



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 791**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00937943 .9**

96 Fecha de presentación : **30.05.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1181366**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2002**

54

Título: **Proteínas receptoras de mamíferos; reactivos y métodos relacionados.**

30

Prioridad: **01.06.1999 US 322913**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.06.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.06.2009

73

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

72

Inventor/es: **Dowling, Lynette, M.;**
Timans, Jacqueline, C.;
Gorman, Daniel, M.;
Kastelein, Robert, A. y
Bazan, Fernando, J.

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 322 791 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

Proteínas receptoras de mamíferos; reactivos y métodos relacionados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para influir en la fisiología de mamíferos, que incluyen la función del sistema inmune. En particular, proporciona métodos para regular el desarrollo y/o el sistema inmune. También se describen usos de diagnóstico y terapéuticos de estos materiales.

10 **Antecedentes de la invención**

La tecnología de ADN recombinante se refiere en general a técnicas para integrar información genética de una fuente donadora en vectores para procesamiento posterior, tal como mediante la introducción en un hospedador, por lo que la información genética transferida se copia y/o expresa en el ambiente nuevo. Comúnmente, la información genética existe en forma de ADN complementario (ADNc) obtenido a partir de ARN mensajero (ARNm) que codifica un producto de proteína deseado. El vehículo frecuentemente es un plásmido que tiene la capacidad de incorporar ADNc para replicación posterior en un hospedador y, en algunos casos, para controlar realmente la expresión del ADNc y dirigir de ese modo la síntesis directa del producto codificado en el hospedador. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2ª ed.) vols. 1-3, CSH Press, NY.

Durante algún tiempo, se ha sabido que la respuesta inmune de mamíferos se basa en una serie de interacciones celulares complejas, denominadas la "red inmune". Investigaciones recientes han proporcionado nuevas perspectivas en el funcionamiento interno de esta red. Aunque sigue siendo claro que gran parte de la respuesta inmune, de hecho, tiene que ver con las interacciones en forma de red de los linfocitos, macrófagos, granulocitos y otras células, ahora los inmunólogos generalmente sostienen la opinión de que las proteínas solubles, conocidas como linfoquinas, citoquinas o monoquinas, juegan papeles críticos en el control de estas interacciones celulares. Por tanto, hay un interés considerable en el aislamiento, caracterización y mecanismos de acción de factores moduladores de células, cuya comprensión conducirá a avances importantes en el diagnóstico y terapia de muchas anormalidades médicas, por ejemplo, trastornos del sistema inmune.

Las linfoquinas al parecer son mediadoras de actividades celulares en una diversidad de formas. Véase, por ejemplo, Paul (ed. 1996) *Fundamental Immunology* 3ª ed., Raven Press, Nueva York y Thomson (ed. 1994) *The Cytokine Handbook* 2ª ed., Academic Press, San Diego. Se ha demostrado que apoyan la proliferación, crecimiento y/o diferenciación de células madre hematopoyéticas pluripotenciales en un gran número de progenitores que comprenden linajes celulares diversos que constituyen un sistema inmune complejo. Las interacciones apropiadas y equilibradas entre los componentes celulares son necesarias para una respuesta inmune sana. Los linajes celulares diferentes con frecuencia responden de una manera diferente cuando se administran linfoquinas junto con otros agentes.

Linajes celulares especialmente importantes para la respuesta inmune incluyen dos clases de linfocitos: células B, que pueden producir y secretar inmunoglobulinas (proteínas con la capacidad de reconocer y unirse a material extraño para lograr su remoción) y células T de diversos subconjuntos que secretan linfoquinas e inducen o suprimen a las células B y diversas células diferentes (incluyendo otras células T) constituyendo la red inmune. Estos linfocitos interaccionan con muchos otros tipos de células.

La incapacidad general para mantener células del sistema inmune *in vitro* ha obstaculizado la investigación para entender mejor y tratar diversos trastornos inmunes. Los inmunólogos han observado que el cultivo de muchas de estas células se puede conseguir mediante el uso de sobrenadantes de células T y otras células; que contienen diversos factores de crecimiento, que incluyen muchas de las linfoquinas.

Existen diversos factores de crecimiento y reguladores que modulan el desarrollo morfogénico. Estos incluyen, por ejemplo, los ligandos de Toll, que dan señales uniéndose a receptores que comparten elementos estructurales y mecanísticos característicos de los receptores IL-1. Véase, por ejemplo, Lemaitre, *et al.* (1996) *Cell* 86: 973-983 y Belvin y Anderson (1996) *Ann. Rev. Cell & Devel. Biol.* 12: 393-416. También se conocen otros receptores para citoquinas. Con frecuencia, existen al menos dos subunidades críticas en el receptor funcional. Véase, por ejemplo, Gonda y D'Andrea (1997) *Blood* 89: 355-369; Presky, *et al.* (1996) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 93: 14002-14007; Drachman y Kaushansky (1995) *Curr. Opin. Hematol.* 2: 22-28; Theze (1994) *Eur. Cytokine Netw.* 5: 353-368 y Lemon y Schlessinger (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19: 459-463. El documento WO 99/20755 describe una secuencia GP130 murina (mGP130).

A partir de lo anterior, es evidente que el descubrimiento y desarrollo de nuevas proteínas solubles y sus receptores, incluyendo aquellas que son similares a linfoquinas, deben contribuir a nuevas terapias para una amplia gama de afecciones degenerativas o anormales que implican directa o indirectamente el desarrollo, diferenciación o función, por ejemplo, del sistema inmune y/o células hematopoyéticas. En particular, el descubrimiento y entendimiento de receptores nuevos de moléculas similares a linfoquina que mejoran o potencian las actividades beneficiosas de otras linfoquinas serán altamente provechosos. La presente invención proporciona receptores nuevos para ligandos que muestran similitud a composiciones similares a citoquina y compuestos relacionados y métodos para su uso.

Sumario de la invención

La presente invención se dirige a receptores nuevos relacionados con receptores de citoquina, por ejemplo, estructuras moleculares similares a receptor de citoquina de primates, denominadas Subunidades de Receptor de Citoquina ADN_X (DCRS) y sus actividades biológicas. En particular, proporciona descripción de una subunidad, denominada DCRS2. Incluye ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos y métodos para su producción y uso. Los ácidos nucleicos de la invención se caracterizan, en parte, por su homología a secuencias de ADN complementario (ADNc) clonadas descritas en este documento.

La presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una homología de secuencia de aminoácidos de al menos el 70% a la secuencia de aminoácidos madura (residuos 1-361) de la SEC ID N°: 2. En la medida en que las mismas estén abarcadas por las reivindicaciones adjuntas, se proporcionan las siguientes realizaciones, concretamente una composición de material seleccionado entre: un polipéptido DCRS2 sustancialmente puro o recombinante que comprende al menos tres segmentos no solapados distintos de al menos cuatro aminoácidos idénticos a segmentos de SEC ID N°: 2; un polipéptido DCRS2 sustancialmente puro o recombinante que comprende al menos dos segmentos no solapados distintos de al menos cinco aminoácidos idénticos a segmentos de SEC ID N°: 2; una secuencia natural DCRS2 que comprende SEC ID N°: 2 madura o un polipéptido de fusión que comprende secuencia DCRS2. En determinada realización, la invención comprende dicho polipéptido DCRS2 antigénico sustancialmente puro o aislado, donde los segmentos no solapados distintos de identidad: incluyen uno de al menos ocho aminoácidos; incluyen uno de al menos cuatro aminoácidos y un segundo de al menos cinco aminoácidos; incluyen al menos tres segmentos de al menos cuatro, cinco y seis aminoácidos o incluyen uno de al menos doce aminoácidos. Otras realizaciones incluyen aquellas donde: el polipéptido DCRS2: comprende una secuencia madura de la Tabla 1; es una forma no glicosilada de DCRS2; es de un primate, tal como un ser humano; comprende al menos 17 aminoácidos de SEC ID N°: 2; presenta al menos cuatro segmentos no solapados de al menos siete aminoácidos de SEC ID N°: 2; es una variante alélica natural de DCRS2; tiene una longitud de al menos aproximadamente 30 aminoácidos; presenta al menos dos epítomos no solapados que son específicos para un DCRS2 de primate; es glicosilado; tiene un peso molecular de al menos 30 kD con glicosilación natural; es un polipéptido sintético; está unido a un sustrato sólido; está conjugado a otra resto químico; es una sustitución cinco veces o menos de la secuencia natural o es una variante de delección o inserción de una secuencia natural. Otras realizaciones incluyen una composición que comprende: un DCRS2 sustancialmente puro y otro miembro de la familia de Receptor de Interferón; un polipéptido DCRS2 estéril; el polipéptido DCRS2 y un vehículo, donde el vehículo es: un compuesto acuoso, que incluye agua, solución salina y/o tampón y/o formulado para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral. Las realizaciones de polipéptidos de fusión incluyen las que comprenden: una secuencia de proteína madura de la Tabla 1; una etiqueta de detección o purificación, que incluye una secuencia de FLAG, His6 o Ig o secuencia de otra proteína receptora de interferón. Las realizaciones de equipo incluyen las que comprenden un polipéptido de este tipo y: un compartimiento que comprende la proteína o polipéptido o instrucciones para uso o desecho de reactivos en el equipo.

Las realizaciones de compuesto de unión incluyen, por ejemplo, un compuesto de unión que comprende un sitio de unión de antígeno de un anticuerpo, que se une específicamente a un polipéptido DCRS2 natural, donde: el compuesto de unión está en un recipiente; el polipéptido DCRS2 es de un ser humano; el compuesto de unión es un fragmento Fv, Fab o Fab2; el compuesto de unión se conjuga a otro resto químico o el anticuerpo: se crea contra una secuencia de péptidos de un polipéptido maduro de la Tabla 1; se crea contra un DCRS2 maduro; se crea para un DCRS2 humano purificado; es inmunoseleccionado; es un anticuerpo policlonal; se une a un DCRS2 desnaturalizado; presenta un Kd para antígeno de al menos 30 μ M; está unido a un sustrato sólido, que incluye una perla o una membrana de plástico; está en una composición estéril o está detectablemente marcado, incluyendo un marcador radiactivo o fluorescente. Los equipos incluyen los que comprenden el compuesto de unión y: un compartimiento que comprende el compuesto de unión o instrucciones para uso o desecho de los reactivos en el equipo.

Se proporcionan métodos, por ejemplo, para producir un complejo antígeno: anticuerpo, que comprende poner en contacto en condiciones apropiadas un polipéptido DCRS2 de primate de la invención con un anticuerpo descrito, permitiendo de ese modo que se forme el complejo. Este incluye donde: el complejo se purifica a partir de otros receptores de interferón; el complejo se purifica a partir de otro anticuerpo; el contacto es con una muestra que comprende un interferón; el contacto permite la detección cuantitativa del antígeno; el contacto es con una muestra que comprende el antígeno o el contacto permite la detección cuantitativa del anticuerpo.

Se proporcionan diversas composiciones relacionadas, por ejemplo, una composición que comprende: un compuesto de unión estéril, como se ha descrito o el compuesto de unión descrito y un vehículo, donde el vehículo es: un compuesto acuoso, que incluye agua, solución salina y/o tampón y/o formulado para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral.

Las realizaciones de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica el polipéptido DCRS2, donde dicho polipéptido DCRS2 comprende una homología de secuencia de aminoácidos de al menos el 70% a la secuencia de aminoácidos madura (residuos 1-361) de la SEC ID N°: 2. En la medida en que las mismas estén abarcadas por las reivindicaciones adjuntas, también se proporcionan las siguientes realizaciones, concretamente donde el: DCRS2 es de un ser humano o el ácido nucleico: codifica una secuencia de péptido antigénico de la Tabla 1; codifica una pluralidad de secuencias de péptido antigénico de la Tabla 1; muestra identidad sobre al menos trece nucleótidos a un ADNc natural que codifica el segmento; es un vector de expresión; comprende además un origen de replicación; es de una fuente natural; comprende un marcador detectable; comprende secuencia de nu-

cleótidos sintética; es menor que 6 kb, preferiblemente menor que 3 kb; es de un primate; comprende una secuencia codificante de longitud completa natural; es una sonda de hibridación para un gen que codifica el DCRS2 o es un cebador de PCR, producto de PCR o cebador de mutagénesis. Otras realizaciones de la invención incluyen una célula o tejido que comprende el ácido nucleico recombinante descrito. Preferiblemente, la célula es: una célula procariota; una célula eucariota; una célula bacteriana; una célula de levadura; una célula de insecto; una célula de mamífero; una célula de ratón; una célula de primate o una célula humana.

Las realizaciones de equipo incluyen las que comprenden un ácido nucleico descrito y: un compartimiento que comprende el ácido nucleico; un compartimiento que comprende además un polipéptido DCRS2 de primate o instrucciones para uso o desecho de los reactivos en el equipo.

Realizaciones de ácidos nucleicos alternativas incluyen un ácido nucleico que: hibrida en condiciones de lavado de 30 minutos a 30°C y sal menos de 2 M a la parte codificante de SEC ID N°: 1 o muestra identidad sobre un tramo de al menos aproximadamente 30 nucleótidos a un DCRS2 de primate. Determinadas realizaciones incluyen aquellas donde el ácido nucleico hibrida a la parte codificante de SEC ID N°: 1 y las condiciones de lavado son a 45°C y/o sal 500 mM o las condiciones de lavado son a 55°C y/o sal 150 mM. También descrito en este documento, el tramo es de al menos 55 nucleótidos o el tramo es de al menos 75 nucleótidos.

Otros usos incluyen el de modular la fisiología o desarrollo de una célula o células de cultivo de tejido que comprende poner en contacto la célula con un agonista o antagonista de un DCRS2 de mamífero. Preferiblemente, la célula se transforma con un ácido nucleico que codifica un DCRS2 y otra subunidad de receptor de citoquina.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Descripción

- I. General
- II. Actividades
- III. Ácidos nucleicos
 - A. fragmentos, secuencia, sondas codificantes
 - B. mutaciones, quimeras, fusiones
 - C. preparación de ácidos nucleicos
 - D. vectores, células que comprenden
- IV. Proteínas, Péptidos
 - A. fragmentos, secuencia, inmunógenos, antígenos
 - B. muteínas
 - C. agonistas/antagonistas, equivalentes funcionales
 - D. preparación de proteínas
- V. Preparación de ácidos nucleicos, proteínas
 - A. sintéticos
 - B. recombinantes
 - C. fuentes naturales
- VI. Anticuerpos
 - A. policlonales
 - B. monoclonales
 - C. fragmentos; Kd
 - D. anticuerpos anti-idiotípicos
 - E. líneas celulares de hibridoma

VII. Equipos y Métodos para cuantificar DCRS2

- A. ELISA
- B. ensayo codificante de ARNm
- C. cualitativo/cuantitativo
- D. equipos

VIII. Composiciones terapéuticas, métodos

- A. composiciones de combinación
- B. dosis unitaria
- C. administración

IX. Selección

X. Ligandos

I. General

La presente invención proporciona la secuencia de aminoácidos y secuencia de ADN de moléculas de subunidad similares a receptores de citoquina de mamífero, en este documento de primate, a las cuales se denomina Subunidad 2 de Receptor de Citoquina DNAX (DCRS2) que tienen propiedades definidas particulares, tanto estructurales como biológicas. Diversos ADNc que codifican estas moléculas se obtuvieron a partir de genotecas de secuencias de ADNc de primate, por ejemplo, de ser humano. Otros homólogos de primates u otros mamíferos también serían deseados.

Algunos de los métodos convencionales aplicables se describen o se hace referencia a los mismos, por ejemplo, en Maniatis, *et al.* (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook, *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2ª ed.), vols. 1-3, CSH Press, NY; Ausubel, *et al.*, *Biology*, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY o Ausubel, *et al.* (1987 y suplementos periódicos) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene/Wiley, Nueva York.

La secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 1) y de aminoácidos correspondiente (SEC ID N°: 2) de un segmento codificante DCRS2 humano se muestra en la Tabla 1. Es probable que exista al menos una variante de empalme con un dominio intracelular más largo y probablemente mostrará motivos de señalización característicos. La secuencia de señal pronosticada se indica, pero puede depender del tipo de célula o puede ser unos cuantos residuos en cualquier dirección. Los sitios de glicosilación N potenciales están en los residuos de Asparagina 6, 24, 58, 118, 157, 209 y 250. Los enlaces de disulfuro probablemente se encuentran entre residuos de cisteína en las posiciones 29 y 78 y un motivo C₂CXW conservado se encuentra en las posiciones 110/121/123. Se distinguen el triptofano en 219 y el motivo WxxWS de 281-285. El segmento desde aproximadamente 1-101 es un dominio Ig; desde aproximadamente 102-195 es un dominio de unión a citoquina 1; desde aproximadamente 196-297 es un dominio de unión a citoquina 2; desde aproximadamente 298-330 es un enlazador; desde aproximadamente 331-353 es un segmento de membrana y desde aproximadamente 354-361 es un dominio intracelular. Estos sitios y límites son notables.

En la Tabla 2 se proporciona la secuencia de ácidos nucleicos de traducción inversa.

ES 2 322 791 T3

TABLA 1

Secuencias de nucleótidos y polipéptidos de realizaciones similares a Subunidad de Receptor de Citoquina ADN (DCRS2). Realización de primate, por ejemplo, ser humano (véase SEC ID N°: 1 y 2). Secuencia de señal pronosticada indicada, pero puede variar en algunas posiciones y dependiendo del tipo de célula

5		atg aat cag gtc act att caa tgg gat gca gta ata gcc ctt tac ata	48
10		Met Asn Gln Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile	
		-20 -15 -10	
15		ctc ttc agc tgg tgt cat gga gga att aca aat ata aac tgc tct ggc	96
		Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly	
		-5 -1 1 5	
20		cac atc tgg gta gaa cca gcc aca att ttt aag atg ggt atg aat atc	144
		His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile	
		10 15 20 25	
25		tct ata tat tgc caa gca gca att aag aac tgc caa cca agg aaa ctt	192
		Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu	
		30 35 40	
30		cat ttt tat aaa aat ggc atc aaa gaa aga ttt caa atc aca agg att	240
		His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile	
		45 50 55	
35		aat aaa aca aca gct cgg ctt tgg tat aaa aac ttt ctg gaa cca cat	288
		Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His	
		60 65 70	
40		gct tct atg tac tgc act gct gaa tgt ccc aaa cat ttt caa gag aca	336
		Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr	
		75 80 85	
45		ctg ata tgt gga aaa gac att tct tct gga tat ccg cca gat att cct	384
		Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro	
		90 95 100 105	
50		gat gaa gta acc tgt gtc att tat gaa tat tca ggc aac atg act tgc	432
		Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys	
		110 115 120	
55		acc tgg aat gct ggg aag ctc acc tac ata gac aca aaa tac gtg gta	480
		Thr Trp Asn Ala Gly Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val	
		125 130 135	
60		cat gtg aag agt tta gag aca gaa gaa gag caa cag tat ctc acc tca	528
		His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser	
		140 145 150	
65		agc tat att aac atc tcc act gat tca tta caa ggc ggc aag aag tac	576
		Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr	
		155 160 165	
70		ttg gtt tgg gtc caa gca gca aac gca cta ggc atg gaa gag tca aaa	624
		Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys	
		170 175 180 185	

ES 2 322 791 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

caa ctg caa att cac ctg gat gat ata gtg ata cct tct gca gcc gtc 672
 Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val
 190 195 200

att tcc agg gct gag act ata aat gct aca gtg ccc aag acc ata att 720
 Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile
 205 210 215

tat tgg gat agt caa aca aca att gaa aag gtt tcc tgt gaa atg aga 768
 Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg
 220 225 230

tac aag gct aca aca aac caa act tgg aat gtt aaa gaa ttt gac acc 816
 Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr
 235 240 245

aat ttt aca tat gtg caa cag tca gaa ttc tac ttg gag cca aac att 864
 Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile
 250 255 260 265

aag tac gta ttt caa gtg aga tgt caa gaa aca ggc aaa agg tac tgg 912
 Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp
 270 275 280

cag cct tgg agt tca ccg ttt ttt cat aaa aca cct gaa aca gtt ccc 960
 Gln Pro Trp Ser Ser Pro Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro
 285 290 295

cag gtc aca tca aaa gca ttc caa cat gac aca tgg aat tct ggg cta 1008
 Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu
 300 305 310

aca gtt gct tcc atc tct aca ggg cac ctt act tct gac aac aga gga 1056
 Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly
 315 320 325

gac att gga ctt tta ttg gga atg atc gtc ttt gct gtt atg ttg tca 1104
 Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser
 330 335 340 345

att ctt tct ttg att ggg ata ttt aac aga tca ttc ccg aac tgg gat 1152
 Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Pro Asn Trp Asp
 350 355 360

taa 1155

MNQVTIQWDAVIALYILFSWCHGGITNINCSGHIWVEPATIFKMGMINISIYCOAAIKNCQPRKLHFKNGIKERF
 QITRINKTTARLWYKNFLPHASMYCTAECPKHPQETLICGKDISSGYPPDIPDEVTCVIYEYSQNMTCWTNAGK
 LTYIDTKYVVHVKSLETEEQOYLTSYINISTDSLOGGKKYLVWVOAANALGMEESKOLQIHLEDDIVIPSAAVI
 SRARTINATVPKTIYWDSTTTIEKVSCEMRKATTNQTWNVKEFDTNFTYVQOSEFYLEPNIKYVFPQVRCQETG
 KRYWQPWSSPFFHKTPETVPQVTSKAFQHDWTNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIGLLGMIVFAVMLSILSLIGI
 FNRSPNWD

ES 2 322 791 T3

TABLA 2

Traducción inversa de DCRS2 de primate, por ejemplo, ser humano (SEC ID N°: 3)

5
atgaaycarg tnacnathca rtgggaygcn gtnathgcn y tntayathyt nttywantgg 60
tgycaayggng gnathacnaa yathaaytgy wsggncaya thtgggtnga rccngcnacn 120
10 athttyaara tgggnatgaa yathwsnath taytgycarg cngcnathaa raaytgycar 180
ccnmgnaary tncayttyta yaaraayggn athaargarm gnttycarat hacnmgnath 240
aayaaracna cngcnmgnyt ntggtayaar aayttytng arccncaygc nwsnatgtay 300
15 tgyacngcng artgyccnaa rcayttycar garacnytna thtgyggnaa rgayathwsn 360
wsggntayc cncngayat hccngaygar gtnacntgyg tnathtayga rtaywsggna 420
aayatgacnt gyacntggaa ygcnggnaar ytnacntaya thgayacnaa rtaygtngtn 480
20 caygtnaarw snytngarac ngargargar carcartayy tnacnwsnw ntayathaay 540
athwsnacng aywsnytnca rggnggnaar aartayytng tntgggtnc rgcngcnaay 600
gcnytnngna tggargarws naarcarytn carathcayy tngaygayat hgtnathecn 660
25 wngcngcng tnathwsnmg ngcngaracn athaaygcna cngtnccnaa racnathath 720
taytgggayw encaracnac nathgaraar gtnwentgyg aratgmnta yaargcnacn 780
acnaaycara cntggaaygt naargartty gayacnaayt tyacntaygt ncargarwsn 840
garttytayy tngarccnaa yathaartay gtnttycarg tnmngtgyca rgaracnggn 900
aarmgntayt ggcarccntg gwanwancn ttyttycaya aracncnga racngtnccn 960
35 cargtnacnw anaargcntt ycarcaygay acntggaayw snggnytnac ngtnngcnwan 1020
athwsnacng gncayytnac nwsngayaay mgngngaya thggnytnyt nytnggnatg 1080
athgtnttyg cngtnatgyt nwnathytn wnytnathg gnathttyaa ymgnwentty 1140
40 ccnaaytggg ay 1152

