 tan pronto como a los 35 días después de la transferencia y los niveles de SAA aumentaron a lo largo del tiempo. Concurrentemente con el aumento de las concentraciones de SAA en la sangre periférica se deterioró la salud de los ratones receptores de médula ósea con IL-B30 a juzgar por la aparición de la piel arrugada e inflamada alrededor del hocico y el cuello. En contraste, los ratones receptores de médula ósea de tipo natural no mostraron niveles elevados de SAA en la sangre ni parecían enfermos.

Los animales fueron sacrificados cuando parecían gravemente enfermos. Pudo detectarse la expresión de IL-B30 en la médula ósea y en el bazo de los receptores de médula ósea transgénicos con IL-B30, pero no en los órganos de los receptores de médula ósea de tipo natural. Como en los donantes transgénicos con IL-B30, la piel, los pulmones, el hígado y el tracto gastrointestinal estaban inflamados en los receptores de médula ósea transgénicos con IL-B30, pero no en los receptores de médula ósea de tipo natural. Nuevamente, los genes del hígado en fase aguda (hemopexina, AGP-1) estaban altamente expresados en los receptores de médula ósea transgénicos con IL-B30, pero no pudo detectarse IL-6 en el suero sanguíneo. Estos resultados sugieren que IL-B30 es una verdadera citoquina con propiedades de largo alcance.

La expresión transgénica de IL-B30 induce un sorprendente fenotipo caracterizado por arrugas, inflamación sistémica, infertilidad y muerte de los animales transgénicos. Los animales transgénicos con IL-B30 tienen inflamación sistémica con infiltración de células inflamatorias en los pulmones, hígado, piel, y tracto digestivo.

La sobreexpresión de IL-B30 *in vivo* causó un fenotipo de desarrollo deteriorado e inflamación - que fue sorprendentemente similar al de varios modelos de expresión transgénica de IL-6. De manera similar al efecto de la expresión transgénica de IL-6, o después de la administración de IL-6 recombinante a ratones, se observó infiltración de neutrófilos y anemia como resultado de la expresión transgénica de IL-B30. Tal como en los animales transgénicos IL-6, el desarrollo deteriorado de los fundadores transgénicos con IL-B30 está asociado a niveles disminuidos de IGF-1 que podrían estar relacionados con la inflamación sistémica observada en estos animales.

Este fenotipo de los animales transgénicos con IL-B30 podría ser causado por la expresión de IL-6 regulada ascendentemente ya sea como efecto directo de la sobreexpresión de IL-B30, o bien mediante la regulación ascendente mediada por IL-B30 de IL-1 y la expresión de TNF α . IL-1 y TNF α son inductores conocidos de IL-1 y el aumento de concentración de TNF- α y de IL-1 se encontró en la sangre periférica de ratones transgénicos con IL-30.

Sin embargo, no pudo detectarse IL-6 en la sangre de animales transgénicos con IL-B30 lo cual sugiere que el fenotipo de los animales con IL-B30 está asociado directamente a la sobreexpresión de esta nueva citoquina y, puesto que había estado implicada por sus homologías de secuencia, la IL-B30 tiene actividades biológicas similares a IL-6.

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que entre una amplia variedad de funciones induce trombocitosis, síntesis de proteínas en fase aguda y diferenciación de células B.

En realidad, los animales transgénicos con IL-B30 expresan constitutivamente genes hepáticos en fase aguda tal como ACP-1, haptoglobina, hemopexina y proteína A amiloide del suero. Se ha mostrado un fenotipo similar en ratones como efecto de la sobreexpresión transgénica de IL-6, o después de la administración de IL-6 recombinante. Además la expresión transgénica de IL-B30 dio como resultado trombocitosis que era inusual porque muchas de las plaquetas tenían morfología extraña (aparición alargada, tamaño grande, y/o formas de huso). Los autores de la invención sospechan que la IL-B30 y/o otras citoquinas reguladas ascendentemente tienen un efecto sobre la producción normal de plaquetas. Esto sugiere nuevamente que IL-B30 comparte una actividad biológica con IL-6 y sus similares.