45

50

55

60

65

ES 2 322 791 T3

TABLA 3

5 Alineación de diversas subunidades de receptor de citoquina. La secuencia NR6 humana (hNR6) es SEC ID N°: 4 (véase Elson, et al. (1998) J. Immunol. 161: 1371-1379; el número de Entrada del GenBank AF059293; también se describe en Douglas J. Hilton (Australia)); la secuencia NR6 de ratón (mNR6) es SEC ID N°: 5. La p40 humana (hp40) es SEC ID N°: 6 (véase GenBank M65272). La p40 de ratón es SEC ID N°: 7 (véase GenBank S82421). La Ebi3 de ratón (mEbi3) es SEC ID N°: 8 (véase GenBank AF013114); la Ebi3 humana (hEbi3) es SEC ID N°: 9 (véase GenBank L08187); la subunidad alfa de receptor de IL-11 de ratón (mIL-11Ra) es SEC ID N°: 10 (véase GenBank U14412); la subunidad alfa de receptor IL-11 humano (hIL-11Ra) es SEC ID N°: 11 (véase GenBank U32324). La subunidad alfa de receptor IL-6 humano (hIL-6Ra) es SEC ID N°: 12 (véase GenBank X58298); la subunidad alfa de receptor IL-6 de ratón (mIL-6Ra) es SEC ID N°: 13 (véase GenBank X51975)

15	hNR6	MPAGRRGPAAQSARRPPPLLP LLLLLCVLGAPRAGSGAHTAVISPODPTL
	mNR6	-----RPLSSLWSPLLLCVLGVPRGGSGAHTAVISPODPTL
	hp40	-----MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKIDVYVVELDWYP
	mp40	-----MCPQKLTISWFAIVLLVSPIMAMWELEKDVYVVEVDWTP
	mEbi3	-----
	hEbi3	-----
20	mIL-11Ra	-----MSSSCSGLTRVLVAVATALVSSSSPCPQANGPPGVQYG
	hIL-11Ra	-----MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCPQANGPPGVQYG
	hIL-6Ra	-----MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRR--CPAQEVARGVLTST
	mIL-6Ra	-----MLTVGCTLLVALLAAPAVLVLS--CRALEVANGTVTST
25	hAS11	-----MNQVTIQWDAVIALYILFSWCHGGITNINCSGHIWVEPATIFK
30	hNR6	-LIGSSLLATCSVHGDPFGATAEGLYWTLNGRRLPPELSRVLNASTLALA
	mNR6	-LIGSSLLQATCSINGDTPGATAEGLYWTLNGRRLP-SLSRLLNTSTLALA
	hp40	DAPGEMVVLTCDTPEED-----GITWTLT-----QSSEVLGSGKTLT
	mp40	DAPGETVNLTCDTPEED-----DITWTS-----QRHGVIGSGKTLT
	mEbi3	-----MSKLLP
	hEbi3	-----MTPQLL
35	mIL-11Ra	-QPGRPVMCCPGVSAG----TPVSWFRDQDS-R-LLQGPDSGLGHRLV
	hIL-11Ra	-QPGRSVKLCPCGVTAG----DPVSWFRDGEP-K-LLQGPDSGLGHRLV
	hIL-6Ra	-LPGDSVTLTCPGVEPED---NATVHWLVRKPAAG-SHPSRWAGMGRRL
	mIL-6Ra	-LPGATVTLICPGKEAAG---NVTIHWVYS---G-SQNREWTGNTLV
40	hAS11	--MGMNISITYCAAIKNCQ--PRKLHFYKNGIKER-FQITRINKTTARLW
		*
45	hNR6	LANLNGSRQSGDNLVCHARDGSILA-GSCLYVGLP-----
	mNR6	LANLNGSRQSGDNLVCHARDGSILA-GSCLYVGLP-----
	hp40	IQVKEFGDA--G-QYTCHKG-GEVLS-HSLLLLHKKEDGIWSTDIKDKQK
	mp40	ITVKEFLDA--G-QYTCHKG-GETLS-HSHLLLLHKKENGWSTIILKN--
	mEbi3	LSLALNAS-----RSPG-YTETA-LVALSQ-----
	hEbi3	LALVLNAS-----CPFGSGRKGK-PAALTL-----
50	mIL-11Ra	LAQVDSPE--G-TYVCQTLDGVSQG-MVTLKLGK-----
	hIL-11Ra	LAQADSTDE--G-TYICQTLDGALGG-TVTLQLGY-----
	hIL-6Ra	LRSVQLHDS--G-NYSCYRA-GRPAG-TVHLLVDV-----
	mIL-6Ra	LRDVQLSDT--G-DYLCSLN-DHLVG-TVPLLVDV-----
55	hAS11	YKNFLEPHASMYCTAECPKHFQETLICGKDISSGYP-----
60		
65		

ES 2 322 791 T3

hNR6 -PEKPVNISCSKMKD-LTCRWTPGAHGETFL--HTNYSLKYLRLWYG-
mNR6 -PEKPFNISCSRNMKD-LTCRWTPGAHGETFL--HTNYSLKYLRLWYG-
hp40 EPKNTFLRCEAKNYSGRFTCWLTITSTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG
mp40 -FKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVRNMDLKFNKSSSSSPDSRAVTCG
mEbi3 -----PRVQCHASRYFPAVDCSWTLPQAPNSTR--STSFIATYRLGVATQ
hEbi3 -----PRVQCRASRYPIAVDCSWTLPPAPNSTS--PVSFIATYRLGMAAR
mIL-11R -PPARPEVSCQAVDYEN-FSCTWSPGQVSGLPTRYLTSYRKKTLPGAESQ
hIL-11R -PPARPVVSCQAADYEN-FSCTWSPSQISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQ
hIL-6Ra -PPEEPQLSCFRKSPLSNVVCEWGRSTPSLT---KAVLLVRKFQNSP-
mIL-6Ra -PPEEPKLSCFRKNPLVNAICEWRPSSTPSPTT---KAVLFAKKINTNG
hAS11 -PDIPDEVTCVIYEYSGNMTCTWNAGKLTYYIDT---KYVVHVKSLETE-

: * * *

hNR6 QDN-----TCEEYHTVGPHSCHIPKDLALF-TPYEIWVEATNRLGSA-
mNR6 QDN-----TCEEYHTVGPHSCHIPKDLALF-TPYEIWVEATNRLGSA-
hp40 AATLSAERVGRDNKEYE-YSVEQCQEDSACPAAEESLPVEMVDAVHKLKY
mp40 MASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAETLPIELALEARQQNKY
mEbi3 QQS-----QPCLQSPQ-ASRCTIPDVHLFSTVPYMLNVTAVHPGGA--
hEbi3 GHS-----WPCLOQTPT-STSTITDVQLFSMAFYVLNVTAVHPNGS--
mIL-11Ra RESP-STGPNWPCPDPLE-ASRCVVHGAEFWS--EYRINVTEVNSLGA--
hIL-11Ra RRSP-STGPNWPCPDPLG-AARCVVHGAEFWS--QYRINVTEVNPLGA--
hIL-6Ra AED----FQEPQYSQESQKFSQQLAVPEGDS-SFYIVSMCVASSVSGSK-
mIL-6Ra KSD----FQVPCQYSQQLKSFSCQVEILEGDK-VYHIVSLCVANSVSGSK-
hAS11 -----EEQQYLTSSYINISTDSLOGGK--KYLWVQAANALGME-

: :

hNR6 RSDVLTLDILDVVTDPDPDVHVS RVGGLEDQLSVRWVSPALK--DFLF
mNR6 RSDVLTLDVLDVVTDPDPDVHVS RVGGLEDQLSVRWVSPALK--DFLF
hp40 ENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQKPLKNSR-QVEVSWEYPTWSTPHSYF
mp40 ENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNS--QVEVSWEYPDWSTPHSYF
mEbi3 SSSLLAFVAERIIKPDPPGVRLRTAGQR---LQVLWHPPASWPF-PDIF
hEbi3 SSSFVPPFITEHIIKPDPPGVRLSPLAERH--VQVQWEPGSGWPF-PEIF
mIL-11Ra STCLLDVRLQSILRPDPQGLRVESVPGYPRRLHASWTPASWRR-QPHF
hIL-11Ra STRLLDVSLQSILRPDPQGLRVESVPGYPRRLRASWTPASWPC-QPHF
hIL-6Ra FSKTQTTFQGCILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHWSN--SSFY
mIL-6Ra SSHNEAFHSLKMVQPDPPANLVVSAIPGRPRWLKVSWQHPETWD--PSYY
hAS11 ESKQLQIHLDDIVIPSAAVISRAETINATVPKTIYWDSTTIE-----

: :

*

:

hNR6 QAKYQIRYRVEDSVDWKV--DDVSNQTSCLAGLKPG-TVYFVQVRCN
mNR6 QAKYQIRYRVEDSVDWKV--DDVSNQTSCLAGLKPG-TVYFVQVRCN
hp40 SLTFCVQVQGKSK--RE-----KKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQ
mp40 SLKFFVRIQRKKEKMKETBEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCK-GGNVCVQAAQ
mEbi3 SLKYRLRYRRRGASHFR-----QVGPIEATFTLRNSKPHAKYCIQVSAQ
hEbi3 SLKYWIRYKRQGAARFH-----RVGPIEATSFILRAVRPRARYVQVAAQ
mIL-11Ra LLKFRLQYRPAQHFAWS-----TVEPIGLEEVITDITVAG-LPHAVRV SAR
hIL-11R LLKFRLQYRPAQHFAWS-----TVEPIGLEEVITDAVAG-LPHAVRV SAR
hIL-6Ra RLRFEFLRYRAERSKTFTTW---MVKDLQHHCVIHDASG-LRHVVQLRAQ
mIL-6Ra LLQFQLRYRFVWSKEFTVL---LLPVAQYQCVIHDALRG-VKHVVQVRGK
hAS11 KVSCEMRYKATTNQTWNVK--EFDTNFTYVQQSEFYLEPNIKYVFQVRCQ

	hNR6	PFGIYGSKKAGIWSEWSHPTAASTPRSE-RPGPGGGACE--FRGGEPSG,
	mNR6	PFGIYGSKKAGIWSEWSHPTAASTPRSE-RPGPGGGVCE--FRGGEPSG
5	hp40	DRYYSSS-----WSEWASVPCS-----
	mp40	DRYYNSS-----CSKWACVPCRVS-----
	mEbi3	DLTDYGK-----PSDWSLPGQVESAPHKP-----
	hEbi3	DLTDYGE-----LSDWSLPATATMSLGK-----
10	mIL-11Ra	DFLDAGT-----WSAWSPEAWGTPSTGLLQDEIPDWSQGHGQOLEAVVAQ
	hIL-11Ra	DFLDAGT-----WSTWSPEAWGTPSTGTIPKEIPAWGQLHTQP--EVEPQ
	hIL-6Ra	EEFGQGE-----WSEWSPEAMGTPWTES-RSPPAENEVS-TPMQALTNNK
	mIL-6Ra	EELDLGQ-----WSEWSPEVTGTPWIAEPRTTPAGILWNPTQVSVEDSAN
	hAS11	ETGKRY-----WQPWSSPFFHKTPETVPQVTSKAFQHD-----TWNSG
15		. *:
	hNR6	PVRRELKQFLGWLKKHAYCSNLSFRLYDQWRAWMQKSHKTRNQ---VLPD
	mNR6	PVRRELKQFLGWLKKHAYCSNLSFRLYDQWRAWMQKSHKTRNQDEGILPS
20	hp40	-----
	mp40	-----
	mEbi3	-----
	hEbi3	-----
25	mIL-11Ra	EDSLAPARPSLQPDPRPLDHRDPLEQVAVLASLGIFSCGLGLAVGALALGL
	hIL-11Ra	VDSPPAPPRPSLQPHPRLLDHRDSVEQVAVLASLGILSFLGLVAGALALGL
	hIL-6Ra	DDDNILFRDSANATSLPVQDSSSVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIVLRF
	mIL-6Ra	HEDQYESSTEATSVLAPVQESSSSMSLPTFLVAGGSLAFGLLLCVFIILRL
	hAS11	LTVASISTGHILSDNR-GDIGLLGMIVFAVMLSILSLIGIFN--RSFPN
30	hNR6	KL-----
	mNR6	GRRGAARGPAG-----
	hp40	-----
35	mp40	-----
	mEbi3	-----
	hEbi3	-----
	mIL-11Ra	WLRLRRSGKEG-----PQKPGLLAPMIP-----
	hIL-11Ra	WLRLRRGGKDG-----SPKPGFLASVIP-----
40	hIL-6Ra	KKTWKLRLKEGKTSMHPP--YSLGQLVPERPRPTPVLVPLISPPVSPSS
	mIL-6Ra	KQKWKSEAEKESKTTSPPPPPYSLGPLKP-----TFLLVPLLTPHSS---
	hAS11	WD-----
45	hNR6	-----
	mNR6	-----
	hp40	-----
	mp40	-----
50	mEbi3	-----
	hEbi3	-----
	mIL-11Ra	-----VEKLPGIPNLQRTPENFS--
	hIL-11Ra	-----VDRRPGAPNL-----
55	hIL-6Ra	LGSDNTSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR
	mIL-6Ra	-GSDNTVNHSCLGVRDAQSPYDONSNRDYLFPF
	hAS11	-----

La Tabla 3 muestra la comparación de las secuencias disponibles de receptores de primates y roedores con el DCRS2 (AS11) de primates, por ejemplo, humanos. El DCRS2 muestra similitud particular a la subunidad alfa del receptor IL-11, aunque se puede alinear con las subunidades alfa del receptor p40 e IL-6. Es probablemente una subunidad alfa y por tanto se debe unir a ligando sin la necesidad de una subunidad beta. Es probable que la biología sea similar a la subunidad de receptor IL-6.

Como se usa en este documento, el término DCRS2 se usará para describir una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 1. En muchos casos, un fragmento sustancial de la misma será equivalente funcionalmente o estructuralmente, incluyendo, por ejemplo, un dominio extracelular o intracelular. La invención tam-

bién incluye una variación de proteína del alelo de DCRS2 respectivo cuya secuencia se proporciona, por ejemplo, una mutación o construcción extracelular soluble. Típicamente, tales agonistas o antagonistas mostrarán diferencias de secuencia menores de aproximadamente el 10% y, por tanto, con frecuencia tendrán sustituciones de entre 1 y 11 veces, por ejemplo, 2, 3, 5, 7 veces y otras. También abarca variantes alélicas y otras variantes, por ejemplo, polimórfica natural, de la proteína descrita. Típicamente, se unirá a su ligando biológico correspondiente, quizás en un estado dimerizado con una subunidad de receptor alfa, con alta afinidad, por ejemplo, al menos aproximadamente 100 nM, habitualmente mejor que aproximadamente 30 nM, preferiblemente mejor que 10 nM y más preferiblemente mejor que aproximadamente 3 nM. El término también se usará en este documento para referirse a formas de origen natural relacionadas, por ejemplo, alelos, variantes polimórficas y variantes metabólicas de la proteína de mamífero. Formas preferidas de los complejos receptores se unirán al ligando apropiado con una afinidad y selectividad apropiadas para una interacción ligando-receptor.

Esta invención también abarca combinaciones de proteínas o péptidos que tienen identidad de secuencia de aminoácidos sustancial con la secuencia de aminoácidos de la Tabla 1. Incluirán variantes de secuencia con relativamente pocas sustituciones, por ejemplo, preferiblemente menos de aproximadamente 3-5.

Un “fragmento” o “segmento” de polipéptido sustancial es un tramo de residuos de aminoácidos de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, aminoácidos, con frecuencia al menos 14 aminoácidos, más frecuentemente al menos 16 aminoácidos, típicamente al menos 18 aminoácidos, más típicamente al menos 20 aminoácidos, habitualmente al menos 22 aminoácidos, más habitualmente al menos 24 aminoácidos, preferiblemente al menos 26 aminoácidos, más preferiblemente al menos 28 aminoácidos y al menos aproximadamente 30 y, en realizaciones particularmente preferidas, al menos aproximadamente 30 o más aminoácidos. Las secuencias de segmentos de proteínas diferentes se pueden comparar unas con otras sobre tramos de longitud apropiada. En muchas situaciones, los fragmentos pueden mostrar propiedades funcionales de las subunidades intactas, por ejemplo, el dominio extracelular del receptor de membrana puede retener las características de unión de ligando y se puede usar para preparar un complejo similar al receptor soluble.

La homología de secuencia de aminoácidos o identidad de secuencia, se determina optimizando coincidencias de residuos. En algunas comparaciones, se pueden introducir huecos, según se requiera. Véase, por ejemplo, Needleham, *et al.*, (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453; Sankoff, *et al.*, (1983) capítulo uno en *Time Warps, String Edits and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison*, Addison-Wesley, Reading, MA y paquetes de software de IntelliGenetics, Mountain View, CA y the University of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI. Esto cambia cuando se consideran sustituciones conservativas como coincidencias. Las sustituciones conservativas típicamente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina y fenilalanina, tirosina. Las secuencias de aminoácidos homólogas tienen por objeto incluir variaciones alélicas naturales y entre especies en la secuencia de citoquina. Las proteínas o péptidos homólogos típicos tendrán una homología del 50 al 100% (si se pueden introducir huecos), a una homología del 60 al 100% (si se incluyen sustituciones conservativas) con un segmento de secuencia de aminoácidos de la Tabla 1. Para los polipéptidos de la invención, las mediciones de homología serán al menos de aproximadamente el 70%, generalmente al menos el 36%, más generalmente al menos el 81%, con frecuencia al menos el 85%, más frecuentemente al menos el 88%, típicamente al menos el 90%, más típicamente al menos el 92%, habitualmente al menos el 94%, más habitualmente al menos el 95%, preferiblemente al menos el 96% y más preferiblemente al menos el 97% y en realizaciones particularmente preferidas, al menos el 98% o más. El grado de homología variará con la longitud de los segmentos comparados. Las proteínas o péptidos homólogos, tales como las variantes alélicas, compartirán la mayoría de las actividades biológicas con las realizaciones descritas en la Tabla 1.

Como se usa en este documento, la expresión “actividad biológica” se usa para describir, sin limitación, efectos sobre respuestas inflamatorias, inmunidad innata y/o desarrollo morfogénico por ligandos similares a citoquina. Por ejemplo, esos receptores mediarían las actividades de la fosfatasa o fosforilasa, actividades que se miden fácilmente mediante procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Hardie, *et al.* (eds. 1995) *The Protein Kinase FactBook* vols. I y II, Academic Press, San Diego, CA; Hanks, *et al.* (1991) *Meth. Enzymol.* 200: 38-62; Hunter, *et al.* (1992) *Cell* 70: 375-388; Lewin (1990) *Cell* 61: 743-752; Pines, *et al.* (1991) *Coll Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 56: 449-463 y Parker, *et al.* (1993) *Nature* 363: 736-738. Los receptores o partes de los mismos, pueden ser útiles como enzimas marcadoras de fosfato para marcar sustratos generales o específicos. Las subunidades también pueden ser inmunógenos funcionales para inducir anticuerpos de reconocimiento o antígenos capaces de unir anticuerpos.

Las expresiones ligando, agonista, antagonista y análogo de, por ejemplo, un DCRS2, incluyen moléculas que modulan las respuestas celulares características a proteínas de ligando de citoquina, así como moléculas que poseen las características de competencia de unión estructural más convencionales de interacciones ligando-receptor, por ejemplo, donde el receptor es un receptor natural o un anticuerpo. Las respuestas celulares probablemente están típicamente mediadas a través de las rutas del receptor tirosina quinasa.

También, un ligando es una molécula que sirve como un ligando natural al cual se une dicho receptor o un análogo del mismo o una molécula que es un análogo funcional del ligando natural. El análogo funcional puede ser un ligando con modificaciones estructurales o puede ser una molécula completamente no relacionada que tenga una forma molecular que interaccione con los determinantes de unión de ligando apropiados. Los ligandos pueden servir como agonistas o antagonistas, véase, por ejemplo, Goodman, *et al.* (eds. 1990) *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Pergamon Press. Nueva York.

El diseño racional de fármacos se puede basar también en estudios estructurales de las formas moleculares de un receptor o anticuerpo y otros efectores o ligandos. Véase, por ejemplo, Herz, *et al.* (1997) *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 17: 671-776 y Chaiken, *et al.* (1996) *Trends Biotechnol.* 14: 369-375. Los efectores pueden ser otras proteínas que son mediadoras de otras funciones en respuesta a unión de ligando u otras proteínas que normalmente interaccionan con el receptor. Un medio para determinar qué sitios interaccionan con otras proteínas específicas es una determinación de estructura física, por ejemplo, cristalografía de rayos x o técnicas de RMN bidimensionales. Estas proporcionarán una guía acerca de cuáles residuos de aminoácidos forman regiones de contacto molecular. Para una descripción detallada de la determinación estructural de proteína, véase, por ejemplo, Blundell y Johnson (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, Nueva York.

II. Actividades

Las proteínas similares a receptor de citoquina tendrán varias actividades biológicas diferentes, por ejemplo, modular la proliferación celular o el metabolismo de fosfato, añadiéndose o retirándose de sustratos específicos, típicamente proteínas. Esto dará como resultado la modulación de una función inflamatoria, otra respuesta inmune innata o un efecto morfológico. La subunidad probablemente tendrá una unión de baja afinidad específica al ligando.

El DCRS2 tiene los motivos característicos de un receptor de señalización a través de la ruta JAK. Véase, por ejemplo, Ihle, *et al.* (1997) *Stem Cells* 15 (supl. 1): 105-111; Silvennoinen, *et al.* (1997) *APMIS* 105: 497-509; Levy (1997) *Cytokine Growth Factor Review* 8: 81-90; Winston y Hunter (1996) *Current Biol.* 6: 668-671; Barrett (1996) *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 10: 1-15 y Briscoe, *et al.* (1996) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 351: 167-171.

Las actividades biológicas de las subunidades de receptor de citoquina estarán relacionadas con la adición o remoción de restos de fosfato a los sustratos, típicamente de una manera específica, pero ocasionalmente de una manera no específica. Los sustratos se pueden identificar o las condiciones para actividad enzimática se pueden ensayar mediante métodos convencionales, por ejemplo, como se ha descrito en Hardie, *et al.* (eds. 1995) *The Protein Kinase FactBook* vols. I y II, Academic Press, San Diego, CA; Hanks, *et al.* (1991) *Meth. Enzymol.* 200: 38-62; Hunter, *et al.* (1992) *Cell* 70: 375-388; Lewin (1990) *Cell* 61: 743-752; Pines, *et al.* (1991) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 56: 449-463 y Parker, *et al.* (1993) *Nature* 363: 736-738.

Las subunidades de receptor se pueden combinar para formar complejos funcionales, por ejemplo, que pueden ser útiles para unir ligando o preparar anticuerpos. Estas tendrán usos de diagnóstico substanciales, que incluyen detección o cuantificación.

III. Ácidos Nucleicos

Esta invención contempla el uso de ácidos nucleicos o fragmentos aislados, por ejemplo, que codifiquen estas proteínas o proteínas estrechamente relacionadas o fragmentos de las mismas, por ejemplo, para codificar un polipéptido correspondiente, preferiblemente uno que sea biológicamente activo. Además, esta invención abarca ADN aislados o recombinantes que codifican combinaciones de tales proteínas o polipéptidos que tienen secuencias características, por ejemplo, de los DCRS2, en la medida en que estén abarcados por las reivindicaciones adjuntas. Típicamente, el ácido nucleico es capaz de hibridación, en condiciones apropiadas, con un segmento de secuencia de ácidos nucleicos mostrado en la Tabla 1, pero preferiblemente no con un segmento correspondiente de otros receptores descritos en la Tabla 3. Dicha proteína o polipéptido biológicamente activo puede ser una proteína de longitud completa o fragmento y típicamente tendrá un segmento de secuencia de aminoácidos altamente homólogo, por ejemplo, que muestra tramos significativos de identidad, a uno mostrado en la Tabla 1. Adicionalmente, esta invención abarca el uso de ácido nucleico aislado o recombinante o fragmentos del mismo, que codifica proteínas que tienen fragmentos que son equivalentes a las proteínas DCRS2, en la medida en que estén abarcados por las reivindicaciones adjuntas. Los ácidos nucleicos aislados pueden tener las secuencias reguladoras respectivas en los flancos 5' y 3', por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de adición poly-A y otros del gen natural. También se proporcionan combinaciones, como se ha descrito.

Un ácido nucleico "aislado" es un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, un ADN o un polímero mixto, que es sustancialmente puro, por ejemplo, separado de otros componentes que acompañan naturalmente a una secuencia nativa, tales como ribosomas, polimerasas y secuencias genómicas flanqueantes de las especies que lo originan. El término abarca una secuencia de ácidos nucleicos que se ha retirado de su ambiente de origen natural e incluye aislados de ADN recombinante o clonado, que de ese modo se pueden distinguir de las composiciones de origen natural y análogos químicamente sintetizados o análogos biológicamente sintetizados por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula completamente o sustancialmente pura.

Un ácido nucleico aislado generalmente será una composición homogénea de moléculas pero, en algunas realizaciones, contendrá heterogeneidad, preferiblemente menor. Esta heterogeneidad se observa típicamente en los extremos del polímero o partes no críticas para una función o actividad biológica deseada.

Un ácido nucleico “recombinante” se define típicamente por su método de producción o su estructura. En referencia a su método de producción, por ejemplo, un producto hecho por un procedimiento, siendo este procedimiento uso de técnicas de ácido nucleico recombinante, por ejemplo, que implica la intervención humana en la secuencia de nucleótidos. Típicamente esta intervención implica manipulación *in vitro*, aunque en determinadas circunstancias puede implicar técnicas de reproducción animal más clásicas. Alternativamente, puede ser un ácido nucleico preparado mediante generación de una secuencia que comprenda fusión de dos fragmentos que no sean naturalmente contiguos entre sí, pero tiene por objeto excluir productos de naturaleza, por ejemplo, mutantes de origen natural como se encuentran en su estado natural. Por tanto, por ejemplo, se contemplan productos preparados mediante transformación de células con un vector que no es de origen natural, como lo son los ácidos nucleicos que comprenden una secuencia obtenida usando cualquier proceso de oligonucleótido sintético. Un proceso de este tipo con frecuencia se realiza para reemplazar un codón con un codón redundante que codifique el mismo o un aminoácido conservativo, aunque típicamente introduciendo o retirando un sitio de reconocimiento de secuencia de enzima de restricción. Alternativamente, el procedimiento se realiza para unir entre sí segmentos de ácido nucleico de funciones deseadas para generar una entidad genética única que comprenda una combinación deseada de funciones que no se observa en las formas naturales disponibles comúnmente, por ejemplo, que codifique una proteína de fusión. Los sitios de reconocimiento de enzima de restricción con frecuencia son la diana de dichas manipulaciones artificiales, pero otras dianas específicas de sitio, por ejemplo, promotores, sitios de replicación de ADN, secuencias de regulación, secuencias de control u otros elementos útiles se pueden incorporar mediante diseño. Un concepto similar se pretende para un polipéptido recombinante, por ejemplo, de fusión. Este incluirá una repetición dimérica. Se incluyen específicamente, en la medida en que los mismos estén abarcados por las reivindicaciones adjuntas, ácidos nucleicos sintéticos que, por redundancia del código genético, codifican polipéptidos equivalentes a fragmentos de DCRS2 y fusiones de secuencias de diversas moléculas relacionadas diferentes, por ejemplo, otros miembros de la familia de receptores de citoquina.

Un “fragmento” en un contexto de ácido nucleico es un segmento contiguo de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente al menos 21 nucleótidos, más generalmente al menos 25 nucleótidos, ordinariamente al menos 30 nucleótidos, más ordinariamente al menos 35 nucleótidos, con frecuencia al menos 39 nucleótidos, más frecuentemente al menos 45 nucleótidos, típicamente al menos 50 nucleótidos, más típicamente al menos 55 nucleótidos, habitualmente al menos 60 nucleótidos, más habitualmente al menos 66 nucleótidos, preferiblemente al menos 72 nucleótidos, más preferiblemente al menos 79 nucleótidos y en casos particulares será de al menos 85 o más nucleótidos. Típicamente, se pueden comparar fragmentos de secuencias genéticas diferentes unos con otros en tramos de longitud apropiada, segmentos particularmente definidos tales como los dominios que se describen más adelante.

Un ácido nucleico que codifica el DCRS2 será particularmente útil para identificar genes, especies de ARNm y ADNc que se codifican a sí mismas o a proteínas estrechamente relacionadas, así como ADN que codifican variantes polimórficas, alélicas u otras variantes genéticas, por ejemplo, a partir de individuos diferentes o especies relacionadas. Sondas preferidas para tales selecciones son las regiones de la interleuquina que se conservan entre variantes polimórficas diferentes o que contienen nucleótidos que carecen de especificidad y preferiblemente serán de longitud completa o casi completa. En otras situaciones, las secuencias específicas de variantes polimórficas serán más útiles.

Esta invención abarca además, en la medida en los mismos estén abarcados por las reivindicaciones adjuntas, moléculas y fragmentos de ácido nucleico recombinante que tienen una secuencia de ácido nucleico idéntica a o altamente homóloga al ADN aislado que se expone en este documento. En particular, las secuencias con frecuencia estarán unidas funcionalmente a segmentos de ADN que controlan la transcripción, la traducción y la replicación de ADN. Estos segmentos adicionales típicamente ayudarán a la expresión del segmento de ácido nucleico deseado.

Secuencias de ácidos nucleicos homólogas o altamente idénticas, cuando se comparan unas con otras, por ejemplo, secuencias de DCRS2, muestran similitud significativa. Los convencionales para homología en ácidos nucleicos son mediciones de homología usadas generalmente en la técnica por comparación de secuencias o basadas en condiciones de hibridación. Las condiciones de hibridación comparativas se describen con mayor detalle más adelante.

La identidad sustancial en el contexto de comparación de secuencias de ácidos nucleicos significa que los segmentos o sus hebras complementarias, cuando se comparan, son idénticos cuando se alinean de forma óptima, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 60% de los nucleótidos, generalmente al menos el 66%, ordinariamente al menos el 71%, con frecuencia al menos el 76%, más frecuentemente al menos el 80%, habitualmente al menos el 84%, más habitualmente al menos el 88%, típicamente al menos el 91%, más típicamente al menos aproximadamente el 93%, preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 96 al 98% o más y, en realizaciones particulares, tan alta como aproximadamente el 99% o más de los nucleótidos, incluyendo, por ejemplo, segmentos que codifican dominios estructurales tales como los segmentos que se describen más adelante. De forma alternativa, la identidad sustancial existirá cuando los segmentos se hibriden en condiciones de hibridación selectiva, a una hebra o su complemento, típicamente usando una secuencia obtenida de la Tabla 1. Típicamente, como se describe en este documento, la hibridación selectiva ocurrirá cuando exista una homología de al menos el 55% a lo largo de un tramo de al menos aproximadamente 14 nucleótidos, más típicamente de al menos aproximadamente el 65%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 75% y más preferiblemente de al menos aproximadamente el 90%. Véase, Kanehisa (1984) Nucl. Acids Res. 12: 203-213. La longitud de comparación de homología, como se ha descrito, puede ser a lo largo de tramos más largos y en determinadas realizaciones será a lo largo de un tramo de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente de al menos aproximadamente 20 nucleótidos, ordinariamente de al menos aproximadamente 24 nucleótidos, habitualmente de al menos aproximadamente 28 nucleótidos, típicamente de al menos aproximadamente 32 nucleótidos, más típicamente

de al menos aproximadamente 40 nucleótidos, preferiblemente de al menos aproximadamente 50 nucleótidos y más preferiblemente al menos aproximadamente de 75 a 100 o más nucleótidos. Esto incluye, por ejemplo, 125, 150, 175, 200, 225, 246, 273 y otras longitudes.

- 5 Condiciones rigurosas, con referencia a homología en el contexto de hibridación, serán condiciones rigurosas combinadas de sal, temperatura, solventes orgánicos y otros parámetros típicamente controlados en reacciones de hibridación. Las condiciones de temperatura rigurosas habitualmente incluirán temperaturas de más de aproximada-
 10 mente 30°C, más habitualmente de más de aproximadamente 37°C, típicamente de más de aproximadamente 45°C, más típicamente de más de aproximadamente 55°C, preferiblemente de más de aproximadamente 65°C y más pre-
 feriblemente de más de aproximadamente 70°C. Las condiciones rigurosas de sal ordinariamente serán menores de
 aproximadamente 500 mM, habitualmente menores de 400 mM, más habitualmente menores de aproximadamente
 300 mM, típicamente menores de aproximadamente 200 mM, preferiblemente menores de aproximadamente 100 mM
 y más preferiblemente menores de aproximadamente 80 mM, incluso hasta menores de aproximadamente 20 mM.
 Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medición de cualquier parámetro único.
 15 Véase, por ejemplo, Wetmur y Davidson (1968) *J. Mol. Biol.* 31: 349-370.

- El ADN aislado se puede modificar fácilmente mediante sustituciones de nucleótidos, deleciones de nucleótidos,
 inserciones de nucleótidos e inversiones de tramos de nucleótidos. Estas modificaciones dan como resultado secu-
 encias de ADN nuevas que codifican esta proteína o sus derivados. Estas secuencias modificadas se pueden usar para
 20 producir proteínas mutantes (mutéínas) o para mejorar la expresión de especies variantes. La expresión mejorada
 puede implicar amplificación génica, transcripción aumentada, traducción aumentada y otros mecanismos. Tales de-
 rivados similares a DCRS2 mutantes incluyen mutaciones predeterminadas o específicas de sitio de la proteína o sus
 fragmentos, que incluyen mutaciones silenciosas usando código genético degenerado. "DCRS2 mutante" como se usa
 en este documento, abarca un polipéptido que cae de otra manera dentro de la definición de homología del DCRS2
 25 como se ha expuesto anteriormente, pero que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de otras proteínas
 similares a receptor de citoquina como se encuentra en la naturaleza a modo de deleción, sustitución o inserción. En
 particular, "DCRS2 mutante específico de sitio" abarca una proteína que tiene una identidad de secuencia sustancial
 con una proteína de la Tabla 1 y típicamente comparte la mayoría de las actividades o efectos biológicos de las formas
 descritas en este documento.

- 30 Aunque los sitios de mutación específica de sitio son predeterminados, los mutantes no necesitan ser específicos de
 sitio. La mutagénesis de DCRS2 de mamífero se puede conseguir realizando inserciones o deleciones de aminoácidos
 en el gen, acopladas con expresión. Las sustituciones, deleciones, inserciones o muchas combinaciones se pueden
 generar para llegar a una construcción final. Las inserciones incluyen fusiones amino-terminal o carboxi-terminal.
 35 La mutagénesis aleatoria se puede conducir en un codón diana y los mutantes de DCRS2 de mamífero expresados
 se pueden seleccionar para la actividad deseada, proporcionando algún aspecto de una relación estructura-actividad.
 Los métodos para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tienen una secuencia
 conocida son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por mutagénesis de cebador M13. Véase también Sambrook,
et al. (1989) y Ausubel, *et al.* (1987 y suplementos periódicos).

- 40 Las mutaciones en el ADN normalmente no colocarían secuencias codificantes fuera de las fases de lectura y prefe-
 riblemente no crearían regiones complementarias que pudieran hibridar para producir estructura de ARNm secundaria
 tales como bucles o pasadores.

- 45 El método de fosforamidita descrito por Beaucage y Carruthers (1981) *Tetra. Letts.* 22: 1859-1862, producirá
 fragmentos de ADN sintéticos adecuados. Con frecuencia se obtendrá un fragmento bicatenario sintetizando la hebra
 complementaria e hibridando la hebra consigo misma en condiciones apropiadas o añadiendo la hebra complementaria
 usando ADN polimerasa con una secuencia de cebador apropiada.

- 50 Las técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) con frecuencia se pueden aplicar en mutagénesis. Alter-
 nativamente, los cebadores de mutagénesis son métodos usados comúnmente para generar mutaciones definidas en
 sitios predeterminados. Véase, por ejemplo., Innis, *et al.* (eds. 1990) *PCR Protocols: A Guide to methods and Appli-
 cations* Academic Press, San Diego, CA y Dieffenbach y Dveksler (1995; eds.) *PCR Primer: A Laboratory Manual*
 Cold Spring Harbor Press, CSH, NY.

- 55 Ciertas realizaciones de la invención se dirigen a composiciones de combinación que comprenden las secuencias
 de receptor o ligando descritas, en la medida en que las mismas estén abarcadas por las reivindicaciones adjuntas. En
 otras realizaciones, se pueden unir partes funcionales de las secuencias para codificar proteínas de fusión. En otras
 formas, se pueden sustituir variantes de las secuencias descritas.

60 IV. Proteínas, Péptidos

- Como se ha descrito anteriormente, la presente invención abarca DCRS2 de primate, por ejemplo, cuyas secuencias
 se describen en la Tabla 1 y se han descrito anteriormente. También se contemplan variantes alélicas y otras varian-
 65 tes que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que combinan partes de tales secuencias con otras, incluyendo,
 por ejemplo, etiquetas de epítipo y dominios funcionales, en la medida en que las mismas estén abarcadas por las
 reivindicaciones adjuntas.

La presente invención también proporciona proteínas recombinantes, por ejemplo, proteínas de fusión heterólogas usando segmentos de esas proteínas de primate. Una proteína de fusión heteróloga es una fusión de proteínas o segmentos que naturalmente no están normalmente fusionadas de la misma manera. Por tanto, el producto de fusión de un DCRS2 con otro receptor de citoquina es una molécula de proteína continua que tiene secuencias fusionadas en un enlace peptídico típico, típicamente hecho como un producto de traducción único y que muestra propiedades, por ejemplo, secuencia y antigenicidad, obtenidas de cada péptido de fuente. Un concepto similar se aplica a secuencias de ácidos nucleicos heterólogos. También se proporcionan combinaciones de diversas proteínas designadas en complejos.

Además, se pueden realizar nuevas construcciones combinando dominios funcionales o estructurales similares de otras proteínas relacionadas, por ejemplo, receptores de citoquina o receptores similares a Toll, que incluyen variantes de especie. Por ejemplo, se pueden “intercambiar” segmentos unión de ligandos u otros segmentos entre diferentes polipéptidos o fragmentos de fusión nuevos. Véase, por ejemplo, Cunningham, *et al.* (1989) *Science* 243: 1330-1336 y O’Dowd, *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 15985-15992. Por tanto, se producirán nuevos polipéptidos quiméricos que muestran nuevas combinaciones de especificidades a partir del enlace funcional de especificidades de unión de receptor. Por ejemplo, los dominios de unión de ligando de otras moléculas receptoras relacionadas se pueden añadir o se pueden sustituir por otros dominios de éstas o proteínas relacionadas. La proteína resultante con frecuencia tendrá función y propiedades híbridas. Por ejemplo, una proteína de fusión puede incluir un dominio de dirección que puede servir para proporcionar el secuestro de la proteína de fusión a un organelo subcelular particular.

Se pueden seleccionar parejas y secuencias de fusión candidatas de diversas bases de datos de secuencias, por ejemplo, GenBank, c/o IntelliGenetics, Mountain View, CA y BCG, University of Wisconsin Biotechnology Computing Group, Madison, WI., que se incorporan cada una en este documento como referencia. En particular, son particularmente preferidas las combinaciones de secuencias de polipéptido proporcionadas en las Tablas 1 y 3. Se pueden sustituir formas variantes de las proteínas en las combinaciones descritas.

La presente invención particularmente proporciona muteínas que unen ligandos similares a citoquina y/o que se influyen en la transducción de señal. La alineación estructural de DCRS2 humano con otros miembros de la familia de receptores de citoquina muestra características/residuos conservados. Véase la Tabla 3. La alineación de la secuencia de DCRS2 humana con otros miembros de la familia de receptores de citoquina indica diversas características compartidas estructural y funcionalmente. Véase también 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.

Son particularmente preferidas sustituciones con secuencias de ratón o secuencias humanas. Por el contrario, sustituciones conservativas lejanas de las regiones de interacción de unión de ligando probablemente conservarán la mayoría de las actividades de señalización y sustituciones conservativas lejanas de los dominios intracelulares probablemente conservarán la mayoría de las propiedades de unión de ligando.

“Derivados” del receptor DCRS2 de primate incluyen mutantes de secuencia de aminoácidos, variantes de glicosilación, derivados metabólicos y conjugados covalentes o agregativos con otros restos químicos. Los derivados covalentes se pueden preparar mediante enlace de funcionalidades a grupos que se encuentran en las cadenas laterales de aminoácidos de DCRS2 o en los grupos N-terminal o C-terminal, por ejemplo, por medios que son conocidos en la técnica. Estos derivados pueden incluir, sin limitación, ésteres o amidas alifáticas del extremo carboxilo o de residuos que contienen cadenas laterales de carboxilo derivados, derivados O-acilo de residuos que contienen grupo hidroxilo y derivados N-acilo de los residuos que contienen aminoácidos amino terminal o grupo amino, por ejemplo, lisina o arginina. Los grupos acilo se seleccionan entre el grupo de restos alquilo, que incluyen alquilo normal de C3 a C18, formando de este modo especies alcanol aroilo.

En particular, se incluyen alteraciones de glicosilación, por ejemplo, realizadas modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales. Los medios particularmente preferidos para conseguir esto son exponiendo el polipéptido a enzimas glicosilantes obtenidas de células que normalmente proporcionan tal procesamiento, por ejemplo, enzimas de glicosilación de mamíferos. También se contemplan enzimas de deglicosilación. También se incluyen versiones de la misma secuencia de aminoácidos primaria que tienen otras modificaciones menores, que incluyen residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

Un grupo importante de derivados son los conjugados covalentes de los receptores o fragmentos de los mismos con otras proteínas de polipéptidos. Estos derivados se pueden sintetizar en cultivo recombinante tal como fusiones en N-terminal o C-terminal o mediante el uso de agentes conocidos en la técnica por su utilidad en proteínas de entrecruzamiento a través de grupos laterales reactivos. Los sitios de derivación preferidos con agentes de entrecruzamiento están en grupos amino libres, restos de carbohidratos y residuos de cisteína.

También se proporcionan polipéptidos de fusión entre los receptores y otras proteínas homólogas o heterólogas. Los polipéptidos homólogos pueden ser fusiones entre receptores diferentes, dando como resultado, por ejemplo, una proteína híbrida que muestra especificidad de unión para múltiples ligandos de citoquina diferentes o un receptor que pueda tener especificidad ampliada o debilitada de efecto de sustrato. Análogamente, se pueden construir fusiones heterólogas que presenten una combinación de propiedades o actividades de las proteínas derivadas. Ejemplos típicos son fusiones de un polipéptido indicador, por ejemplo, luciferasa, con un segmento o dominio de un receptor, por

ejemplo, un segmento de unión de ligando, para que la presencia o emplazamiento de un ligando deseado se pueda determinar fácilmente. Véase, por ejemplo, Dull, *et al.*, Patente de EE.UU. N° 4.859.609. Otras parejas de fusión génica incluyen glutatión-S-transferasa (GST), β -galactosidasa bacteriana, trpE, proteína A, β -lactamasa, alfa amilasa, alcohol deshidrogenasa y factor de acoplamiento alfa de levadura. Véase, por ejemplo, Godowski, *et al.* (1988) Science 241: 812-816. Las proteínas marcadas con frecuencia se sustituirán en las combinaciones de proteínas descritas.

El método de fosforamidita descrito por Beaucage y Carruthers (1981) Tetra. Letts. 22: 1859-1862, producirá fragmentos de ADN sintéticos adecuados. Con frecuencia se obtendrá un fragmento bicatenario sintetizando la hebra complementaria e hibridando la hebra en condiciones apropiadas o añadiendo la hebra complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia de cebador apropiada.

Tales polipéptidos también pueden tener residuos de aminoácidos que se han modificado químicamente por fosforilación, sulfonación, biotilación o la adición o remoción de otros restos, particularmente los que tienen formas moleculares similares a grupos fosfato. En algunas realizaciones, las modificaciones serán reactivos marcadores útiles o sirven como dianas de purificación, por ejemplo, ligandos de afinidad.

Las proteínas de fusión típicamente se prepararán por métodos de ácido nucleico recombinante o por métodos de polipéptido sintético. Técnicas para manipulación y expresión de ácidos nucleicos se describen en general, por ejemplo, en Sambrook, *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory y Ausubel, *et al.* (eds. 1987 y suplementos periódicos) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, Nueva York, que se incorporan en este documento como referencia. Las técnicas para síntesis de polipéptidos se describen, por ejemplo, en Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2156; Merrifield (1986) Science 232: 341-347 y Atherton, *et al.* (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford. Véase también Dawson, *et al.* (1994) Science 266: 776-779 para métodos para preparar polipéptidos más grandes.