La IL-6 ha sido también identificada como un factor de diferenciación de células B. La sobreexpresión transgénica de IL-6 causa plasmocitoma y los ratones deficientes en IL-6 muestran una respuesta a IgG reducida. Aunque se ha observado aumentos en la producción de IgG e IgA en algunos ratones transgénicos con IL-B30, esta observación no

coincide entre diferentes fundadores. Por lo tanto es necesario un análisis adicional para caracterizar adicionalmente IL-B30 como potencial factor de diferenciación de células B.

5 En ratones transgénicos con IL-B30 los aumentos en los neutrófilos circulantes eran consistentes con la evidente inflamación en varios tejidos, pero sin embargo, los cambios en los parámetros de glóbulos rojos no pueden explicarse fácilmente. IL-1, TNF-alfa e IFN-gama son mediadores de un síndrome comúnmente denominado anemia de enfermedad crónica (abreviadamente ACD por la expresión inglesa *Anemia of Chronic Disease*), que generalmente se presenta como una anemia normocítica, normocrónica, no regenerativa (o mínimamente regenerativa), y que se observa en una variedad de enfermedades inflamatorias crónicas. La anemia de enfermedad crónica puede estar presente también en 10 forma microcítica, hipocrómica en algunos pacientes humanos. El síndrome se debe a un metabolismo alterado del hierro y a una respuesta disminuida a la eritropoyetina. La anemia hipocrómica microcítica observada en ratones con IL-B30 puede deberse a ACD, según se sugiere por los aumentos de concentraciones periféricas de citoquinas. Sin embargo, la causa más común de la anemia hipocrómica microcítica es la deficiencia de hierro, que es más consistente con la respuesta parcial de la médula ósea (regeneración) y trombocitosis que se observa en ratones con IL-B30. Una 15 investigación adicional, incluyendo la medición de ferritina en suero, hierro, y capacidad total de unión del hierro que hubiera permitido la diferenciación de ACD de la anemia con deficiencia del hierro, no se llevó a cabo debido a las dificultades para obtener sangre adecuada en los ratones afectados.

20 Se sabe que la IL-1 y el TNF-alfa son inductores conocidos de la expresión de IL-6 y la expresión de IL-6 está usualmente regulada ascendentemente durante una respuesta inflamatoria. Por lo tanto es sorprendente que IL-6 no pudiera ser detectada en la sangre periférica de animales transgénicos con IL-B30. Esto sugiere que la IL-B30 tiene un efecto negativo sobre la expresión de IL-6 mediante un mecanismo todavía no identificado. En realidad, la ausencia de IL-6 en animales transgénicos con IL-B30 podría explicar los altos niveles de IL-1 y de TNF-alfa observados en 25 estos animales puesto que la IL-6 tiene un efecto negativo sobre las concentraciones de IL-1 y TNF-alfa circulantes en ratones. Las altas concentraciones de TNF-alfa circulantes observadas en ratones transgénicos con IL-B30 podrían ser también un resultado del aumento de las concentraciones de IFN-gamma. La IFN-gamma es producida por las células T activadas por IL-2 o células B activadas por IL-4, e induce la expresión TNF-alfa en monocitos y macrófagos. Sigue pendiente de ser determinada si la expresión de IFN-gamma está mediada directamente por IL-B30 o por 30 otras citoquinas inducidas por IL-B30. Resumiendo, los resultados obtenidos por los autores de la presente invención sugieren que la IL-B30 comparte una amplia variedad de actividades biológicas con la IL-6. Falta por ver si estas actividades biológicas están mediadas por un receptor común, un elemento de transducción de señales o un factor de transcripción compartido con IL-6. Esperamos que estos fenómenos puedan clarificarse mediante experimentos que se lleven a cabo usando métodos genéticos y bioquímicos.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un complejo de:
- 5 i) un polipéptido p40 de IL-12 humana, maduro y sustancialmente puro.
- ii) un polipéptido de la SEQ ID NO:2 maduro y sustancialmente puro.
2. La composición de la reivindicación 1, que:
- 10 a) comprende además un vehículo seleccionado de un compuesto acuoso, que incluye agua, solución salina, y/o tampón;
- 15 b) está formulada para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral; o
- c) es estéril.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde al menos un polipéptido:
- 20 i) está marcado detectablemente;
- ii) es producido recombinantemente;
- 25 iii) no está glucosilado;
- iv) está desnaturalizado;
- v) está unido a un sustrato sólido; o
- 30 vi) está conjugado a otro resto químico.
4. La composición de la reivindicación 1, que comprende además:
- 35 a) IL-18;
- b) IL-12;
- c) un agente terapéutico para radiación o quimioterapia;
- 40 d) un coadyuvante inmune; o
- e) un agente terapéutico anti-viral.
- 45 5. Un ácido nucleico recombinante que codifica la composición de la reivindicación 1.
6. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 5, que:
- 50 a) es un vector de expresión;
- b) comprende además un origen de replicación;
- c) comprende un marcador detectable;
- 55 d) comprende un nucleótido sintético; o
- e) es menor de 6 kb, preferiblemente menor de 3 kb.
7. Un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión que se une específicamente a una composición de la reivindicación 1, pero no a un polipéptido p40 de IL-12 humana maduro.
- 60 8. Una composición que comprende el anticuerpo o su fragmento de unión de la reivindicación 7 y:
- a) un antagonista de TNF- α ;
- 65 b) un antagonista de IL-12;