Esta invención también contempla el uso de derivados de un DCRS2 distintos a variaciones en la secuencia de aminoácidos o glicosilación. Tales derivados pueden implicar asociación covalente o agregativa con restos químicos. Estos derivados generalmente caen en tres clases: (1) sales, (2) modificaciones covalentes de residuos de cadena lateral y terminales y (3) complejos de adsorción, por ejemplo con membranas celulares. Dichos derivados covalentes o agregativos son útiles como inmunógenos, como reactivos en inmunoensayos o en métodos de purificación tales como para purificación de afinidad de un receptor u otra molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo. Por ejemplo, se puede inmovilizar un ligando de citoquina por unión covalente a un soporte sólido tal como Sefarosa activada con bromuro de cianógeno, mediante métodos que son bien conocidos en la técnica o adsorber sobre superficies de poliolefina, con o sin entrecruzamiento de glutaraldehído, para uso en el ensayo o purificación de un receptor de citoquina, anticuerpos u otras moléculas similares. El ligando también se puede marcar con un grupo detectable, por ejemplo tratado con radioyodo por el procedimiento de cloramina T, unida covalentemente a quelatos de tierras raras o conjugado a otro resto fluorescente para usarse en ensayos de diagnóstico.

Se puede usar una combinación, por ejemplo, que incluye un DCRS2 de esta invención como un inmunógeno para la producción de antisueros o anticuerpos específicos, por ejemplo, capaces de distinguir entre otros miembros de la familia de receptores de citoquina, para la combinación descrita. Los complejos se pueden usar para seleccionar anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno preparados por inmunización con diversas formas de preparaciones impuras que contienen la proteína. En particular, el término "anticuerpos" también abarca fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos naturales, por ejemplo, Fab, Fab2, Fv, etc. El DCRS2 purificado también se puede usar como un reactivo para detectar anticuerpos generados en respuesta a la presencia de niveles elevados de expresión o trastornos inmunológicos que conducen a la producción de anticuerpos al receptor endógeno. Adicionalmente, fragmentos de DCRS2 también pueden servir como inmunógenos para producir los anticuerpos de la presente invención, como se ha descrito inmediatamente más adelante, en la medida en que los mismos estén abarcados por las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, esta invención contempla anticuerpos que tienen afinidad de unión a o que son generados contra las secuencias de aminoácidos mostradas en la Tabla 1, fragmentos de las mismas o diversos péptidos homólogos. En particular, esta invención contempla anticuerpos que tienen afinidad de unión a o que se han generados contra fragmentos específicos que se pronostica que son o que realmente se exponen en la superficie exterior del DCRS2 nativo. Complejos de combinaciones de proteínas también serán útiles y se pueden realizar preparaciones de anticuerpos para los mismos.

Se puede producir el bloqueo de respuesta fisiológica a los ligandos de receptor a partir de la inhibición de unión de ligando al receptor, probablemente a través de inhibición competitiva. Por tanto, los ensayos *in vitro* de la presente invención con frecuencia usarán anticuerpos o segmentos de unión a antígeno de estos anticuerpos o fragmentos unidos a sustratos de fase sólida. Estos ensayos también permitirán la determinación de diagnóstico de los efectos de mutaciones y modificaciones de región de unión a ligando u otras mutaciones y modificaciones, por ejemplo, que afectan la función de señalización o enzimática.

Esa invención también contempla el uso de ensayos de selección de fármaco competitivos, por ejemplo, donde anticuerpos neutralizantes para los complejos o fragmentos de receptor compiten con un compuesto de ensayo para unirse a un ligando o a otro anticuerpo. De esta manera, los anticuerpos o fragmentos neutralizantes se pueden usar para detectar la presencia de un polipéptido que comparta uno o más sitios de unión a un receptor y también se pueden usar para ocupar sitios de unión sobre un receptor que de otra manera pudiera unirse a un ligando.

V. Preparación de Ácidos Nucleicos y Proteínas

Se pueden obtener ADN que codifica la proteína o fragmentos de la misma mediante síntesis química, selección de genotecas de ADNc o seleccionando genotecas genómicas preparadas a partir de una amplia variedad de líneas celulares o muestras de tejido. Se pueden aislar secuencias naturales usando métodos convencionales y las secuencias que se proporcionan en este documento, por ejemplo, en la Tabla 1. Se pueden identificar otros homólogos de especie mediante técnicas de hibridación o por diversas técnicas de PCR, combinadas con o buscando en bases de datos de secuencias, por ejemplo, GenBank.

Este ADN se puede expresar en una amplia variedad de células hospedadoras para la síntesis de un receptor de longitud completa o fragmentos que a su vez, por ejemplo, se pueden usar para generar anticuerpos policlonales o monoclonales; para estudios de unión; para construcción y expresión de unión de ligando modificada o dominios de quinasa/fosfatasa y para estudios de estructura/función. Se pueden expresar variantes o fragmentos en células hospedadoras que se transforman o transfectan con vectores de expresión apropiados. Estas moléculas pueden estar sustancialmente libres de proteína o contaminantes celulares, diferentes a los obtenidos del hospedador recombinante y, por lo tanto, son particularmente útiles en las composiciones farmacéuticas cuando se combinan con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. La proteína o partes de la misma, se pueden expresar como fusiones con otras proteínas. Combinaciones de las proteínas descritas o ácidos nucleicos que las codifican, son particularmente interesantes.

Los vectores de expresión son típicamente construcciones de ADN o ARN de autorreplicación que contienen el gen receptor deseado o sus fragmentos, habitualmente unidos funcionalmente a elementos de control genético adecuados que se reconocen en una célula hospedadora adecuada. Estos elementos de control son capaces de lograr expresión dentro de un hospedador adecuado. Los genes múltiples se pueden expresar de forma coordinada y pueden estar en un mensaje policistrónico. El tipo específico de elementos de control necesario para lograr expresión dependerá de la célula hospedadora final usada. Generalmente, los elementos de control genético pueden incluir un sistema de promotor procariota o un sistema de control de expresión de promotor eucariota y típicamente incluyen un promotor transcripcional, un operador opcional para controlar el inicio de la transcripción, potenciadores de transcripción para elevar el nivel de expresión de ARNm, una secuencia que codifica un sitio de unión a ribosoma adecuado y secuencias que terminan la transcripción y traducción. Los vectores de expresión también contendrán habitualmente un origen de replicación que permite que el vector se replique independientemente de la célula hospedadora.

Los vectores de esta invención incluyen los que contienen ADN que codifica una combinación de proteínas, como se ha descrito o un polipéptido equivalente biológicamente activo, en la medida en que los mismos estén abarcados por las reivindicaciones adjuntas. El ADN puede estar bajo el control de un promotor viral y puede codificar un marcador de selección. Esta invención contempla además el uso de tales vectores de expresión que son capaces de expresar ADNc eucariotas que codifican tales proteínas en un hospedador procariota o eucariota, donde el vector es compatible con la célula hospedadora y donde los ADNc eucariotas se insertan en el vector para que el crecimiento de la célula hospedadora que contiene el vector exprese los ADNc en cuestión. Habitualmente, los vectores de expresión se diseñan para replicación estable en sus células hospedadoras o para amplificación para aumentar enormemente el número total de copias del gen deseables por célula. No siempre es necesario requerir que un vector de expresión se replique en una célula hospedadora, por ejemplo, es posible lograr expresión transitoria de la proteína o sus fragmentos en diversos hospedadores usando vectores que no contienen un origen de replicación que se reconoce por la célula hospedadora. También es posible usar vectores que produzcan integración de las partes codificantes de proteína en el ADN de la célula hospedadora o mediante recombinación.

Como se usa en este documento, los vectores comprenden plásmidos, virus, bacteriófagos, fragmentos de ADN integrables y otros vehículos que permiten la integración de fragmentos de ADN en el genoma de la célula hospedadora. Los vectores de expresión son vectores especializados que contienen elementos de control genético que logran la expresión de genes unidos funcionalmente. Los plásmidos son la forma más comúnmente usada de vector pero todas las otras formas de vectores que tienen una función equivalente y que son o llegan a ser conocidas en la técnica son adecuadas para uso en este documento. Véase, por ejemplo, e. g., Pouwels, *et al.*, (1985 y Suplementos) Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., y Rodríguez, *et al.*, (eds 1988) Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butherswoth, Boston.

Las células transformadas son células, preferiblemente de mamífero, que se han transformado o transfectado con vectores contruidos usando técnicas de ADN recombinante. Las células hospedadoras transformadas habitualmente expresan las proteínas deseadas, pero para propósitos de clonación, amplificación y manipulación de su ADN, no necesitan expresar las proteínas objeto. Esta invención contempla además cultivar células transformadas en un medio de nutrientes, permitiendo de este modo que se acumulen las proteínas. Las proteínas se pueden recuperar a partir del cultivo o, en determinados casos, a partir del medio de cultivo.

Para propósitos de esta invención, las secuencias de ácidos nucleicos están unidas funcionalmente cuando están relacionadas funcionalmente unas con otras. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido funcionalmente a un polipéptido si se expresa como una preproteína o participa en la dirección del polipéptido a la membrana celular o en la secreción del polipéptido. Un promotor está unido funcionalmente a una secuencia codificante si controla la transcripción del polipéptido; un sitio de unión al ribosoma está unido funcionalmente a una secuencia codificante si está colocado para permitir la traducción. Habitualmente, unido funcionalmente significa contiguos y en

fase de lectura, sin embargo, determinados elementos genéticos tales como genes represores no están unidos de forma contigua pero se unen a secuencias de operador que a su vez controlan la expresión.

Las células hospedadoras adecuadas incluyen células procariotas, eucariotas inferiores y eucariotas superiores. Las procariotas incluyen organismos tanto gram negativos como gram positivos, por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*. Las eucariotas inferiores incluyen levaduras, por ejemplo, *S. cerevisiae* y *Pichia* y especies del género *Dictyostelium*. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares de cultivo de tejido establecidas de células animales, tanto de origen no mamífero, por ejemplo, células de insectos y aves, como de origen mamífero, por ejemplo, seres humanos, primates y roedores.

Los sistemas de hospedador procariota-vector incluyen una amplia variedad de vectores para muchas especies diferentes. Como se usa en este documento, *E. coli* y sus vectores se usarán genéricamente para incluir vectores equivalentes usados en otros procariotas. Un vector representativo para amplificar ADN es pBR322 o muchos de sus derivados. Los vectores que se pueden usar para expresar el receptor o sus fragmentos incluyen, pero no se limitan a, vectores tales como los que contienen el promotor lac (serie pUC); promotor trp (pBR322-trp); promotor Ipp (la serie pIN); promotores lambda-pP o pR (pOTS) o promotores híbridos tales como ptac (pDR540). Véase Brosius, *et al.* (1988) "Expression Vectors Employing Lambda-, trip-, lac-, and Ipp-derived Promoters", en *Vectors: A. Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, (eds. Rodríguez y Denhardt), Butterworth, Boston, Charter 10, págs. 205-236.

Los eucariotas inferiores, por ejemplo, levaduras y *Dictyostelium*, se pueden transformar con vectores que contienen secuencia DCRS2. Para propósitos de esta invención, el hospedador eucariota inferior más común es la levadura del pan, *Saccharomyces cerevisiae*. Se usará para representar genéricamente eucariotas inferiores aunque también están disponibles varias cepas y especies diferentes. Los vectores de levadura típicamente consisten en un origen de replicación (excepto el de tipo integrador), un gen de selección, un promotor, ADN que codifica el receptor o sus fragmentos y secuencias para terminación de traducción, poliadenilación y terminación de transcripción. Los vectores de expresión adecuados para levadura incluyen los promotores constitutivos tales como 3-fosfoglicerato quinasa y diversos promotores de gen de enzima glicolítica diferentes o promotores inducibles tales como el promotor de la alcohol deshidrogenasa 2 o promotor de metalotionina. Vectores adecuados incluyen derivados de los siguientes tipos: número de copia bajo de auto-replicación (tal como la serie YRp), número de copia alto de auto-replicación (tal como la serie YEpl); tipos de integración (tales como la serie YIp) o mini cromosomas (tales como la serie YCp).

Las células de cultivo del tejido eucariotas superiores normalmente son las células hospedadoras preferidas para expresión de las proteínas de interleuquina o receptoras funcionalmente activas. En principio, muchas líneas celulares de cultivo de tejido eucariota superior son viables, por ejemplo, sistemas de expresión de baculovirus de insecto a partir de una fuente de invertebrados o de vertebrados. Sin embargo, se prefieren las células de mamífero. La transformación o transfección y propagación de tales células se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas celulares útiles incluyen las células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster Chino (CHO), líneas celulares de riñón de rata bebé (BRK), líneas celulares de insecto, líneas celulares de ave y líneas celulares de mono (COS). Los vectores de expresión de tales líneas celulares habitualmente incluyen un origen de replicación, un promotor, un sitio de iniciación de traducción, sitios de empalme de ARN (si se usa ADN genómico), un sitio de poliadenilación y un sitio de terminación de transcripción. Esos vectores también contienen habitualmente un gen de selección o gen de amplificación. Los vectores de expresión adecuados pueden ser plásmidos, virus o retrovirus que portan promotores obtenidos, por ejemplo, de fuentes tales como adenovirus, SV40, parvovirus, virus de vaccinia o citomegalovirus. Ejemplos representativos de vectores de expresión adecuados incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama, *et al.*, (1985) *Mol. Cell Biol.* 5: 1136-1142; pMCIneo PolyA, véase Thomas, *et al.*, (1987) *Cell.* 51: 503-512 y un vector de baculovirus tal como pAC 373 o pAC 610.

Para proteínas secretadas y algunas proteínas de membrana, una fase de lectura abierta habitualmente codifica un polipéptido que consiste en un producto maduro o secretado enlazado covalentemente en su extremo N, a un péptido de señal. El péptido de señal se escinde antes de la secreción del polipéptido maduro o activo. El sitio de escisión se puede predecir con un alto grado de precisión a partir de reglas empíricas, por ejemplo, von-Heijne (1986) *Nucleic Acids Research* 14: 4683-4690 y Nielsen, *et al.*, (1997) *Protein Eng.* 10: 1-12 y la composición precisa de aminoácidos del péptido de señal con frecuencia no parece ser crítica para su función, por ejemplo, Randall *et al.*, (1989) *Science* 243: 1156-1159; Kaiser *et al.*, (1987) *Science* 235: 312-317. Las proteínas maduras de la invención se pueden determinar fácilmente usando métodos convencionales.

Con frecuencia se deseará expresar estos polipéptidos en un sistema que proporcione un patrón de glicosilación específico o definido. En este caso, el patrón habitual será el proporcionado naturalmente por el sistema de expresión. Sin embargo, el patrón será modificable exponiendo el polipéptido, por ejemplo, una forma no glicosilada, a proteínas glicosilantes apropiadas introducidas en un sistema de expresión heterólogo. Por ejemplo, el gen receptor se puede cotransformar con uno o más genes que codifican enzimas glicosilantes de mamífero o de otro tipo. Usando este enfoque, se conseguirán determinados patrones de glicosilación de mamífero en células procariotas o de otro tipo. La expresión en células procariotas típicamente conducirá a formas no glicosiladas de proteína.

La fuente de DCRS2 puede ser una célula hospedadora eucariota o procariota que exprese DCRS2 recombinante, tal como se ha descrito anteriormente. La fuente también puede ser una línea celular, pero otras líneas celulares de mamífero también se contemplan en esta invención, siendo la línea celular preferida la de la especie humana.

Ahora que se conocen las secuencias, se pueden preparar DCRS2 de primates, fragmentos o derivados de los mismos mediante procesos convencionales para sintetizar péptidos. Estos incluyen procesos tales como los que se describen 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, Nueva York; y Bodanszky (1984) *The Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Nueva York. Por ejemplo, se puede usar un proceso de azida, un proceso de cloruro ácido, un proceso de anhídrido ácido, un proceso de anhídrido mixto, un proceso de éster activo (por ejemplo, éster de p-nitrofenílico, éster de N-hidroxisuccinimida o éster de cianometilo), un proceso de carbodimidazol, un proceso oxidativo-reductor o un proceso de dicitiosil-carbodiimida (DCCD)/aditivo. La síntesis de fase sólida y de fase de solución son ambas aplicables a los procesos anteriores. Se pueden usar técnicas similares con secuencias de DCRS2 parciales.

Las proteínas fragmentos o derivados de DCRS2 se preparan adecuadamente de acuerdo con los procesos anteriores como se emplea típicamente en síntesis peptídica, generalmente por un proceso denominado por etapas que comprende condensar un aminoácido al aminoácido terminal, uno por uno en secuencia o por acoplamiento de péptidos al aminoácido terminal. Los grupos amino que no se están usando en la reacción de acoplamiento típicamente se tienen que proteger para evitar el acoplamiento en un sitio incorrecto.

Si se adopta una síntesis de fase sólida, el aminoácido C-terminal está unido a un vehículo o soporte insoluble a través de su grupo carboxilo. El vehículo insoluble no está particularmente limitado mientras tenga una capacidad de unión a un grupo carboxilo reactivo. Los ejemplos de tales vehículos insolubles incluyen resinas de halogenometilo, tales como resinas de clorometilo o resina de bromometilo, resinas de hidroximetilo, resinas fenólicas, resinas terci-alquiloxycarbonilohidrazidadas y similares.

Un aminoácido protegido con grupo amino se une en secuencia a través de condensación de su grupo carboxilo activado y el grupo amino reactivo del péptido o cadena formada previamente, para sintetizar el péptido etapa a etapa. Después de sintetizar la secuencia completa, el péptido se divide del vehículo insoluble para producir el péptido. Este enfoque de fase sólida se describe en general en Merrifield, *et al.*, (1963) in *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2156.

La proteína preparada y fragmentos de la misma se pueden aislar y purificar a partir de la mezcla de reacción por medio de separación de péptidos, por ejemplo, por extracción, precipitación, electroforesis, diversas formas de cromatografía y similares. Los receptores de esta invención se pueden obtener en grados variables de pureza dependiendo de los usos deseados. La purificación se puede conseguir mediante el uso de técnicas de purificación de proteína descritas en este documento, véase más adelante o mediante el uso de los anticuerpos descritos en este documento en métodos de cromatografía de afinidad inmunoabsorbente. Esta cromatografía de afinidad inmunoabsorbente se lleva a cabo enlazando en primer lugar los anticuerpos a un soporte sólido y después poniendo en contacto los anticuerpos enlazados con lisados solubilizados de células apropiadas, lisados de otras células que expresan el receptor o lisados o sobrenadantes de células que producen proteína como resultado de técnicas de ADN, véase más adelante.

En general, la proteína purificada será al menos aproximadamente el 40% pura, ordinariamente al menos aproximadamente el 50% pura, habitualmente al menos aproximadamente el 60% pura, típicamente al menos aproximadamente el 70% pura, más típicamente al menos aproximadamente el 80% pura, preferiblemente al menos aproximadamente el 90% pura y más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% pura y en realizaciones particulares, del 97%-99% o más. La pureza será habitualmente sobre una base en peso, pero también puede ser sobre una base molar. Se aplicarán diferentes ensayos según sea apropiado. Proteínas individuales se pueden purificar y combinar a partir de entonces.

VI. Anticuerpos

Se pueden generar anticuerpos para las diversas proteínas DCRS2 de mamífero, por ejemplo, de primate y fragmentos de las mismas, tanto en formas nativas de origen natural como en sus formas recombinantes, siendo la diferencia que es más probable que los anticuerpos para el receptor activo reconozcan epítomos que sólo están presentes en conformaciones nativas. La detección de antígeno desnaturalizado también puede ser útil, por ejemplo, en análisis de Western. También se contemplan anticuerpos anti-idiotípicos, que serían útiles como agonistas o antagonistas de un receptor natural o un anticuerpo.

Los anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión y versiones de cadena única, contra fragmentos predeterminados de la proteína se pueden generar por inmunización de animales con conjugados de los fragmentos con proteínas inmunógenas. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de células que secretan el anticuerpo deseado. Estos anticuerpos se pueden seleccionar para unión a proteína normal o defectuosa o seleccionar para actividad agonista o antagonista. Estos anticuerpos monoclonales habitualmente se unirán con al menos un K_D de aproximadamente 1 mM, más habitualmente de al menos aproximadamente 300 μ M, típicamente de al menos aproximadamente 100 μ M, más típicamente de al menos aproximadamente 30 μ M, preferiblemente de al menos aproximadamente 10 μ M y más preferiblemente de al menos aproximadamente 3 μ M o mejor.

Los anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión a antígeno, de esta invención pueden tener valor diagnóstico o terapéutico significativo. Los mismos pueden ser antagonistas potentes que se unen al receptor e inhiben la unión al ligando o inhiben la capacidad del receptor para provocar una respuesta biológica, por ejemplo, actuar sobre su sustrato. Estos también pueden ser útiles como anticuerpos no neutralizantes y se pueden acoplar a toxinas o radionúclidos

para unirse a células productoras o células localizadas hacia la fuente de la interleuquina. Además, estos anticuerpos se pueden conjugar a fármacos u otros agentes terapéuticos en forma directa o indirecta por medio de un enlazador.

Los anticuerpos de esta invención también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, se pueden unir al receptor sin inhibir unión al ligando o sustrato. Como anticuerpos neutralizantes, pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva. También pueden ser útiles para detectar o cuantificar ligando. Se pueden usar como reactivos para análisis de transferencia Western o para inmunoprecipitación o inmunopurificación de proteína respectiva. Análogamente, los ácidos nucleicos y proteínas se pueden inmovilizar a sustratos sólidos para métodos de purificación o detección de afinidad. Los sustratos pueden ser, por ejemplo, perlas de resina sólida o láminas de plástico.

Los fragmentos de proteína se pueden unir a otros materiales, particularmente polipéptidos, como polipéptidos fusionados o unidos covalentemente para usarse como inmunógenos. Los receptores de citoquina de mamífero y fragmentos se pueden fusionar o enlazarse covalentemente a una diversidad de inmunógenos, tales como hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero bovino, toxoide tetánico, etc. Véase Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper y Row, 1969; Landsteiner (1962) *Specificity of Serological Reactions*, Dover Publications Nueva York; y Williams, *et al.*, (1967) *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Vol 1, Academic Press, Nueva York, para descripciones de métodos de preparación de antisueros policlonales. Un método típico implica la hiper-inmunización de un animal con un antígeno. Después la sangre del animal se recoge poco después de las inmunizaciones repetidas y se aísla la gamma globulina.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales a partir de diversos hospedadores mamíferos, tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc. La descripción de técnicas para preparar tales anticuerpos monoclonales se puede observar, por ejemplo, en Stites *et al.*, (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4ª ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y referencias mencionadas en el mismo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.) Academic Press Nueva York y particularmente en Kohler y Milstein (1975) en *Nature* 256: 495-497, que describen un método para generar anticuerpos monoclonales. Resumiendo brevemente, este método implica inyectar a un animal un inmunógeno. Después el animal se sacrifica y se toman células de su bazo, que después se fusionan con células de mieloma. El resultado es una célula híbrida o "hibridoma" que es capaz de reproducirse *in vitro*. Después la población de hibridomas se selecciona para aislar clones individuales, cada uno de los cuales secreta una especie única de anticuerpo al inmunógeno. De esta manera, las especies de anticuerpo individuales obtenidas son los productos de células B únicas inmortalizadas y clonadas a partir del animal inmune generadas en respuesta a un sitio específico reconocido sobre la sustancia inmunógena.

Otras técnicas adecuadas implican la exposición *in vitro* de linfocitos a los polipéptidos antigénicos o alternatively a la 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 Ward, *et al.* (1989) *Nature* 341: 544-546.

Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se pueden usar con o sin modificación, incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos se marcarán uniéndose de forma covalente o no covalente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conoce una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y se describen de forma exhaustiva tanto en la bibliografía científica como de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscientes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen las patentes de EE.UU. N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. También, se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes o quiméricas, véase Cabilly, patente de EE.UU. N° 4.816.567 o preparados en ratones transgénicos, véase Mendez *et al.*, (1997) *Nature Genetics* 15: 146-156.

Los anticuerpos de esta invención también se pueden usar para cromatografía de afinidad en el aislamiento de proteínas de DCRS2 o péptidos. Se pueden preparar columnas donde los anticuerpos se enlacen a un soporte sólido, por ejemplo, partículas, tales como agarosa, Sephadex o similares, donde un lisado celular se puede hacer pasar a través de la columna, la columna se lava, seguido de concentraciones crecientes de un desnaturizador suave, mediante lo cual se liberará la proteína purificada. Alternativamente, la proteína se puede usar para purificar anticuerpo. Se pueden aplicar absorciones cruzadas o agotamientos apropiados.

Los anticuerpos también se pueden usar para seleccionar genotecas de expresión para productos de expresión particulares. Habitualmente, los anticuerpos usados en dicho procedimiento se marcarán con un resto que permita la detección fácil de la presencia de antígeno por unión al anticuerpo.

Los anticuerpos generados contra un receptor de citoquina también se usarán para generar anticuerpos anti-idiotípicos. Estos serán útiles para detectar o diagnosticar diversas afecciones inmunológicas relacionadas con la expresión de la proteína o células que expresan la proteína. También serán útiles como agonistas o antagonistas del ligando, que pueden ser inhibidores competitivos o sustitutos para ligandos de origen natural.

En un inmunoensayo, se determina típicamente una proteína receptora de citoquina que se une específicamente o que es específicamente inmunorreactiva a un anticuerpo generado contra un inmunógeno definido, tal como un

inmunógeno que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2. El inmunoensayo típicamente usa un antisuero policlonal que se generó, por ejemplo, para una proteína de SEC ID N°: 2. Este antisuero se selecciona para tener reactividad cruzada baja contra otros miembros de la familia de receptores de citoquina, por ejemplo, subunidad alfa de receptor IL-11, subunidad alfa de receptor IL-6 p40, preferiblemente de la misma especie y se retira cualquier reactividad cruzada mediante la inmuoabsorción antes de usarse en el inmunoensayo.

Para producir antisuero para uso en un inmunoensayo, la proteína, por ejemplo, de SEC ID N°: 2, se aísla como se ha descrito en este documento. Por ejemplo, se puede producir proteína recombinante en una línea celular de mamífero. Un hospedador apropiado, por ejemplo, una cepa endogámica de ratones tal como Balb/c, se inmuniza con la proteína seleccionada, usando típicamente un adyuvante convencional, tal como adyuvante de Freund y un protocolo de inmunización de ratón convencional (véase Harlow y Lane, anteriormente). Alternativamente, se puede usar un péptido sintético obtenido a partir de las secuencias descritas en este documento y conjugado a una proteína portadora como un inmunógeno. Los sueros policlonales se recogen y se titulan frente a la proteína inmunógena en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo de fase sólida con el inmunógeno inmovilizado sobre un soporte sólido. Los antisueros policlonales con un título de 10^4 o mayores se seleccionan y se ensayan para determinar su reactividad cruzada contra otros miembros de la familia de receptores de citoquina, por ejemplo, subunidad alfa del receptor IL-11 y/o p40, usando un inmunoensayo de unión competitiva tal como el que se ha descrito en Harlow y Lane, anteriormente, en las páginas 570-573. Preferiblemente, se usan al menos dos miembros de la familia de receptores de citoquina en esta determinación. Estos miembros de la familia de receptores de citoquina se pueden producir como proteínas recombinantes y aislar usando técnicas de biología molecular y química de proteínas convencionales como se ha descrito en este documento.

Los inmunoensayos en el formato de unión competitiva se pueden usar para las determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, la proteína de SEC ID N°: 2 se puede inmovilizar en un soporte sólido. Las proteínas añadidas al ensayo compiten con la unión de los antisueros al antígeno inmovilizado. La capacidad de las proteínas anteriores para competir con la unión de los antisueros a la proteína inmovilizada se compara con las proteínas, por ejemplo, de la subunidad alfa de receptor IL-11 o p40. El porcentaje de reactividad cruzada para las proteínas anteriores se calcula usando cálculos convencionales. Los antisueros con reactividad cruzada de menos del 10% con cada una de las proteínas enumeradas anteriormente se seleccionan y agrupan. Después los anticuerpos de reacción cruzada se retiran de los antisueros agrupados por inmuoabsorción con las proteínas enumeradas anteriormente.

Después los antisueros inmuoabsorbidos y agrupados se usan en un inmunoensayo de unión competitiva como se ha descrito anteriormente para comparar una segunda proteína con la proteína de inmunógeno (por ejemplo, la proteína similar a DCRS2 de SEC ID N°: 2). Para realizar esta comparación, cada una de las dos proteínas se ensayaron en un amplio intervalo de concentraciones y se determinó la cantidad de cada proteína requerida para inhibir el 50% de la unión de los antisueros a la proteína inmovilizada. Si la cantidad requerida de la segunda proteína es menor que el doble de la cantidad de la proteína o proteínas seleccionadas que se requiere, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a un anticuerpo generado para el inmunógeno.

Se entiende que estas proteínas receptoras de citoquina son miembros de una familia de proteínas homólogas que comprenden al menos 6 genes identificados hasta ahora. Para un producto de gen particular, tal como el DCRS2, el término se refiere no sólo a las secuencias de aminoácidos descritas en este documento, sino también a otras proteínas que son variantes alélicas, no-alélicas o de especies. También se entiende que los términos incluyen mutaciones no naturales introducidas por mutación deliberada usando tecnología recombinante convencional tal como mutación puntual o cortando secciones cortas de ADN que codifican las proteínas respectivas o sustituyendo aminoácidos nuevos o añadiendo nuevos aminoácidos. Tales alteraciones menores típicamente mantendrán sustancialmente la inmunoidentidad de la molécula original y/o su actividad biológica. Por lo tanto, estas alteraciones incluyen proteínas que son específicamente inmunorreactivas con una proteína DCRS2 de origen natural designada. Las propiedades biológicas de las proteínas alteradas se pueden determinar expresando la proteína en una línea celular apropiada y midiendo el efecto apropiado, por ejemplo, en linfocitos transfectados. Las modificaciones de proteína particulares consideradas menores incluirían sustitución conservativa de aminoácidos con propiedades químicas similares, como se ha descrito anteriormente para la familia de receptores de citoquina en su totalidad. Alineando una proteína de forma óptima con la proteína de los receptores de citoquina y usando los inmunoensayos convencionales descritos en este documento para determinar inmunoidentidad, se pueden determinar las composiciones de proteína de la invención.

VII. Equipos y cuantificación

Las formas tanto de origen natural como recombinantes de las moléculas similares a receptor de citoquina de esta invención son particularmente útiles en equipos y métodos de ensayo. Por ejemplo, estos métodos también se aplicarían a selección para actividad de unión, por ejemplo, ligandos para estas proteínas. Se han desarrollado varios métodos de ensayo automatizados en los últimos años para permitir la selección de decenas de cientos de compuestos por año. Véase, por ejemplo, una estación de trabajo automatizada BIOMEK, Beckman Instruments, Palo Alto, California, y Fodor *et al.*, (1991) Science 251: 767-773. Este último describe medios para ensayar la unión por una pluralidad de polímeros definidos sintetizados sobre un sustrato sólido. El desarrollo de ensayos adecuados para seleccionar un ligando o proteínas homólogas agonistas/antagonistas se puede facilitar en gran medida mediante la disponibilidad de grandes cantidades de receptores de citoquina solubles purificados en un estado activo tal como se proporciona en esta invención.

Se puede recubrir DCRS2 purificado directamente sobre placas para uso en técnicas de selección de ligando mencionadas anteriormente. Sin embargo, los anticuerpos no neutralizantes para estas proteínas se pueden usar como anticuerpos de captura para inmovilizar el receptor respectivo sobre la fase sólida, útil, por ejemplo, en usos de diagnóstico.

Esta invención también contempla el uso de DCRS2, fragmentos del mismo, péptidos y sus productos de fusión en una variedad de equipos y métodos de diagnóstico para detectar la presencia de la proteína o su ligando. Alternativamente o adicionalmente, se pueden incorporar anticuerpos contra las moléculas en los equipos y métodos. Típicamente, el equipo tendrá un compartimiento que contenga un péptido DCRS2 o segmento de gen o un reactivo que reconozca uno o el otro. Típicamente, los reactivos de reconocimiento, en el caso de péptidos, serían un receptor o anticuerpo o en el caso de un segmento de gen, sería habitualmente una sonda de hibridación.

Un equipo preferido para determinar la concentración de DCRS2 en una muestra típicamente comprendería un compuesto marcado, por ejemplo, ligando o anticuerpo, que tenga afinidad de unión conocida para DCRS2, una fuente de DCRS2 (de origen natural o recombinante) como un control positivo y un medio para separar la unión del compuesto marcado libre, por ejemplo una fase sólida para inmovilizar el DCRS2 en la muestra de ensayo. Normalmente se proporcionarán compartimientos que contengan reactivos e instrucciones. También se proporcionarán equipos que contengan ácidos nucleicos o proteínas apropiados.

Los anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión a antígeno, específicos para DCRS2 de mamífero o un fragmento de péptido o fragmentos de receptor son útiles en aplicaciones de diagnóstico para detectar la presencia de niveles elevados de ligando y/o sus fragmentos. Ensayos de diagnóstico pueden ser homogéneos (sin una etapa de separación entre reactivo libre y complejo anticuerpo-antígeno) o heterogéneos (con una etapa de separación). Existen diversos ensayos comerciales, tales como radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), inmunoensayo de enzima (EIA), técnica de inmunoensayo multiplicado de enzima (EMIT), inmunoensayo fluorescente marcado con sustrato (SLFIA) y similares. Por ejemplo, se pueden emplear anticuerpos no marcados usando un segundo anticuerpo que esté marcado y que reconozca el anticuerpo para un receptor de citoquina o para un fragmento particular del mismo. Estos ensayos también se han descrito de forma exhaustiva en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Hrlow y Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, CSH, y Coligan (ed. 1991 y suplementos periódicos) *Current Protocols In Immunology* Greene/Wiley, Nueva York.

Los anticuerpos anti-idiotípicos pueden tener uso similar para servir como agonistas o antagonistas de receptores de citoquina. Estos serían útiles como reactivos terapéuticos en circunstancias apropiadas.

Frecuentemente, los reactivos para ensayos de diagnóstico se suministran en equipos, para optimizar la sensibilidad del ensayo. Para la invención objeto, dependiendo de la naturaleza del ensayo, el protocolo y el marcador, se proporciona anticuerpo marcado o no marcado o ligando marcado. Esto se realiza habitualmente junto con otros aditivos, tales como tampones, estabilizadores, materiales necesarios para la producción de señal tales como sustratos para enzimas y similares. Preferiblemente, el equipo también contendrá instrucciones para el uso apropiado desecho de los contenidos después del uso. Típicamente, el equipo tiene compartimientos para cada reactivo útil y contendrá instrucciones para el uso apropiado y desecho de los reactivos. De manera deseable, los reactivos se proporcionan como un polvo liofilizado seco, donde los reactivos se pueden reconstituir en un medio acuoso que tenga concentraciones apropiadas para realizar el ensayo.

Los constituyentes de los ensayos de diagnóstico mencionados anteriormente se pueden usar sin modificación o se pueden modificar en una variedad de formas. Por ejemplo, el marcaje se puede conseguir uniéndolo covalentemente o no covalentemente un resto que proporcione de forma directa o indirecta una señal detectable. En muchos de estos ensayos, se puede marcar un compuesto de ensayo, receptor de citoquina o anticuerpos para el mismo de forma directa o indirecta. Las posibilidades para el marcaje directo incluyen grupos de marcadores: radiomarcadores tales como ^{125}I , enzimas (patente de EE.UU. N° 3.645.090) tales como peroxidasa y fosfatasa alcalina y marcadores fluorescentes (patente de EE.UU. N° 3.940.475) capaces de supervisar el cambio en la intensidad de fluorescencia, desplazamiento de longitud de onda o polarización de fluorescencia.

Las posibilidades de marcaje indirecto incluyen biotilación de un constituyente seguida de unión a avidina acoplada a uno de los grupos de marcadores anteriores.

También existen numerosos métodos para separar la unión del ligando libre o, alternativamente, la unión del compuesto de ensayo libre. El receptor de citoquina se puede inmovilizar sobre diversas matrices seguido de lavado. Las matrices adecuadas incluyen plástico tal como una placa, filtros y glóbulos de ELISA. Los métodos para inmovilizar el receptor a una matriz incluyen, sin limitación, adhesión directa a plástico, uso de un anticuerpo de captura, acoplamiento químico y biotina-avidina. La última etapa en este enfoque implica la precipitación del complejo anticuerpo/antígeno por cualquiera de varios métodos que incluyen los que utilizan, por ejemplo, un solvente orgánico tal como polietilenglicol o una sal tal como sulfato de amonio. Otras técnicas de separación adecuadas incluyen, sin limitación, el método de partícula magnetizable de anticuerpo de fluoresceína descrito en Rattle *et al.*, (1984) *Clin. Chem.* 30 (9): 1457-1461 y la separación de partícula magnética de anticuerpo doble como se ha descrito en la patente de EE.UU. N° 4.659.678.

Se han presentado de forma exhaustiva en la bibliografía métodos para enlazar proteína o fragmentos a diversos marcadores y no requieren discusión detallada en este documento. Muchas de las técnicas implican el uso de grupos carboxilo activados mediante el uso de carbodiimida o 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 similar. En estas solicitudes también se usarán proteínas de fusión.

Otro aspecto de diagnóstico de esta invención implica el uso de secuencias de oligonucleótidos o polinucleótidos tomadas de la secuencia de un receptor de citoquina. Estas secuencias se pueden usar como sondas para detectar niveles del receptor de citoquina respectivo en pacientes que se sospecha que tienen un trastorno inmunológico. La preparación de secuencias de nucleótidos tanto de ARN como de ADN, el marcaje de las secuencias y el tamaño preferido de las secuencias ha recibido una amplia descripción y tratamiento en la bibliografía. Normalmente, una sonda de oligonucleótidos debe tener al menos aproximadamente 14 nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos y las sondas de polinucleótidos pueden ser de hasta varias kilobases. Se pueden emplear diversos marcadores, lo más comúnmente radionúclidos, particularmente ³²P. Sin embargo, también se pueden emplear otras técnicas, tales como uso de nucleótidos modificados con biotina para introducción en un polinucleótido. La biotina sirve entonces como el sitio para unirse a avidina o anticuerpos, que pueden estar marcados con una amplia variedad de marcadores, tales como radionúclidos, agentes fluorescentes, enzimas o similares. Alternativamente, se pueden emplear anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, que incluyen dúplex de ADN, dúplex de ARN, dúplex híbridos de ARN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede realizar donde el dúplex se une a una superficie, para que se pueda detectar la formación de dúplex sobre la superficie, la presencia de anticuerpo unido al dúplex. El uso de sondas para el ARN antisentido nuevo se puede llevar a cabo en técnicas convencionales tales como hibridación de ácidos nucleicos, selección de más y menos, sonda de recombinación, traducción permitida por hibridación (HART) y traducción impedida por hibridación (HART). Esto también incluye técnicas de amplificación tales como reacción en cadena de polimerasa (PCR).

También se contemplan equipos de diagnóstico que también se para ensayar la presencia cualitativa o cuantitativa de otros marcadores. El diagnóstico o pronóstico puede depender de la combinación de indicios múltiples usados como marcadores. Por lo tanto, los equipos pueden ensayar combinaciones de marcadores. Véase, por ejemplo, Viallet *et al.*, (1989) Progress in Growth Factor Res. 1: 89-87.

VII. Utilidad Terapéutica

Esta invención proporciona reactivos con valor terapéutico significativo. Véase, por ejemplo, Levitzki (1996) Curr. Opin. Cell. Biol. 8: 239-244. Los receptores de citoquina (de origen natural o recombinantes), fragmentos de los mismos, receptores de muteína y anticuerpos, junto con compuestos que se ha identificado que tienen afinidad de unión a los receptores o anticuerpos, deben ser útiles en el tratamiento de afecciones que presentan expresión anormal de los receptores de sus ligandos. Tal anomalía típicamente se manifestará mediante trastornos inmunológicos. Adicionalmente, esta invención debe proporcionar valor terapéutico en diversas enfermedades o trastornos asociados con expresión anormal o activación anormal de respuesta al ligando. Por ejemplo, se ha sugerido que los ligandos de IL-1 están implicados en desarrollo morfológico, por ejemplo, determinación de polaridad dorso-ventral y respuestas inmunes, particularmente las respuestas innatas primitivas. Véase, por ejemplo, Sun, *et al.*, (1991) Eur. J. Biochem. 196: 247254 y Hultmark (1994) Nature 367: 116-117.

Los receptores de citoquina recombinantes, muteínas, anticuerpos agonistas o antagonistas para los mismos o anticuerpos se pueden purificar y después administrar a un paciente. Estos reactivos se pueden combinar para uso terapéutico con ingredientes activos adicionales, por ejemplo, en vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales, junto con estabilizadores y excipientes fisiológicamente inocuos. Estas combinaciones pueden ser estériles, por ejemplo, se pueden filtrar y colocar en formas farmacéuticas como por liofilización en viales de dosificación o almacenamiento en preparaciones acuosas estabilizadas. Esta invención también contempla el uso de anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que no se unen al complemento.

Se puede realizar la selección de ligando que usa receptor de citoquina o fragmentos del mismo para identificar moléculas que tengan afinidad de unión a los receptores. Después se pueden utilizar ensayos biológicos posteriores para determinar si un ligando putativo puede proporcionar unión competitiva, que pueda bloquear la actividad estimulante intrínseca. Se pueden usar fragmentos de receptor como un bloqueante o antagonista ya que bloquea la actividad del ligando. Análogamente, un compuesto que tiene actividad estimulante intrínseca puede activar el receptor y, por lo tanto, es un agonista ya que estimula la actividad del ligando, por ejemplo, induciendo la señalización. Esta invención contempla además el uso terapéutico de anticuerpos para receptores de citoquina como antagonistas.

Las cantidades de reactivos necesarias para terapia eficaz dependerán de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, vida fisiológica del reactivo, vida farmacológica, estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados. Por tanto, las dosis de tratamiento se deben titular para optimizar la seguridad y eficacia. Típicamente, las dosis usadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para administración *in situ* de estos reactivos. El ensayo de dosis eficaz en animales para tratamiento de trastornos particulares proporcionará indicio predictivo adicional de dosis humana. Se describen diversas consideraciones, por ejemplo, en Gilman, *et al.*, (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª. Ed., Pergamon Press; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª. Ed. (1990) Mack Publishing Co., Easton Penn.

Los métodos de administración se describen en las mismas y más adelante, 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 el Merck Index, Merck & Co., Rahway, New Jersey. Debido a la unión de afinidad probablemente alta o números de renovación, entre un
 5 ligando putativo y sus receptores, se esperaría inicialmente que dosis bajas de estos reactivos fueran eficaces. Y la ruta de señalización sugiere que cantidades extremadamente bajas de ligando puedan tener efecto. Por tanto, se esperaría en general que los intervalos de dosis estén en cantidades de concentraciones inferiores a 1 mM, típicamente concentraciones de menos de aproximadamente 10 μ M, habitualmente menos de aproximadamente 100 nM, preferiblemente menos de aproximadamente 10 pM (pico molar) y lo más preferible es que sean menos de 1 fM (femtomolar), con un
 10 vehículo apropiado. Se utilizarán formulaciones de liberación lenta o aparato de liberación lenta con frecuencia para administración continua.

Los receptores de citoquina, fragmentos de los mismos y anticuerpos o sus fragmentos, antagonistas y agonistas se pueden administrar directamente al hospedador que se tiene que tratar o, dependiendo del tamaño de los compuestos,
 15 puede ser deseable conjugarlos a proteínas portadoras tales como ovalbúmina o albúmina de suero antes de su administración. Las formulaciones terapéuticas se pueden administrar en muchas formas farmacéuticas convencionales. Aunque es posible que el ingrediente activo se administre solo, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica. Las formulaciones comprenden al menos un ingrediente activo, como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables del mismo. Cada vehículo tiene que ser tanto farmacéuticamente como fisiológicamente aceptable en el sentido de que sea compatible con los otros ingredientes y no dañino para el paciente. Las formulaciones incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, nasal o parenteral (que incluyen subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitaria y se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Véase, por ejemplo, Gilman *et al.*, (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª Ed. Pergamon
 20 Press; y Remington's Pharmaceutical Science, 17ª. Ed. (1990), Mack Publishing, Co., Easton Penn.; Avis *et al.*, (eds. 1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, Nueva York; Lieberman, *et al.*, (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, N.Y., y Lieberman, *et al.*, (eds. 1990). Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, N.Y. La terapia de esta invención se puede combinar o usar en relación con otros agentes terapéuticos, particularmente agonistas o antagonistas de otros miembros de la familia de receptores de citoquina.

30

IX. Selección

Se puede realizar la selección de fármacos usando DCRS2 o fragmentos del mismo para identificar compuestos
 35 que tienen afinidad de unión a la subunidad de receptor, incluyendo aislamiento de compuestos asociados. Después se pueden usar ensayos biológicos posteriores para determinar si el compuesto tiene actividad estimulante intrínseca y por lo tanto es un bloqueante o antagonista ya que bloquea la actividad del ligando. Análogamente, un compuesto que tiene actividad estimulante intrínseca puede activar el receptor y, por tanto, es un agonista ya que estimula la actividad de un ligando de citoquina. Esta invención contempla además el uso terapéutico de anticuerpos para el receptor como
 40 agonistas o antagonistas de citoquina.