ES 2 300 276 T3

- c) IL-10; o
- d) un esteroide.

5 9. El anticuerpo o su fragmento de unión de la reivindicación 7, que:

- a) es un fragmento Fv, Fab o F(ab)₂;
- 10 b) está conjugado a otro resto químico;
- c) es un anticuerpo policlonal;
- d) exhibe una Kd para el antígeno de por lo menos 30 mM;
- 15 e) está unido a un sustrato sólido, que incluye una bolita o una membrana de plástico;
- f) está en una composición estéril;
- 20 g) está marcado detectablemente, incluyendo un marcador fluorescente o radiactivo;
- h) es un anticuerpo monoclonal;
- i) es un anticuerpo quimérico;
- 25 j) es un anticuerpo humanizado;
- k) es un anticuerpo neutralizante;
- 30 l) está en una composición que comprende además un vehículo seleccionado de un compuesto acuoso que comprende agua, solución salina; y/o tampón; o
- m) está en una composición formulada para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral.

35 10. El uso de una composición de la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para modular una respuesta inflamatoria.

11. El uso de la reivindicación 10, en donde la respuesta inflamatoria es una respuesta inflamatoria en fase aguda.

40 12. El uso de la reivindicación 11, en donde la respuesta inflamatoria en fase aguda se encuentra en tejido de la piel; tejido pulmonar; tejido gastrointestinal, o tejido hepático.

13. El uso de la reivindicación 10, en donde el medicamento está en combinación con:

- 45 a) un agonista o antagonista de citoquina anti-inflamatoria;
- b) un analgésico;
- c) un agente anti-inflamatorio; o
- 50 d) un esteroide.

14. El uso del anticuerpo o su fragmento de unión de la reivindicación 7, en la fabricación de un medicamento para modular la fisiología o desarrollo de una célula, en donde la modulación da como resultado la mejora de:

- 55 a) un estado autoinmune; o
- b) un estado inflamatorio crónico:

60 15. El uso de la reivindicación 14, en donde el estado autoinmune es esclerosis múltiple.

16. El uso de la reivindicación 14, en donde el estado autoinmune es psoriasis.

17. El uso de la reivindicación 14, en donde el estado inflamatorio crónico es artritis reumatoide.

65 18. El uso de la reivindicación 14, en donde el estado inflamatorio crónico es una enfermedad intestinal inflamatoria.

ES 2 300 276 T3

19. El uso de un anticuerpo o su fragmento de unión de la reivindicación 7, en la fabricación de un medicamento para modular una respuesta inflamatoria.

20. El uso de la reivindicación 19, en donde la respuesta inflamatoria es una respuesta inflamatoria en fase aguda.

21. El uso de la reivindicación 20, en donde la respuesta inflamatoria en fase aguda se encuentra en tejido de la piel; tejido pulmonar; tejido gastrointestinal, o tejido hepático.

22. El uso de la reivindicación 19, en donde el medicamento está en combinación con:

a) un agonista o antagonista de citoquina anti-inflamatoria;

b) un analgésico;

c) un agente anti-inflamatorio; o

d) un esteroide.

23. El uso de la reivindicación 19, en donde la respuesta inflamatoria es asma.

24. El uso de la reivindicación 19, en donde la respuesta inflamatoria es fibrosis.

25. El uso de la reivindicación 19, en donde la respuesta inflamatoria es diabetes.

26. El uso de la reivindicación 19, en donde la respuesta inflamatoria es inflamación intestinal.

27. La composición de la reivindicación 1, en donde el polipéptido p40 de IL-12 humano maduro y el polipéptido maduro de la SEQ ID NO:2 son parte de una proteína de fusión.

28. La composición de la reivindicación 27, en donde la proteína de fusión comprende desde el extremo N hasta el extremo C, el polipéptido p40 de IL-12 humano maduro, un fragmento enlazador, y el polipéptido maduro de la SEQ ID NO:2.

29. Un ácido nucleico recombinante que codifica la composición de la reivindicación 27.

ES 2 300 276 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Schering Corporation
- 5 <120> p40 de interleuquina-12 de mamífero e interleuquina B30, sus combinaciones, anticuerpos, usos en composiciones farmacéuticas
- <130> DX01042X PCT
- 10 <140> PCT/US 00/24686
<141> 08-09-2000
- 15 <150> 09/393.090
<151> 09-09-1999
- <150> 60/164.616
- 20 <151> 10-11-1999
- <160> 5
- 25 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 570
- 30 <212> DNA
<213> Organismo desconocido
- <220>
- 35 <223> Descripción de organismo desconocido: *Homo sapiens* supuesto
- <220>
- 40 <221> CDS
<222> (1)...(567)
- <220>
- 45 <221> mat_péptido
<222> (64)...(567)
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 300 276 T3

<400> 1

5 atg ctg ggg agc aga gct gta atg ctg ctg ttg ctg ctg ccc tgg aca 48
 Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr
 -20 -15 -10

10 gct cag ggc aga gct gtg cct ggg ggc agc agc cct gcc tgg act cag 96
 Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln
 -5 -1 1 5 10

15 tgc cag cag ctt tca cag aag ctc tgc aca ctg gcc tgg agt gca cat 144
 Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His
 15 20 25

20 cca cta gtg gga cac atg gat cta aga gaa gag gga gat gaa gag act 192
 Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr
 30 35 40

25 aca aat gat gtt ccc cat atc cag tgt gga gat ggc tgt gac ccc caa 240
 Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln
 45 50 55

30 gga ctc agg gac aac agt cag ttc tgc ttg caa agg atc cac cag ggt 288
 Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly
 60 65 70 75

35 ctg att ttt tat gag aag ctg cta gga tgc gat att ttc aca ggg gag 336
 Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu
 80 85 90

40 cct tct ctg ctc cct gat agc cct gtg gcg cag ctt cat gcc tcc cta 384
 Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Ala Gln Leu His Ala Ser Leu
 95 100 105

45 ctg ggc ctc agc caa ctc ctg cag cct gag ggt cac cac tgg gag act 432
 Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr
 110 115 120

50 cag cag att cca agc ctc agt ccc agc cag cca tgg cag cgt ctc ctt 480
 Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu
 125 130 135

55 ctc cgc ttc aaa atc ctt cgc agc ctc cag gcc ttt gtg gct gta gcc 528
 Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala
 140 145 150 155

60 gcc cgg gtc ttt gcc cat gga gca gca acc ctg agt ccc taa 570
 Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
 160 165

50 <210> 2

<211> 189

<212> PRT

55 <213> Organismo desconocido

<223> Descripción de organismo desconocido: *Homo sapiens* supuesto

60

65

ES 2 300 276 T3

<400> 2

5 Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr
-20 -15 -10

Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln
-5 -1 1 5 10

10 Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His
15 15 20 25

Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr
30 35 40

15 Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln
45 50 55

20 Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly
60 65 70 75

Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu
80 85 90

25 Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Ala Gln Leu His Ala Ser Leu
95 100 105

30 Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr
110 115 120

Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu
125 130 135

35 Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala
140 145 150 155

40 Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
160 165

<210> 3

45 <211> 1203

<212> DNA

<213> Organismo desconocido

50 <220>

<223> Descripción de organismo desconocido: Mus sp. supuesta

<220>

55 <221> CDS

<222> (113)...(700)