De manera similar, se pueden usar complejos que comprenden proteínas múltiples para seleccionar ligandos o reactivos capaces de reconocer el complejo. La mayoría de los receptores de citoquina comprenden al menos dos subunidades, que pueden ser las mismas o distintas. Alternativamente, el receptor de membrana se puede unir a
 45 un complejo que comprende un ligando similar a citoquina asociado con otra proteína soluble que sirve, por ejemplo, como una segunda subunidad receptora.

Un método de selección de fármaco utiliza células hospedadoras eucariotas o procariotas que se transforman de forma estable con moléculas de ADN recombinante que expresan el DCRS2 en combinación con otra subunidad de
 50 receptor de citoquina. Se pueden aislar células que expresen un receptor en aislamiento a partir de otros receptores funcionales. Dichas células en forma viable o fija, se pueden usar para ensayos de unión de anticuerpo/antígeno o ligando/receptor convencionales. Véase también, Parce *et al.*, (1989) Science 246: 243-247 y Owicki, *et al.*, (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 87: 4007-4011, que describen métodos sensibles para detectar respuestas celulares. Ensayos competitivos son particularmente útiles, donde las células (fuente de ligando putativo) se ponen en contacto
 55 e incuban con un receptor o anticuerpo marcado que tiene afinidad de unión conocida al ligando, tal como ¹²⁵I-anticuerpo y una muestra de ensayo cuya afinidad de unión a la composición de unión se esté midiendo. Después la unión y las composiciones de unión marcadas libres se separan para evaluar el grado de unión de ligando. La cantidad de compuesto de ensayo unido es inversamente proporcional a la cantidad de receptor marcado que se une a la fuente conocida. Se pueden usar muchas técnicas para separar ligando unido de libre para evaluar el grado de unión de
 60 ligando. Esta etapa de separación podría implicar típicamente un procedimiento tal como adhesión a filtros seguido de lavado, adhesión a plástico seguido de lavado o centrifugación de las membranas celulares. Las células viables también podrían usarse para seleccionar los efectos de fármacos sobre funciones mediadas por citoquina, por ejemplo, niveles de segundo mensajero, por ejemplo, Ca⁺⁺; proliferación celular; cambios en reserva de fosfato de inositol y otros. Algunos métodos de detección permiten la eliminación de una etapa de separación, por ejemplo, un sistema de
 65 detección sensible a proximidad. Los colorantes sensibles a Calcio serán útiles para detectar niveles de Ca⁺⁺, con un fluorímetro o un aparato de separación de células con fluorescencia.

X. Ligandos

Las descripciones del DCRS2 en este documento proporcionan medios para identificar ligandos, como se ha descrito anteriormente. Tal ligando se debe unir específicamente al receptor respectivo con afinidad razonablemente alta. Se hacen disponibles diversas construcciones que permiten el marcaje del receptor para detectar su ligando. Por ejemplo, marcar directamente el receptor de citoquina, fusionar sobre el mismo marcadores para marcaje secundario, por ejemplo, FLAG u otras etiquetas de epítipo, etc., permitirá la detección de receptor. Este puede ser histológico, como un método de afinidad para purificación bioquímica o marcaje o selección en un procedimiento de estudio de clonación de expresión. También se puede aplicar un sistema de selección de 2 híbridos preparando construcciones apropiadas con las secuencias de receptor de citoquina disponibles. Véase, por ejemplo, Fields, y Song (1989) Nature 340: 245-246.

El amplio alcance de esta invención se entiende mejor con referencia a los ejemplos siguientes, que no tienen por objeto limitar las invenciones a las realizaciones específicas.

Ejemplos

I. Métodos Generales

Algunos de los métodos generales se describen o se hace referencia a los mismos, por ejemplo, en Maniatis, *et al.* (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook, *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2ª ed.) vols. 1-3, CSH Press, NY o Ausubel, *et al.* (1987 y Suplementos) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, Nueva York. Los métodos para purificación de proteínas incluyen métodos tales como precipitación de sulfato de amonio, cromatografía en columna, electroforesis, centrifugación, cristalización y otros. Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.* (1987 y suplementos periódicos); Coligan, *et al.* (ed. 1996) y suplementos periódicos, Current Protocols in Protein Science Greene/Wiley, Nueva York; Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification" en Methods in Enzymology, vol. 182 y otros volúmenes en esta serie y la bibliografía del fabricante sobre el uso de productos de purificación de proteínas, por ejemplo, Pharmacia, Piscataway, N.J. o Bio-Rad, Richmond, CA. La combinación con técnicas recombinantes permite la fusión a segmentos apropiados, por ejemplo, a una secuencia FLAG o un equivalente que se puede fusionar mediante una secuencia amovible con 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, N.Y. y Crowe, *et al.* (1992) QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA.

Se realiza análisis de secuencia por ordenador, por ejemplo, usando programas de software disponibles, que incluyen los de fuentes de GCG (U. Wisconsin) y GenBank. También se usaron las bases de datos de secuencia públicas, por ejemplo, de GenBank y otros.

Se pueden aplicar muchas técnicas aplicables a receptores IL-10 al DCRS2, como se describe, por ejemplo, en el documento USSN 08/110.683 (receptor IL-10).

II. Análisis Computacional

Las secuencias humanas relacionadas con receptores de citoquinas se identificaron a partir de base de datos de secuencia genómica usando, por ejemplo, el servidor BLAST (Altschul, *et al.* (1994) Nature Genet. 6: 119-129). Se pueden usar programas de análisis convencionales para evaluar la estructura, por ejemplo, PHD (Rost y Sander (1994) Proteins 19: 55-72) y DSC (King y Sternberg (1996) Protein Sci. 5: 2298-2310). El software de comparación convencional incluye, por ejemplo, Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10; Waterman (1995) Introduction to Computational Biology: Maps, Sequences, and Genomes Chapman & Hall; Lander y Waterman (eds. 1995) Calculating the Secrets of Life; Applications of the Mathematical Sciences in Molecular Biology National Academy Press y Speed y Waterman (eds. 1996) Genetic Mapping and DNA Sequencing (Volúmenes IMA en Mathematics and Its Applications, Vol 81) Springer Verlag.

III. Clonación de ADNc de DCRS2 de longitud completa; localización Cromosómica

Se usan cebadores de PCR obtenidos a partir de la secuencia de DCRS2 para sondear una genoteca de ADNc humano. Las secuencias se pueden obtener, por ejemplo, de la Tabla 1, preferiblemente las adyacentes a los extremos de secuencias. Se clonan ADNc de longitud completa para DCRS2 de primates, roedores u otras especies, por ejemplo, mediante selección de hibridación de ADN del fago λ gt10. Las reacciones de PCR se conducen usando ADN polimerasa Taqplus de T. acuáticos (Stratagene) en condiciones apropiadas.

Se realizan preparaciones de cromosomas. Se realiza hibridación *in situ* sobre preparaciones de cromosomas obtenidas a partir de linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina cultivados durante 72 h. Se añadió 5-bromodeoxiuridina durante las 7 h finales de cultivo (60 μ g/ml de medio), para asegurar una formación de bandas cromosómicas de posthibridación de buena calidad.

Un fragmento de PCR, amplificado con la ayuda de cebadores, se clona en un vector apropiado. El vector se marca mediante translación de mella con ^3H . La sonda radiomarcada se hibrida a preparaciones de metafase a concentración final de 200 ng/ml de solución de hibridación como se ha descrito en Mattei, *et al.* (1985) Hum. Genet. 69: 327-331.

Después de recubrirse con emulsión de rastreo nuclear (KODAK NTB₂), los portaobjetos se exponen. Para evitar cualquier deslizamiento de granos de plata durante el procedimiento de formación de bandas, las preparaciones de cromosomas primero se tiñen con solución de Giemsa tamponada y se fotografían en metafase. Después se realiza la formación de bandas R se realiza por el método de fluorocromo-fotólisis-Giemsa (FPG) y se vuelven a fotografiar las metafases antes del análisis.

Se usan métodos apropiados similares para otras especies.

IV. Localización de ARNm de DCRS2

Tejido múltiple humano (Nº de Cat 1, 2) y manchas de líneas celulares de cáncer (Nº de Cat 7757-1), que contienen aproximadamente 2 µg de ARN de poly(A)+ por carril, se adquieren en Clontech (Palo Alto, CA). Las sondas se marcan radiactivamente con [α - ^{32}P] dATP, por ejemplo, usando el equipo de marcaje de cebador aleatorio Amersham Rediprime (RPN1633). Se realizan prehibridación e hibridaciones, por ejemplo, a 65°C en Na₂HPO₄ 0,5 M, SDS al 7%, EDTA 0,5 M (pH 8,0). Se realizan lavados de alta rigurosidad, por ejemplo, a 65°C con dos lavados iniciales en 2 x SSC, SDS al 0,1% durante 40 minutos seguido de un lavado posterior en 0,1 x SSC, SDS al 0,1% durante 20 minutos. Después las membranas se exponen a -70°C a película de rayos X (Kodak) en presencia de tamices intensificadores. Se llevan a cabo estudios más detallados realizados por Southern de genoteca de ADNc con clones seleccionados de DCRS2 humano apropiados para examinar su expresión en subconjuntos de células hematopoyéticas u otras células.

Alternativamente, se seleccionan dos cebadores apropiados a partir de la Tabla 1. Se usa RT-PCR en una muestra de ARNm apropiada seleccionada para la presencia de mensaje para producir un ADNc, por ejemplo, una muestra que expresa el gen.

Los clones de longitud completa se pueden aislar por hibridación de genotecas de ADNc a partir de tejidos apropiados preseleccionados por señal de PCR. Se pueden realizar transferencia de Northern.

El mensaje para genes que codifican DCRS2 se ensayará mediante tecnología apropiada, por ejemplo, PCR, inmunoensayo, hibridación u otras. Preparaciones de ADNc de tejidos y órganos están disponibles, por ejemplo, en Clontech, Mountain View, CA. Es útil la identificación de fuentes de expresión natural, como se ha descrito. Y la identificación de apareamientos de subunidades de receptor funcionales permitirán la predicción de qué células expresan la combinación de subunidades de receptor que darán como resultado una sensibilidad fisiológica a cada uno de los ligandos de citoquina.

Para distribución en ratón, por ejemplo, se puede realizar análisis de Southern: ADN (5 µg) de una genoteca de ADNc amplificado primario se digirió con enzimas de restricción apropiadas para liberar los insertos, se desarrolló en un gel de agarosa al 1% y se transfirió a una membrana de nylon (Schleicher y Schuell, Keene, NH).

Muestras para aislamiento de ARNm de ratón pueden incluir: líneas de células L fibroblásticas de ratón en reposo (C200); células transfectadas de Braf: ER (fusión de Braf a receptor de estrógeno), control (C201); células T, polarizadas con TH1 (Mel14 brillante, células CD4+ de bazo, polarizadas durante 7 días con IFN-γ y anti IL-4; T200); células T, polarizadas con TH2 (Mel14 brillante, células CD4+ de bazo, polarizadas durante 7 días con IL-4 y anti-IFN-γ; T201); células T, altamente polarizadas con TH1 (véase Openshaw, *et al.* (1995) J. Exp. Med. 182: 1357-1367; activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 16 h agrupadas; T202); células T, altamente polarizadas con TH2 (véase Openshaw, *et al.* (1995) J. Exp. Med. 182: 1357-1367; activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 16 h agrupadas; T203); células pre T CD44- CD25+, seleccionadas del timo (T204); clon de células T TH1 D1.1, en reposo durante 3 semanas después de la última estimulación con antígeno (T205); clon de células T TH1 D1.1, estimulada con 10 µg/ml de ConA durante 15 h (T206); clon de células T TH2 CDC35, en reposo durante 3 semanas después de la última estimulación con antígeno (T207); clon de células T TH2 CDC35, estimulada con 10 µg/ml de ConA durante 15 h (T208); células T intactas Mel14+ de bazo, en reposo (T209); células T Mel14+, polarizadas a TH1 con IFN-γ/IL-12/anti-IL-4 durante 6, 12, 24 h agrupadas (T210); células T Mel14+, polarizadas a TH2 con IL-4/anti-IFN-γ durante 6, 13, 24 h agrupadas (T211); líneas celulares de leucemia de células B maduras no estimuladas A20 (B200); líneas celulares B no estimuladas CH12 (B201); células B grandes no estimuladas de bazo (B202); células B de bazo total, activadas con LPS (B203); células dendríticas enriquecidas con metrizamida de bazo, en reposo (D200); células dendríticas de médula ósea, en reposo (D201); línea celular de monocitos RAW 264.7 activada con LPS durante 4 h (M200); macrófagos de médula ósea obtenidos con GM y M-CSF (M201); línea celular de macrófagos J774, en reposo (M202); línea celular de macrófagos J774 + LPS + anti-IL-10 a 0,5, 1, 3, 6, 12 h agrupadas (M203); línea celular de macrófagos J774 + LPS + IL-10 a 0,5, 1, 3, 5, 12 h agrupadas (M204); tejido pulmonar de ratón expuesto a aerosol, cebadores Th2, OVA expuestas a aerosol 7, 14, 23 h agrupadas, (véase, Garlisi, *et al.* (1995) Clinical Immunology and Immunopathology 75: 75-83; X206); tejido pulmonar infectado con Nippostrongylus (véase Coffman, *et al.* (1989) Science 245: 308-310; X200); pulmón de adulto total, normal (O200); pulmón total, rag-1 (véase Schwarz, *et al.* (1993) Immunodeficiency 4: 249-252; O205); IL-10 de bazo de K.O. (véase Kuhn, *et al.* (1991) Cell 75: 263-274; X201); bazo de adulto total, normal (O201); bazo total, rag-1 (O207); IL-10 de parches de Peyer de K.O. (O202); parches de Peyer total, normal (O210);

ES 2 322 791 T3

IL-10 de nódulos linfáticos mesentéricos de K.O. (X203); nódulos linfáticos mesentéricos totales, normales (O211); IL-10 de colon de K.O. (X203); colon total, normal (O212); páncreas de ratón NOD (véase Makino, *et al.* (1980) Jikken Dobutsu 29: 1-13; X205); timo total, rag-1 (O208); riñón total, rag-1 (O209); corazón total, rag-1 (O202); cerebro total, rag-1 (O203); testículos total, rag-1 (O204); hígado total, rag-1 (O206); tejido de articulación normal de rata (O300) y tejido de articulación artrítica de rata (X300).

Las muestras para aislamiento de ARNm humano pueden incluir: células mononucleares de sangre periférica (monocitos, células T, células NK, granulocitos, células B), en reposo (T100); células mononucleares de sangre periférica, activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 12 h agrupadas (T101); célula T, clon de THO Mot 72, en reposo (T102); células T, clon de THO Mot 72, activado con anti-CD28 y anti-CD3 durante 3, 6, 12 h agrupadas (T103); célula T, clon de THO Mot 72, anérgico tratado con péptido específico durante 2, 7, 12 h agrupadas (T104); célula T, clon de TH1 HY06, en reposo (T107); célula T, clon de TH1 HY06, activado con anti-CD28 y anti-CD3 durante 3, 6, 12 h agrupadas (T108); célula T, clon de TH1 HY06, anérgico tratado con péptido específico durante 2, 6, 12 h agrupadas (T109); célula T, clon de TH2 HY935, en reposo (t110); célula T, clon de TH2 HY935, activado con anti-CD28 y anti-CD3 durante 2, 7, 12 h agrupadas (T111); células T CD4+CD45RO- células T polarizadas 27 días en anti-CD28, IL-4 y anti IFN- γ , polarizadas con TH2, activadas con anti-CD3 y anti-CD28 durante 4 h (T116); líneas de tumor de células T Jurkat y Hut78, en reposo (T117); clones de células T, agrupados AD130,2, Tc783,12, Tc783,13, Tc783,58, Tc782,69, en reposo (T118); clones de células T $\gamma\delta$ aleatorios de células T, en reposo (T119); esplenocitos, en reposo (B100); esplenocitos, activados con anti-CD40 e IL-4 (B101); líneas de EBV de células B agrupadas WT49, RSB, JY, CVIR, 721,221, RM3, HSY, en reposo (B102); línea de células B JY, activadas con PMA e ionomicina durante 1, 6 h agrupadas (B103); clones NK 20 agrupados, en reposo (K100); clones NK 20 agrupados, activados con PMA e ionomicina durante 6 h (K101); clon NKL, obtenido de sangre periférica de un paciente con leucemia LGL, tratado con IL-2 (K106); clon citotóxico NK 640-A30-1, en reposo (K107); línea de precursor hematopoyético TF1, activado con PMA e ionomicina durante 1, 6 h agrupados (C100); línea premonocítica U937, en reposo (M100); línea premonocítica U937, activada con PMA e ionomicina durante 1, 6 h agrupadas (M101); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , anti-IL-10 durante 1, 2, 6, 12, 24 h agrupados (M102); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , IL-10 durante 1, 2, 6, 12, 24 h agrupados (M103); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , IL-10 durante 4, 16 h agrupados (M106); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , IL-10 durante 4, 16 h agrupados (M107); monocitos elutriados, activados con LPS durante 1 hora (M108); monocitos elutriados, activados con LPS durante 6 h (M109); DC al 70% CD1a+, de CD34+ GM-CSF, FNT α 12 días, en reposo (D101); DC al 70% CD1a+, de CD34+ GM-CSF, FNT α 12 días, activado con PMA e ionomicina durante 1 hora (D102); DC al 70% CD1a+, de CD34+ GM-CSF, FNT α 12 días, activado con PMA e ionomicina durante 6 h (D103); DC al 95% CD1a+, de CD34+ GM-CSF, FNT α 12 días clasificado por FACS, activado con PMA e ionomicina durante 1, 6 h agrupado (D104); DC al 95% CD14+, ex CD34+ GM-CSF, FNT α 12 días clasificado por FACS, activado con PMA e ionomicina 1, 6 h agrupado (D105); DC CD1a+ CD86+, de CD34+ GM-CSF, FNT α 12 días clasificado por FACS, activado con PMA e ionomicina durante 1, 6 h agrupado (D106); DC de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, en reposo (D107); DC de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, en reposo (D108); DC de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, activado con LPS durante 4, 16 h agrupados (D109); DC de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, FNT α activado, monocito supe durante 4, 16 h agrupados (D110); tumor benigno L11 de leiomioma (X101); M5 de miometrio normal (O115); GS1 de leiomioma maligno (X103); línea de sarcoma de fibroblasto de pulmón MRC5, activado con PMA e ionomicina durante 1, 6 h agrupadas (C101); línea de células de carcinoma epitelial de riñón CHA, activadas con PMA e ionomicina durante 1, 6 h agrupadas (C102); riñón fetal de macho de 28 semanas (O100); pulmón fetal de macho de 28 semanas (O101); hígado fetal de macho de 28 semanas (O102); corazón fetal de macho de 28 semanas (O103); cerebro fetal de macho de 28 semanas (O104); vesícula biliar fetal de macho de 28 semanas (O106); intestino delgado fetal de macho de 28 semanas (O107); tejido adiposo fetal de macho de 28 semanas (O108); ovario fetal de hembra de 25 semanas (O109); útero fetal de hembra de 25 semanas (O110); testículos fetales de macho de 28 semanas (O111); bazo fetal de macho de 28 semanas (O112); placenta de adulto de 28 semanas (O113) y amígdalas inflamadas, de 12 años de edad (X100).

Se pueden aislar muestras similares en otras especies para evaluación.

V. Clonación de homólogos de especies de DCRS2

Se usan diversas estrategias para obtener homólogos de especies del DCRS2, preferiblemente de otros primates o roedores. Un método es por hibridación cruzada usando sondas de ADN de especies estrechamente relacionadas. Puede ser útil ir a especies evolutivamente similares como etapas intermedias. Otro método es usando cebadores de PCR específicos basándose en la identificación de bloques de similitud o diferencia entre genes, por ejemplo, áreas de secuencias de polipéptido o nucleótido altamente conservadas o no conservadas.

VI. Producción de proteína DCRS2 de mamífero

Una construcción de fusión apropiada, por ejemplo, GST, se somete a manipulación genética para expresión, por ejemplo, en *E. coli*. Por ejemplo, se construye un plásmido IGIF pGex de ratón y se transforma en *E. coli*. Se cultivan células recién transformadas, por ejemplo, en medio LB que contiene 50 μ g/ml de ampicilina e inducido con IPTG (Sigma, St. Louis, MO). Después de inducción durante toda la noche, las bacterias se recogen y los gránulos que contienen la proteína DCRS2 se aíslan. Los gránulos se homogenizan, por ejemplo, en tampón TE (tris-base 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM y pefabloc 2 mM) en 2 litros. Este material se hace pasar a través de un microfluidizador

(Microfluidics, Newton, MA) tres veces. El sobrenadante fluidizado se centrifuga en un rotor Sorvall GS-3 durante 1 hora a 13.000 rpm. El sobrenadante resultante que contiene la proteína de receptor de citoquina se filtra y se hace pasar sobre una columna de glutatión-SEFAROSA equilibrada en Tris-base 50 mM pH 8,0. Las fracciones que contienen la proteína de fusión DCRS2-GST se agrupan y se escinden, por ejemplo, con trombina (Enzyme Research Laboratories, Inc., South Bend, IN). Después la agrupación escindida se hace pasar sobre una columna de Q-SEFAROSA equilibrada en Tris-base 50 mM. Las fracciones que contienen DCRS2 se agrupan y se diluyen en H₂O destilada fría, para disminuir la conductividad y se hacen pasar de nuevo sobre una columna de Q-Sefarosa fresca, sola o en sucesión con una columna de anticuerpo de inmutofinidad. Las fracciones que contienen la proteína DCRS2 se agrupan, se forman alícuotas con las mismas y se almacenan en el congelador de -70°C.

Una comparación del espectro de CD con proteína de receptor de citoquina puede sugerir que la proteína está plegada correctamente. Véase Hazuda, *et al.* (1969) J. Biol. Chem. 264: 1689-1693.

VII. Preparación de anticuerpos específicos para DCRS2

Ratones Balb/c endogámicos se inmunizan por vía intraperitoneal con formas recombinantes de la proteína, por ejemplo, DCRS2 purificado o células NIH-3T3 transfectadas estables. Los animales se estimulan en momentos apropiados con proteína, con o sin adyuvante adicional, para estimular adicionalmente la producción de anticuerpo. Se recoge suero o hibridomas producidos con bazos recolectados.

Alternativamente, ratones Balb/c se inmunizan con células transformadas con el gen o fragmentos del mismo, células endógenas o exógenas o con membranas aisladas enriquecidas para expresión del antígeno. El suero se recoge en el momento apropiado, típicamente después de numerosas administraciones adicionales. Pueden ser útiles diversas técnicas de terapia génica, por ejemplo, para producir proteína *in situ*, para generar una respuesta inmune. Las preparaciones de suero o anticuerpo se pueden absorber de forma cruzada o inmunoseleccionar para preparar anticuerpos sustancialmente purificados de especificidad definida y afinidad alta.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, los esplenocitos se fusionan con una pareja apropiada de fusión y los hibridomas se seleccionan en el medio de cultivo mediante procedimientos convencionales. Los sobrenadantes de hibridoma se seleccionan para determinar la presencia de anticuerpos, que se unen al DCRS2, por ejemplo, por ELISA u otro ensayo. Los anticuerpos que reconocen específicamente realizaciones de DCRS2 específicas también se pueden seleccionar o preparar.

En otro método, se presentan péptidos sintéticos o proteína purificada a un sistema inmune para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véase, por ejemplo, (ed. 1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene y Harlow y Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press. En situaciones apropiadas, el reactivo de unión se marca como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, fluorescencia o de otra manera o se inmoviliza a un sustrato para métodos de separación. Los ácidos nucleicos también se pueden introducir en células en un animal para producir el antígeno, que sirve para inducir una respuesta inmune. Véase, por ejemplo, Wang, *et al.* (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 90: 4156-4160; Barry, *et al.* (1994) BioTechniques 16: 616-619 y Xiang, *et al.* (1995) Immunity 2: 129-135.

VIII. Producción de proteínas de fusión con DCRS2

Se preparan diversas construcciones de fusión con DCRS2. Una parte del gen apropiado se fusiona a una etiqueta de epítopo, por ejemplo, una etiqueta FLAG o a una construcción de sistema de dos híbridos. Véase, por ejemplo, Fields y Song (1989) Nature 340: 245-246.

La etiqueta de epítopo se puede usar en un procedimiento de clonación de expresión con defección con anticuerpos anti-FLAG para detectar una pareja de unión, por ejemplo, un ligando para el receptor de citoquina respectivo. El sistema de dos híbridos también se puede usar para aislar proteínas que se unen específicamente a DCRS2.

IX. Relación estructura actividad

Información sobre la importancia de los residuos particulares se determina usando procedimientos y análisis convencionales. El análisis de mutagénesis convencional se realiza, por ejemplo, generando muchas variantes diferentes en posiciones determinadas, por ejemplo, en las posiciones identificadas anteriormente y evaluando actividades biológicas de las variantes. Esto se puede realizar hasta el alcance de determinar posiciones que modifican la actividad o para enfocarse en posiciones específicas para determinar los residuos que se puedan sustituir para retener, bloquear o modular la actividad biológica.

Alternativamente, el análisis de variantes naturales puede indicar qué posiciones toleran mutaciones naturales. Esto puede ser el resultado del análisis poblacional de variación entre individuos o a través de cepas o especies. Las muestras de individuos seleccionados se analizan, por ejemplo, por análisis de PCR y secuenciación. Esto permite la evaluación de polimorfismos de población.

X. Aislamiento de un ligando para DCRS2

Se puede usar un receptor de citoquina como un reactivo de unión específico para identificar su pareja de unión, tomando ventaja de su especificidad de unión, como se usaría un anticuerpo. El receptor de unión puede ser un heterodímero de subunidades de receptor o puede implicar, por ejemplo, un complejo del DCRS2 con otra subunidad. Un reactivo de unión se marca como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, fluorescencia o de otra manera o se puede inmovilizar a un sustrato para métodos de separación.

La composición de unión se usa para seleccionar una genoteca de expresión preparada a partir de una línea celular que expresa una pareja de unión, es decir, ligando, preferiblemente asociado a membrana. Se usan técnicas de tinción convencionales para detectar o clasificar ligandos expresados en superficie o se seleccionan células transformadas que se expresan en superficie mediante separación. La selección de expresión intracelular se realiza por diversos procedimientos de tinción o inmunofluorescencia. Véase también McMahon, *et al.* (1991) EMBO J. 10: 2821-2832.

Por ejemplo, el día 0, se recubren previamente portaobjetos permanox de 2 cámaras con 1 ml por cámara de fibronectina, 10 ng/ml en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se enjuagan una vez con PBS. Después de siembran en placas células COS a 2-3 x 10⁵ células por cámara en 1,5 ml de medio de crecimiento. Se incuban durante toda la noche a 37°C.

El día 1 para cada muestra, se preparan 0,5 ml de una solución de 66 µg/ml de DEASE-dextrano, cloroquina 66 µM y 4 µg de ADN en DME sin suero. Para cada conjunto, se prepara un control positivo, por ejemplo, ADNc de DCRS2-FLAG a una dilución de 1 y 1/200 y un simulador negativo. Se enjuagan las células con DME sin suero. Se añade la solución de ADN y se incuba 5 h a 37°C. Se retira el medio y se añaden 0,5 ml de DMSO al 10% en DME durante 2,5 minutos. Se retira y se lava una vez con DME. Se añaden 1,5 ml de medio de cultivo y se incuba durante toda la noche.

El día 2, se cambia el medio. Los días 3 ó 4, las células se fijan y se tiñen. Se enjuagan las células dos veces con Solución Salina tamponada de Hank (HBSS) y se fijan en paraformaldehído (PFA) al 4%/glucosa durante 5 min. Se lavan tres veces con HBSS. Los portaobjetos se pueden almacenar a -80°C después de que se ha retirado todo el líquido. Para cada cámara, se realizan incubaciones de 0,5 ml de la siguiente manera. Se añade HBSS/saponina (al 0.1%) con 32 µl/ml de NaN₃ 1 M durante 20 min. Después las células se lavan con HBSS/saponina una vez. Se añade DCRS2 o complejo de DCRS2/anticuerpo apropiado a las células y se incuba durante 30 min. Se lavan las células dos veces con HBSS/saponina. Si es apropiado, se añade el primer anticuerpo durante 30 min. Se añade el segundo anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo anti-ratón del vector, en una dilución de 1/200 y se incuba durante 30 min. Se prepara solución de ELISA, por ejemplo, solución de peroxidasa de rábano picante de Vector Elite ABC y se preincuba durante 30 min. Se usa, por ejemplo, 1 gota de solución A (avidina) y 1 gota de solución B (biotina) por 2,5 ml de HBSS/saponina. Se lavan las células dos veces con HBSS/saponina. Se añade solución de ABC HRP y se incuba durante 30 min. Se lavan las células dos veces con HBSS, segundo lavado durante 2 min lo cual cierra las células. Después se añade ácido diaminobenzoico (DAB) de Vector durante 5 a 10 minutos. Se usan 2 gotas de tampón más 4 gotas de DAB más 2 gotas de H₂O₂ por 5 ml de agua destilada en vidrio. Se retira cuidadosamente la cámara y se enjuaga el portaobjetos en agua. Se seca al aire durante unos cuantos minutos y después se añade 1 gota de Crystal Mount y un cubreobjetos. Se hornea durante 5 min a 85-90°C.

Se evalúa la tinción positiva de las agrupaciones y se subclona progresivamente para aislamiento de genes únicos responsables de la unión.

Alternativamente, se usan reactivos de receptor para purificar por afinidad o clasificar células que expresan un ligando putativo. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.* O Ausubel, *et al.*

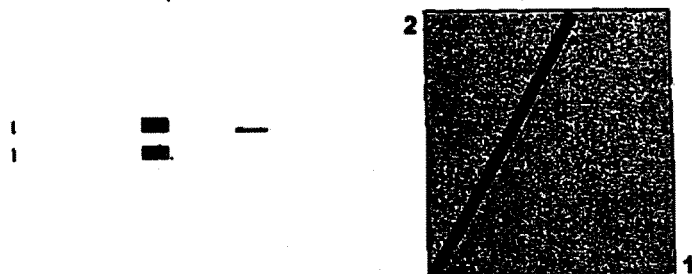
Otra estrategia consiste en seleccionar un receptor de unión de membrana mediante separación. El ADNc de receptor se construye como se ha descrito anteriormente. La inmovilización se puede conseguir mediante el uso de anticuerpos apropiados que reconocen, por ejemplo, una secuencia FLAG de una construcción de fusión de DCRS2 o mediante el uso de anticuerpos generados contra los primeros anticuerpos. Ciclos recursivos de selección y amplificación conducen al enriquecimiento de clones apropiados y al aislamiento final de clones de expresión de receptor.

Se pueden seleccionar genotecas de expresión de fago mediante DCRS2 de mamífero. Las técnicas de marcaje apropiadas, por ejemplo, anticuerpos anti-FLAG, permitirán el marcaje específico de clones apropiados.

ANEXO 1

Secuencia 1 |c|AF461422 Longitud 629 (1 .. 629)

Secuencia 2 |c|DX0992-SEC ID N° 2 Longitud 384 (1 .. 384)



NOTA: Las estadísticas (valor de bit y valor esperado) se calculan basándose en el tamaño de base de datos nr

Valor = 792 bits (2045), Espera = 0,0

Identidades = 380/380 (100%), Positivos = 380/380 (100%)

Problema: 1 MNQVTIQWDAVIALYILFSWCHGGITNINCSGHIWVEPATIFKMGMNISYCOAAIKNCQ 60
 MNQVTIQWDAVIALYILFSWCHGGITNINCSGHIWVEPATIFKMGMNISYCOAAIKNCQ
 Sujeto: 1 MNQVTIQWDAVIALYILFSWCHGGITNINCSGHIWVEPATIFKMGMNISYCOAAIKNCQ 60

Problema: 61 PRKLHFKYKNGIKERFQITRINKTTARLWYKNFLEPHASMYCTAECPKHPQETLICGKDIS 120
 PRKLHFKYKNGIKERFQITRINKTTARLWYKNFLEPHASMYCTAECPKHPQETLICGKDIS
 Sujeto: 61 PRKLHFKYKNGIKERFQITRINKTTARLWYKNFLEPHASMYCTAECPKHPQETLICGKDIS 120

Problema: 121 SGYPDPDIPDEVTCVIYREYSGNMTCTWNAGKLTIDTKYVHVKSLETEEBQQYLTSSYIN 180
 SGYPDPDIPDEVTCVIYREYSGNMTCTWNAGKLTIDTKYVHVKSLETEEBQQYLTSSYIN
 Sujeto: 121 SGYPDPDIPDEVTCVIYREYSGNMTCTWNAGKLTIDTKYVHVKSLETEEBQQYLTSSYIN 180

Problema: 181 ISTDLSQGGKKYLVWVQAANALGMEESKQLQIHLDDIVIPSAAVISRAETINATVPKTI 240
 ISTDLSQGGKKYLVWVQAANALGMEESKQLQIHLDDIVIPSAAVISRAETINATVPKTI
 Sujeto: 181 ISTDLSQGGKKYLVWVQAANALGMEESKQLQIHLDDIVIPSAAVISRAETINATVPKTI 240

Problema: 241 YWDSQTTIEKVSCEMRYKATTNQTWNVKEFDINFTYVQQSEFYLEPNIKYVPQVRCQETG 300
 YWDSQTTIEKVSCEMRYKATTNQTWNVKEFDINFTYVQQSEFYLEPNIKYVPQVRCQETG
 Sujeto: 241 YWDSQTTIEKVSCEMRYKATTNQTWNVKEFDINFTYVQQSEFYLEPNIKYVPQVRCQETG 300

Problema: 301 KRYWQPWSSPFFHKTPETVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIGLLGM 360
 KRYWQPWSSPFFHKTPETVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIGLLGM
 Sujeto: 301 KRYWQPWSSPFFHKTPETVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIGLLGM 360

Problema: 361 IVFAVMLSILSLIGIFNRSF 380
 IVFAVMLSILSLIGIFNRSF
 Sujeto: 361 IVFAVMLSILSLIGIFNRSF 380

tiempo de CPU: 0,12 s. usuario 0,10 s. sis. 0,22 s. totales

Lambda	K	H
0,317	0,133	0,400

Incompleto	K	H
Lambda	0,0410	0,140

ES 2 322 791 T3

Matriz: BLOSUM62

Penalizaciones de Hueco: Existencia: 11, Extensión: 1

5 Número de Secuencias: 1

Número de Solicitudes a BD: 2080

Número de extensiones: 1142

10 Número de extensiones satisfactorias: 1

Número de secuencias mejores que 10,0: 1

15 Número de HSP mejores que 10,0 sin huecos: 1

Número de HSP incompletos: 1

Número de HSP incompletos satisfactoriamente: 1

20 Número de extensiones adicionales incompletas para HSP superiores a 10,0: 0

Longitud de problema: 629

25 Longitud de base de datos: 1, 113, 347, 412

Longitud de ajuste: 139

Longitud eficaz de problema: 490

30 Longitud eficaz de base de datos: 1, 113, 347, 273

Espacio de búsqueda eficaz: 545540163770

35 Espacio de búsqueda eficaz usado: 545540163770

Umbral de palabras vecinas: 9

Ventana para solicitudes múltiples: 0

40 X1: 16 (7,3 bits)

X2: 129 (49,7 bits)

45 X3: 129 (49,7 bits)

S1: 41 (21,7 bits)

S2: 81 (35,8 bits)

50

55

60

65

NCBI Nucleotide

Published Nucleotide Protein Genome Structure PDB Taxonomy Clusters Books

Nucleotide

You need JavaScript to work with this page.

GenBank 5 Send to

begin end

Format: Text, FASTA, FASTQ, SRA, XML, etc.

Options: ☐ FASTA ☐ FASTQ ☐ SRA ☐ XML ☐ etc.

1: AF461422. Reports Homo sapiens
 inte...[gi:21239251]

Links

LOCUS AF461422 2826 pb ARNm lineal FRI 29-MAYO-2002

DEFINICIÓN ARNm de receptor Interleuquina-23 (IL-23R) de Homo sapiens, cds completos

ENTRADA AF461422

VERSIÓN AF461422.1 GI:21239251

PALABRAS CLAVE

FUENTE Homo sapiens (humano)

ORGANISMO Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Catarrhini;
 Hominidae; Homo.

REFERENCIA 1 (bases 1 a 2826)

AUTORES Parham,C., Chirica,M., Timans,J., Vaisberg,E., Travis,M.,
 Cheung,J., Pflanz,S., Zhang,R., Singh,K.P., Vega,F., To,W.,
 Wagner,J., O'Farrell,A.-M., McClanahan,T., Zurawski,S., Hannum,C.,
 Gorman,D., Rennick,D.M., Kastelein,R.A., de Waal Malefyt,R. y
 Moore,K.W.

TÍTULO Un receptor para la citoquina heterodimérica IL-23 está compuesto de IL-12Rbeta1 y una
 subunidad de receptor de citoquina nueva, IL-23R

REVISTA J. Immunol. 168 (11), 5699-5708 (2002)

PUBMED 12023369

REFERENCIA 2 (bases 1 a 2826)

AUTORES Parham,C., Chirica,M., Timans,J., Vaisberg,E., Travis,M.,
 Cheung,J., Pflanz,S., Zhang,R., Singh,K.P., Vega,F., To,W.,
 Wagner,J., O'Farrell,A.-M., McClanahan,T., Zurawski,S., Hannum,C.,
 Gorman,D., Rennick,D.M., Kastelein,R.A., de Waal Malefyt,R. and
 Moore,K.W.

TÍTULO Presentación Directa

REVISTA Presentada (19-DIC-2001) Immunology, DNAX Research, 901 California
 Ave., Palo Alto, CA 94304, USA

ELEMENTOS Emplazamiento/Calificadores

fuelle 1..2826
 /organismo="Homo sapiens"
 /tipo de mol="mRNA"
 /ref de bd="taxon:9606"
 /cromosoma="1"
 /mapa="1p31,2-1p32,1"

gen 1..2826
 /gen="IL-23R"

CDS 86..1975
 /gen="IL-23R"
 /nota="receptor de citoquina hematopoyético"
 /inicio de codón=1
 /producto="receptor de interleuquina-23"

ES 2 322 791 T3

/id de proteína = "AAM44229.1"
 /refx de bd = "GI: 21239252"
 /traducción = "MNQVTIQWDAVIALYILPSWCHGGITNINCSGHIWVEPATIFKM
 GNNISIIYCOAAIKNCQPRKLFHYKNGIKERFQITRINKTTARLWYKNFLBPHASMYCT
 ABCPKHPQETLICGKDISSGYPPDIPDEVTCVIEYSGNMTCTWAGKLTYYIDTKYVV
 HVKSLETEEBQQYLTSYINISTDSLQGGKKYLWVQAAANALGMEESQQLQIHLDDIV
 IPSAAVISRAETINATVPKTIYWDSTTTIEKVSCEMRYKATTNQTMVKEFDNTPTY
 VQSEFYLEPNIKYVQVRCQETGKRYWQFWSSPFFHKTPETVPQVTSKAFQHDWNS
 GLTVASISTGHLTSDNRGDIGLLGMIVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLI
 PKWLYEDI PMKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYVDPMITIKEIP IPEHKPTDY
 KKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKQPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLT
 LKPFVDSLDSGNPRLQKHPNFAPSVSVNSLSNTIFLGLSLILNQGCSSPDQNS
 VEETTMILLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCIGIVNKEKLPSTNTYFPQWILESEFNRI
 SLLEK"

ORIGEN

```

1 acaagggtgg cagcctggct ctgaagtgga attatgtgct tcaaacagggt tgaagagggt
61 aaacagtcctt ttctctgcttc cagacatgaa tcaggtcact attcaatggg atgcagtaat
121 agccctttac atactcttca gctgggtgca tggagggaatt acaaatataa actgctctgg
181 ccacatctgg gtagaacagg ccacaatttt taagatgggt atgaatatct ctatatattg
241 ccaagcagca attaagaact gccaaccaag gaaacttcat tttataaaa atggcatcaa
301 agaaagattt caaatcaca ggattaataa acaacagct cggctttggt ataaaaactt
361 tctggaacca catgcttcta tgtactgcac tgctgaatgt cccaaacatt ttcaagagac
421 actgatattg ggaagaagaca ttctctctgg atatccgcca gatattcctg atgaagtaac
481 ctgtgtcatt tatgaatatt caggcaacat gacttgcacc tggagtctg ggaagctcac
541 ctacatagac acaaaatacg tggatcatgt gaagagtta gagacagaag aagagcaaca
601 gtatctcacc tcaagctata ttaacatctc cactgattca ttacaagggt gcaagaagta
661 cttggtttgg gtccaagcag caaacgcact aggcattggaa gactcaaac aactgcaaat
721 tcacctggat gatattagta taccttctgc agccgtcatt tccagggtg agacataaaa
781 tgctacagtg cccaagacca taattttatt ggatagtcaa acaacaattg aaaagggttc
841 ctgtgaaatg agatacaagg ctacaacaaa ccaacttgg aatgttaaa aatttgacac
901 caattttaca tatgtgcaac agtcagaatt ctacttggag ccaaacatta agtaagctatt
961 tcaagtgaga tgtcaagaaa caggcaaaag gtactggcag ccttggagtt caccgtttt
1021 tcataaaaca cctgaaacag ttccccaggt cacatcaaaa gcattccaac atgacacatg
1081 gaattctggg ctaacagttg ctccatctc tacagggcac ctacttctg acaacagagg
1141 agacattgga cttttattgg gaatgatcgt ctttgcgtgt atgttgtcaa ttctttctt
1201 gattgggata tttaacagat cattccgaac tgggattaaa agaaggatct tattgttaat
1261 accaaagtgg ctttatgaag atattcctaa tatgaaaaac agcaatgttg tgaatatgct
1321 acaggaaat agtgaactta tgaataataa ttccagtgag caggctctat atgttgatcc
1381 catgattaca gagataaaag aaatcttcat cccagaacac aagcctacag actacaagaa
1441 ggagaatata ggacccctgg agacaagaga ctaccgcaa aactcgtat tcgacaatc
1501 tacagttgta tatattcctg atctcaacac tggatataaa ccccaattt caaatttct
1561 gcctgaggga agccatctca gcaataataa tgaattact tccttaacac ttaaacacc
1621 agttgattcc ttagactcag gaaataatcc caggttaca aagcctccta attttgctt
1681 ttctgtttca agtggaatt cactaagcaa cacaatatt cttggagaat taagcctcat
1741 attaaatcaa ggagaatgca gttctcctga catacaaaac tcagtagagg aggaaccac
1801 catgcttttg gaaaatgatt caccagtgaa aactattcca gaacagacc tgcttctga
1861 tgaattttgt tcctgttttg ggatcgtgaa tgaggagttg ccatctatta atacttatt
1921 tccacaaaat attttgaaa gccacttcaa taggatttca ctcttgaaa agtagagctg
1981 tgtggtcaaa atcaatatga gaaagctgcc ttgcaatctg aacttgggtt ttccctgcaa
2041 tagaaattga attctgcctc ttttgaaa aaatgtattc acatacaaat cttcacatgg
2101 acacatgttt tcatttccct tggataaata cctaggtagg ggattgctgg gccatatgat
2161 aagcatatgt ttcagttcta ccaatcttgt ttccagagta gtgacattc tgtgctcta
2221 ccatacccat gtaagaattc ccggagctc catgcctttt taattttagc cattctctg
2281 cctcatttct taaaattaga gaattaaggt ccgaagggtg gaacatgctt catggtcaca
2341 catacaggca caaaaacagc attatgtgga cgcctcatgt attttttata gactcaacta
2401 tttctcttct attttccctc attgaaagat gcaaaacagc tctctattgt gtacagaag
2461 ggtaataat gcaaaatacc tggtagtaaa ataatgtctg aaattttcc tttaaaatag
2521 aatcattagg ccaggcgtgg tggctcatgc ttgtaatccc agcactttg taggctgagg
2581 tgggtggatc acctgaggtc aggagttcga gtccagcctg gccaatagc tgaaccctg
2641 tctctactaa aattcaaaaa attagccggc catggtggca ggtgcttgta atcccagcta
2701 cttgggagge tgaggcagga gaatcactg aaccaggaag gcagagggtg cactgagctg

```

2761 agattgtgcc actgcactcc agcctgggca acaagagcaa aactctgtct ggaaaaaaaa
 2821 aaaaaa

//

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende una homología de secuencia de aminoácidos de al menos el 70% a la
5 secuencia de aminoácidos madura (residuos 1-361) de SEC ID N°: 2.
2. El polipéptido de la reivindicación 1 en el que el polipéptido comprende una homología de secuencia de aminoácidos de al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos madura (residuos 1-361) de SEC ID N°: 2.
- 10 3. El polipéptido de la reivindicación 2 en el que el polipéptido comprende una homología de secuencia de aminoácidos de al menos el 98% a la secuencia de aminoácidos madura (residuos 1-361) de SEC ID N°: 2.
4. El polipéptido de la reivindicación 3 en el que el polipéptido comprende la secuencia de residuos 1-361 de SEC ID N°: 2.
- 15 5. El polipéptido de la reivindicación 1 en el que el polipéptido comprende una homología de secuencia de aminoácidos de al menos el 70% a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2.
6. El polipéptido de la reivindicación 5 en el que el polipéptido comprende una homología de secuencia de aminoácidos de al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2.
- 20 7. El polipéptido de la reivindicación 6 en el que el polipéptido comprende la secuencia de SEC ID N°: 2.
8. Una formulación farmacéutica que comprende:
- 25 a) el polipéptido de la reivindicación 1 y
b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
9. Una composición de materia que comprende una proteína de fusión que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 y una etiqueta de detección o purificación.
- 30 10. Un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica el péptido de la reivindicación 1.
- 35 11. El ácido nucleico de la reivindicación 10 que comprende la secuencia de residuos 70-1152 de SEC ID N°: 1.
12. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.
13. Una célula que comprende el vector de expresión de la reivindicación 12.
- 40 14. La célula de la reivindicación 13, donde dicha célula es:
- a) una célula bacteriana;
45 b) una célula de levadura;
c) una célula de insecto o
d) una célula de mamífero.
- 50 15. El ácido nucleico de la reivindicación 10 que comprende un marcador detectable.
16. Un ácido nucleico que hibrida en condiciones de lavado de 30 minutos a 45°C y sal 500 mM a la porción codificante de SEC ID N°: 1.
- 55 17. El ácido nucleico de la reivindicación 16, en el que dichas condiciones de lavado son 30 minutos a 55°C y sal 150 mM.
18. Un ácido nucleico que comprende una homología de secuencia de nucleótidos de al menos el 71% con la parte codificante (residuos 1-1152) de SEC ID N°: 1.
- 60 19. El ácido nucleico de la reivindicación 18 que comprende una homología de secuencia de al menos el 80% con parte codificante (residuos 1-1152) de SEC ID N°: 1.
- 65 20. El ácido nucleico de la reivindicación 19 que comprende una homología de secuencia de al menos el 95% con parte codificante (residuos 1-1152) de SEC ID N°: 1.