<220>

60 <221> mat_péptido

<222> (113)...(700)

65

ES 2 300 276 T3

<400> 3

5 cgcttagaag tcggactaca gagttagact cagaaccaa ggaggtggat aggggggtcca 60
 caggcctggt gcagatcaca gagccagcca gatctgagaa gcaggggaaca ag atg ctg 118
 Met Leu
 -20

10 gat tgc aga gca gta ata atg cta tgg ctg ttg ccc tgg gtc act cag 166
 Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val Thr Gln
 -15 -10 -5

15 ggc ctg gct gtg cct agg agt agc agt cct gac tgg gct cag tgc cag 214
 Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys Gln
 -1 1 5 10

20 cag ctc tct cgg aat ctc tgc atg cta gcc tgg aac gca cat gca cca 262
 Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala Pro
 15 20 25

25 gcg gga cat atg aat cta cta aga gaa gaa gag gat gaa gag act aaa 310
 Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr Lys
 30 35 40 45

30 aat aat gtg ccc cgt atc cag tgt gaa gat ggt tgt gac cca caa gga 358
 Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly
 50 55 60

35 ctc aag gac aac agc cag ttc tgc ttg caa agg atc cgc caa ggt ctg 406
 Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly Leu
 65 70 75

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 300 276 T3

gct ttt tat aag cac ctg ctt gac tct gac atc ttc aaa ggg gag cct 454
Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu Pro
80 85 90

5 gct cta ctc cct gat agc ccc atg gag caa ctt cac acc tcc cta cta 502
Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu Leu
95 100 105

10 gga ctc agc caa ctc ctc cag cca gag gat cac ccc cgg gag acc caa 550
Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr Gln
110 115 120 125

15 cag atg ccc agc ctg agt tct agt cag cag tgg cag cgc ccc ctt ctc 598
Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu Leu
130 135 140

20 cgt tcc aag atc ctt cga agc ctc cag gcc ttt ttg gcc ata gct gcc 646
Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala Ala
145 150 155

25 cgg gtc ttt gcc cac gga gca gca act ctg act gag ccc tta gtg cca 694
Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val Pro
160 165 170

aca gct taaggatgcc cagggtccca tggctaccat gataagacta atctatcagc 750
Thr Ala
175

30 ccagacatct accagttaat taaccatta ggacttgtgc tgttcttgtt tcgtttgttt 810
tgcgtgaagg gcaaggacac cattattaa gagaaaagaa acaaacccca gagcaggcag 870
ctggctagag aaaggagctg gagaagaaga ataaagtctc gagcccttgg ccttggaagc 930

35 gggcaagcag ctgctggcc tgaggggaag ggggcggtgg catcgagaaa ctgtgagaaa 990
accagagca tcagaaaaag tgagcccagg ctttggccat tatctgtaag aaaaacaaga 1050
aaaggggaac attatacttt cctgggtggc tcagggaaat gtgcagatgc acagtactcc 1110

40 agacagcagc tctgtacctg cctgctctgt ccctcagttc taacagaatc tagtcactaa 1170
gaactaacag gactaccaat acgaactgac aaa 1203

45 <210> 4
<211> 196
<212> PRT
50 <213> Organismo desconocido
<223> Descripción de organismo desconocido

55
60
65

ES 2 300 276 T3

<400> 4

5 Met Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val
-20 -15 -10

10 Thr Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln
-5 -1 1 5 10

15 Cys Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His
15 20 25

20 Ala Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu
30 35 40

25 Thr Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro
45 50 55

30 Gln Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln
60 65 70 75

35 Gly Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly
80 85 90

40 Glu Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser
95 100 105

45 Leu Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu
110 115 120

50 Thr Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro
125 130 135

55 Leu Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile
140 145 150 155

60 Ala Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu
160 165 170

65 Val Pro Thr Ala
175

<210> 5

50 <211> 102

<212> PRT

<213> Organismo desconocido

55 <220>

<223> Descripción de organismo desconocido: Sus sp. Supuesto.

60

65

ES 2 300 276 T3

<400> 5

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

30

35

40

45

50

55

60

65