ES 2 322 791 T3

21. El ácido nucleico de la reivindicación 20 que comprende la parte codificante (residuos 1-1152) de SEC ID N°: 1.

22. Un compuesto de unión que comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos madura (residuos 1-361) de SEC ID N°: 2.

23. Un compuesto de unión que comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos madura (residuos 1-361) de SEC ID N°: 2.

24. El compuesto de unión de la reivindicación 22 o reivindicación 23 que comprende un fragmento de anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en un fragmento Fv, un fragmento Fab y un fragmento Fab2.

25. El compuesto de unión de la reivindicación 22 o reivindicación 23 en el que el compuesto de unión está marcado de forma detectable.

26. Una formulación farmacéutica que comprende:

a) el compuesto de unión de la reivindicación 22 o la reivindicación 23 y

b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable,

en el que el compuesto de unión es un anticuerpo que tiene actividad agonista o antagonista.

27. Un método *in vitro* para producir un complejo antígeno:anticuerpo, que comprende:

a) poner en contacto el polipéptido de la reivindicación 1 con el compuesto de unión de la reivindicación 22 o reivindicación 23 y

b) permitir que se forme dicho complejo.

28. Un complejo que comprende:

a) el polipéptido de la reivindicación 1 y

b) el compuesto de unión de la reivindicación 22 o reivindicación 23.

29. El compuesto de unión de la reivindicación 22 o reivindicación 23, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

30. El compuesto de unión de la reivindicación 22 o reivindicación 23, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

31. El compuesto de unión de la reivindicación 22 o reivindicación 23, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.

32. Uso del compuesto de unión de la reivindicación 22 o reivindicación 23 en la preparación de un medicamento, en el que el compuesto de unión es un anticuerpo que tiene actividad agonista o antagonista.

33. Una composición que comprende el compuesto de unión de la reivindicación 22 o reivindicación 23 para uso como un medicamento, en la que el compuesto de unión es un anticuerpo que tiene actividad agonista o antagonista.

ES 2 322 791 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID Nº: 1 es secuencia de nucleótido DCRS2 de primate.

SEC ID Nº: 2 es secuencia de polipéptido DCRS2 de primate.

SEC ID Nº: 3 es secuencia de traducción inversa DCRS2 de primate.

SEC ID Nº: 4 es secuencia de polipéptido NR6 de primate.

SEC ID Nº: 5 es secuencia de polipéptido NR6 de roedor.

SEC ID Nº: 6 es secuencia de polipéptido p40 de primate.

SEC ID Nº: 7 es secuencia de polipéptido p40 de roedor.

SEC ID Nº: 8 es secuencia de polipéptido Ebi3 de roedor.

SEC ID Nº: 9 es secuencia de polipéptido Ebi3 de primate.

SEC ID Nº: 10 secuencia de polipéptido de subunidad alfa de receptor IL-11 de roedor.

SEC ID Nº: 11 secuencia de polipéptido de subunidad alfa de receptor IL-11 de primate.

SEC ID Nº: 12 secuencia de polipéptido de subunidad alfa de receptor IL-6 de primate.

SEC ID Nº: 13 secuencia de polipéptido de subunidad alfa de receptor IL-6 de roedor.

<110> Schering Corporation

<120> Proteínas Receptoras de Mamíferos; Reactivos y Métodos Relacionados

<130> DX0992 PCT

<140>

<141>

<150> US 09/322.913

<151> 01-06-1999

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1155

<212> ADN

<213> primate

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1152)

<220>

<221>péptido mat

<222> (70)..(1152)

ES 2 322 791 T3

<400> 1

	atg aat cag gtc act att caa tgg gat gca gta ata gcc ctt tac ata	48
	Met Asn Gln Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile	
5	-20 -15 -10	
	ctc ttc agc tgg tgt cat gga gga att aca aat ata aac tgc tct ggc	96
	Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly	
	-5 -1 1 5	
10	cac atc tgg gta gaa cca gcc aca att ttt aag atg ggt atg aat atc	144
	His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile	
	10 15 20 25	
	tct ata tat tgc caa gca gca att aag aac tgc caa cca agg aaa ctt	192
	Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu	
15	30 35 40	
	cat ttt tat aaa aat ggc atc aaa gaa aga ttt caa atc aca agg att	240
	His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile	
	45 50 55	
20	aat aaa aca aca gct cgg ctt tgg tat aaa aac ttt ctg gaa cca cat	288
	Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His	
	60 65 70	
	gct tct atg tac tgc act gct gaa tgt ccc aaa cat ttt caa gag aca	336
25	Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr	
	75 80 85	
	ctg ata tgt gga aaa gac att tct tct gga tat ccg cca gat att cct	384
	Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro	
	90 95 100 105	
30	gat gaa gta acc tgt gtc att tat gaa tat tca ggc aac atg act tgc	432
	Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys	
	110 115 120	
	acc tgg aat gct ggg aag ctc acc tac ata gac aca aaa tac gtg gta	480
35	Thr Trp Asn Ala Gly Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val	
	125 130 135	
	cat gtg aag agt tta gag aca gaa gaa gag caa cag tat ctc acc tca	528
	His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser	
	140 145 150	
40	agc tat att aac atc tcc act gat tca tta caa ggc ggc aag aag tac	576
	Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr	
	155 160 165	
	ttg gtt tgg gtc caa gca gca aac gca cta ggc atg gaa gag tca aaa	624
45	Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys	
	170 175 180 185	
	caa ctg caa att cac ctg gat gat ata gtg ata cct tct gca gcc gtc	672
	Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val	
	190 195 200	
50	att tcc agg gct gag act ata aat gct aca gtg ccc aag acc ata att	720
	Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile	
	205 210 215	
	tat tgg gat agt caa aca aca att gaa aag gtt tcc tgt gaa atg aga	768
55	Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg	
	220 225 230	
	tac aag gct aca aca aac caa act tgg aat gtt aaa gaa ttt gac acc	816
	Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr	
60	235 240 245	
	aat ttt aca tat gtg caa cag tca gaa ttc tac ttg gag cca aac att	864
	Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile	
	250 255 260 265	
65	aag tac gta ttt caa gtg aga tgt caa gaa aca ggc aaa agg tac tgg	912
	Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp	
	270 275 280	

ES 2 322 791 T3

cag cct tgg agt tca ccg ttt ttt cat aaa aca cct gaa aca gtt ccc 960
 Gln Pro Trp Ser Ser Pro Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro
 285 290 295

5 cag gtc aca tca aaa gca ttc caa cat gac aca tgg aat tct ggg cta 1008
 Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu
 300 305 310

10 aca gtt gct tcc atc tct aca ggg cac ctt act tct gac aac aga gga 1056
 Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly
 315 320 325

15 gac att gga ctt tta ttg gga atg atc gtc ttt gct gtt atg ttg tca 1104
 Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser
 330 335 340 345

20 att ctt tct ttg att ggg ata ttt aac aga tca ttc ccg aac tgg gat 1152
 Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Pro Asn Trp Asp
 350 355 360

taa 1155

25 <210> 2
 <211> 384
 <212> PRT
 30 <213> primate
 <400> 2

35 Met Asn Gln Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile
 -20 -15 -10

Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly
 -5 -1 1 5

40 His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile
 10 15 20 25

45 Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu
 30 35 40

His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile
 45 50 55

50 Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His
 60 65 70

55 Ala Ser Met Tyr Cys Trp Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr
 75 80 85

Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro
 90 95 100 105

60 Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys
 110 115 120

Thr Trp Asn Ala Gly Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val
 125 130 135

65 His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser

ES 2 322 791 T3

	140	145	150
5	Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr 155	160	165
	Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys 170	175	180 185
10	Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val 190	195	200
	Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile 205	210	215
15	Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg 220	225	230
20	Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr 235	240	245
	Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile 250	255	260 265
25	Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp 270	275	280
30	Gln Pro Trp Ser Ser Pro Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro 285	290	295
	Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu 300	305	310
35	Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly 315	320	325
40	Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser 330	335	340 345
	Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Pro Asn Trp Asp 350	355	360

45

<210> 3

<211> 1152

50 <212> ADN

<213> primate

55

60

65

ES 2 322 791 T3

<400> 3

atgaaycarg tnacnathca rtgggaygcn gtnathgcn y tntayathyt nttywsntgg 60
 5 tgycayggng gnathacnaa yathaaytgy wsnngncaya thtgggtnga rccngcnacn 120
 athttyaara tgggnatgaa yathwsnath taytgycarg cngcnathaa raaytgycar 180
 10 ccnmgnaary tncayttyta yaaraayggn athaargarm gnttycarat hacnmgnath 240
 aayaaracna cngcnmgnyt ntggatayaar aayttyytng arccncaygc nwsnatgtay 300
 15 tgyacngcng artgyccnaa rcaytttycar garacnytna thtgyggnaa rgayathwsn 360
 wsnngntayc cncngayat hccngaygar gtnacntgyg tnathtayga rtaywsnggn 420
 20 aayatgacnt gyacntggaa ygcnggnaar ytnacntaya thgayacnaa rtaygtngtn 480
 caygtnaarw snytngarac ngargargar carcartayy tnacnwsnws ntayathaay 540
 25 athwsnacng aywsnytnca rggnggnaar aartayytng tntgggtncn rgcngcnaay 600
 gcnytnggna tggargarws naarcarytn carathcayy tngaygayat hgtnathccn 660
 30 wsnngcngcng tnathwsnmg ngcngaracn athaaygna cngtnccnaa racnathath 720
 taytgggayw snacaracnac nathgaraar gtnwsntgyg aratgmnta yaargcnacn 780
 35 acnaaycara cntggaaygt naargartty gayacnaayt tyacntaygt ncargarwsn 840
 garttytayy tngarccnaa yathaartay gtnttycarg tnmqntgyca rgaracnggn 900
 aarmgntayt ggcarrcntg gwsnwsnccn ttyttycaya aracncnga racngtnccn 960
 40 cargtnacnw snaargcntt ycarcaygay acntggaayw snggnytnac ngtnngcnwsn 1020
 athwsnacng gncayytnac nwsngayaay mgngnggaya thggnytnyt nytnggnatg 1080
 45 athgtnttyg cngtnatgyt nwsnathytn wsnynathg gnathttyaa ymgntwntty 1140
 ccnaaytggg ay 1152

50 <210> 4
 <211> 410
 <212> PRT
 55 <213> primate

60

65

ES 2 322 791 T3

<400> 4

5	Met	Pro	Ala	Gly	Arg	Arg	Gly	Pro	Ala	Ala	Gln	Ser	Ala	Arg	Arg	Pro	1	5	10	15
	Pro	Pro	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Val	Leu	Gly	Ala	Pro	20	25	30	
10	Arg	Ala	Gly	Ser	Gly	Ala	His	Thr	Ala	Val	Ile	Ser	Pro	Gln	Asp	Pro	35	40	45	
	Thr	Leu	Leu	Ile	Gly	Ser	Ser	Leu	Leu	Ala	Thr	Cys	Ser	Val	His	Gly	50	55	60	
15	Asp	Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Ala	Glu	Gly	Leu	Tyr	Trp	Thr	Leu	Asn	Gly	65	70	75	80
20	Arg	Arg	Leu	Pro	Pro	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Leu	Asn	Ala	Ser	Thr	Leu	85	90	95	
	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Asn	Leu	Asn	Gly	Ser	Arg	Gln	Arg	Ser	Gly	Asp	100	105	110	
25	Asn	Leu	Val	Cys	His	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Ile	Leu	Ala	Gly	Ser	Cys	115	120	125	
30	Leu	Tyr	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Glu	Lys	Pro	Val	Asn	Ile	Ser	Cys	Trp	130	135	140	

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 322 791 T3

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

<210> 5

<211> 407

60 <212> PRT

<213> roedor

<400> 5

65 Arg Pro Leu Ser Ser Leu Trp Ser Pro Leu Leu Leu Cys Val Leu Gly
 1 5 10 15

ES 2 322 791 T3

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

ES 2 322 791 T3

	340	345	350
5	Lys Gln Phe Leu Gly Trp Leu Lys Lys His Ala Tyr Cys Ser Asn Leu 355 360 365		
	Ser Phe Arg Leu Tyr Asp Gln Trp Arg Ala Trp Met Gln Lys Ser His 370 375 380		
10	Lys Thr Arg Asn Gln Asp Glu Gly Ile Leu Pro Ser Gly Arg Arg Gly 385 390 395 400		
	Ala Ala Arg Gly Pro Ala Gly 405		
15	<210> 6 <211> 328 <212> PRT		
20	<213> primate <400> 6		
25	Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu 1 5 10 15		
	Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val 20 25 30		
30	Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu 35 40 45		
	Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln 50 55 60		
35	Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys 65 70 75 80		
40	Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val 85 90 95		
	Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp 100 105 110		
45	Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe 115 120 125		
50	Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp 130 135 140		
	Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg 145 150 155 160		
55	Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser 165 170 175		
60	Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu 180 185 190		
	Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile 195 200 205		
65	Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr		

ES 2 322 791 T3

	210	215	220
5	Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn 225 230 235 240		
	Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp 245 250 255		
10	Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr 260 265 270		
	Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg 275 280 285		
15	Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala 290 295 300		
20	Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser 305 310 315 320		
	Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser 325		
25	<210> 7		
	<211> 335		
	<212> PRT		
30	<213> roedor		
	<400> 7		
35	Met Cys Pro Gln Lys Leu Thr Ile Ser Trp Phe Ala Ile Val Leu Leu 1 5 10 15		
	Val Ser Pro Leu Met Ala Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val 20 25 30		
40	Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu 35 40 45		
	Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln 50 55 60		
45	Arg His Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys 65 70 75 80		
50	Glu Phe Leu Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr 85 90 95		
	Leu Ser His Ser His Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asn Gly Ile Trp 100 105 110		
55	Ser Thr Glu Ile Leu Lys Asn Phe Lys Asn Lys Thr Phe Leu Lys Cys 115 120 125		
60	Glu Ala Pro Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln 130 135 140		
	Arg Asn Met Asp Leu Lys Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Ser Pro 145 150 155 160		
65	Asp Ser Arg Ala Val Thr Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys		

ES 2 322 791 T3

	165	170	175
5	Val Thr Leu Asp Gln Arg Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln 180 185 190		
	Glu Asp Val Thr Cys Pro Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu 195 200 205		
10	Ala Leu Glu Ala Arg Gln Gln Asn Lys Tyr Glu Asn Tyr Ser Thr Ser 210 215 220		
15	Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln 225 230 235 240		
	Met Lys Pro Leu Lys Asn Ser Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro 245 250 255		
20	Asp Ser Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Lys Phe Phe Val 260 265 270		
25	Arg Ile Gln Arg Lys Lys Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu Glu Gly Cys 275 280 285		
	Asn Gln Lys Gly Ala Phe Leu Val Glu Lys Thr Ser Thr Glu Val Gln 290 295 300		
30	Cys Lys Gly Gly Asn Val Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Asn 305 310 315 320		
35	Ser Ser Cys Ser Lys Trp Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg Ser 325 330 335		

<210> 8

<211> 228

<212> PRT

<213> roedor

ES 2 322 791 T3

<400> 8

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

<210> 9

<211> 229

<212> PRT

<213> primate

ES 2 322 791 T3

<400> 9

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

<210> 10

<211> 432

<212> PRT

<213> roedor

ES 2 322 791 T3

<400> 10

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

ES 2 322 791 T3

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

<210> 11

<211> 422

50 <212> PRT

<213> primate

<400> 11

55	Met Ser Ser Ser Cys Ser Gly Leu Ser Arg Val Leu Val Ala Val Ala 1 5 10 15
60	Thr Ala Leu Val Ser Ala Ser Ser Pro Cys Pro Gln Ala Trp Gly Pro 20 25 30
	Pro Gly Val Gln Tyr Gly Gln Pro Gly Arg Ser Val Lys Leu Cys Cys 35 40 45
65	Pro Gly Val Thr Ala Gly Asp Pro Val Ser Trp Phe Arg Asp Gly Glu

ES 2 322 791 T3

	50		55		60
5	Pro Lys Leu Leu Gln Gly	65	Pro Asp Ser Gly Leu Gly His Glu Leu Val	70	75 80
	Leu Ala Gln Ala Asp Ser Thr Asp Glu Gly Thr Tyr Ile Cys Gln Thr	85		90	95
10	Leu Asp Gly Ala Leu Gly Gly Thr Val Thr Leu Gln Leu Gly Tyr Pro	100		105	110
	Pro Ala Arg Pro Val Val Ser Cys Gln Ala Ala Asp Tyr Glu Asn Phe	115		120	125
15	Ser Cys Thr Trp Ser Pro Ser Gln Ile Ser Gly Leu Pro Thr Arg Tyr	130		135	140
20	Leu Thr Ser Tyr Arg Lys Lys Thr Val Leu Gly Ala Asp Ser Gln Arg	145		150	155 160
	Arg Ser Pro Ser Thr Gly Pro Trp Pro Cys Pro Gln Asp Pro Leu Gly	165		170	175
25	Ala Ala Arg Cys Val Val His Gly Ala Glu Phe Trp Ser Gln Tyr Arg	180		185	190
	Ile Asn Val Thr Glu Val Asn Pro Leu Gly Ala Ser Thr Arg Leu Leu	195		200	205
30	Asp Val Ser Leu Gln Ser Ile Leu Arg Pro Asp Pro Pro Gln Gly Leu	210		215	220
35	Arg Val Glu Ser Val Pro Gly Tyr Pro Arg Arg Leu Arg Ala Ser Trp	225		230	235 240
	Thr Tyr Pro Ala Ser Trp Pro Cys Gln Pro His Phe Leu Leu Lys Phe	245		250	255
40	Arg Leu Gln Tyr Arg Pro Ala Gln His Pro Ala Trp Ser Thr Val Glu	260		265	270
	Pro Ala Gly Leu Glu Glu Val Ile Thr Asp Ala Val Ala Gly Leu Pro	275		280	285
45	His Ala Val Arg Val Ser Ala Arg Asp Phe Leu Asp Ala Gly Thr Trp	290		295	300
50	Ser Thr Trp Ser Pro Glu Ala Trp Gly Thr Pro Ser Thr Gly Thr Ile	305		310	315 320
	Pro Lys Glu Ile Pro Ala Trp Gly Gln Leu His Thr Gln Pro Glu Val	325		330	335
55	Glu Pro Gln Val Asp Ser Pro Ala Pro Pro Arg Pro Ser Leu Gln Pro	340		345	350
	His Pro Arg Leu Leu Asp His Arg Asp Ser Val Glu Gln Val Ala Val	355		360	365
60	Leu Ala Ser Leu Gly Ile Leu Ser Phe Leu Gly Leu Val Ala Gly Ala	370		375	380

ES 2 322 791 T3

Leu Ala Leu Gly Leu Trp Leu Arg Leu Arg Arg Gly Gly Lys Asp Gly
 385 390 395 400
 5 Ser Pro Lys Pro Gly Phe Leu Ala Ser Val Ile Pro Val Asp Arg Arg
 405 410 415
 Pro Gly Ala Pro Asn Leu
 420
 10 <210> 12
 <211> 468
 <212> PRT
 15 <213> primate
 <400> 12
 20 Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
 20 25 30
 25 Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
 35 40 45
 30 Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
 50 55 60
 Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
 65 70 75 80
 35 Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
 100 105 110
 Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
 115 120 125
 45 Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
 130 135 140
 Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
 145 150 155 160
 50 Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
 165 170 175
 55 Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
 180 185 190
 Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
 195 200 205
 60 Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220
 65 Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240

ES 2 322 791 T3

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255
 5 Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270
 10 Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285
 Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300
 15 Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
 305 310 315 320
 20 Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
 325 330 335
 Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
 340 345 350
 25 Ser Leu Pro Val Gln Asp Ser Ser Ser Val Pro Leu Pro Thr Phe Leu
 355 360 365
 Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Thr Leu Leu Cys Ile Ala Ile
 370 375 380
 30 Val Leu Arg Phe Lys Lys Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly
 385 390 395 400
 35 Lys Thr Ser Met His Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Gln Leu Val Pro Glu
 405 410 415
 Arg Pro Arg Pro Thr Pro Val Leu Val Pro Leu Ile Ser Pro Pro Val
 420 425 430
 40 Ser Pro Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asn Thr Ser Ser His Asn Arg Pro
 435 440 445
 45 Asp Ala Arg Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Tyr
 450 455 460
 Phe Phe Pro Arg
 465
 50 <210> 13
 <211> 460
 <212> PRT
 55 <213> primate
 <400> 13
 60 Met Leu Thr Val Gly Cys Thr Leu Leu Val Ala Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 Ala Val Ala Leu Val Leu Gly Ser Cys Arg Ala Leu Glu Val Ala Asn
 20 25 30
 65 Gly Thr Val Thr Ser Leu Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Ile Cys Pro
 35 40 45

ES 2 322 791 T3

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

65

ES 2 322 791 T3

	Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Cys Val Phe Ile Ile	
	370 375 380	
5	Leu Arg Leu Lys Gln Lys Trp Lys Ser Glu Ala Glu Lys Glu Ser Lys	
	385 390 395 400	
10	Thr Thr Ser Pro Pro Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Pro Leu Lys Pro	
	405 410 415	
	Thr Phe Leu Leu Val Pro Leu Leu Thr Pro His Ser Ser Gly Ser Asp	
	420 425 430	
15	Asn Thr Val Asn His Ser Cys Leu Gly Val Arg Asp Ala Gln Ser Pro	
	435 440 445	
20	Tyr Asp Asn Ser Asn Arg Asp Tyr Leu Phe Pro Arg	
	450 455 460	
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		