



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 086**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07006343 .3**

96 Fecha de presentación : **30.06.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1860188**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2007**

54

Título: **Receptor de citoquina humana.**

30

Prioridad: **07.07.1999 US 348854**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.08.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.08.2011

73

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

72

Inventor/es: **Presnell, Scott R.;**
Burkhead, Steven K. y
Pownder, Sarah L.

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 364 086 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

Receptor de citoquina humana

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere en general a una nueva proteína expresada por células humanas. En particular, la presente invención se refiere a un gen nuevo que codifica un receptor, designado como "Zcytor14" y a moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos Zcytor14.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las citoquinas son proteínas pequeñas solubles que median un conjunto de efectos biológicos, incluyendo la regulación del crecimiento y la diferenciación de muchos tipos de células (véase, por ejemplo Arai et al., Annu. Rev. Biochem. 59:783 (1990); Mosmann, Curr. Opin. Immunol. 3:311 (1991); Paul and Seder, Cell 76:241 (1994)). Las proteínas que constituyen el grupo de citoquinas incluyen interleuquinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de la necrosis tumoral y otras moléculas reguladoras. Por ejemplo, la interleuquina-17 humana es una citoquina que estimula la expresión de la interleuquina-6, la molécula de adhesión intracelular 1, la interleuquina-8, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos y la expresión de prostaglandina E2, y juega un papel en la maduración preferencial de precursores hematopoyéticos CD34+ en neutrófilos (Yao et al., J. Immunol. 155: 5483 (1995); Fossiez et al., J. Exp. Med. 183:2593 (1996)).

[0003] Los receptores que se unen a citoquinas están compuestas habitualmente de uno o más proteínas de membrana integrales que se unen a la citoquina con afinidad elevada y translucen esta unión a la célula a través de las partes citoplasmáticas de ciertas subunidades de receptores. Los receptores de citoquina se han agrupado en varias clases en base a las similitudes en sus dominios de unión a ligando extracelular. Por ejemplo, las cadenas de receptores responsables de la unión y/o transducción del efecto de los interferones son miembros de la familia de receptores de citoquinas de tipo II, en base a un dominio extracelular característico de 200 residuos.

[0004] Las actividades in vivo demostradas de las citoquinas y sus receptores ilustran el potencial clínico y la necesidad de otras citoquinas, receptores de citoquinas, agonistas de citoquinas y antagonistas de citoquinas.

[0005] DATABASE EMBL Acc. No. AI261248, 16 Noviembre 1998, proporciona el clon de ADNc de Homo sapiens qk39g09.x1 NCI_CGAP_Co8.

35

[0006] WO 98/37193 describe el receptor de citoquina Zcytor7.

[0007] WO99/07848 describe el receptor 11 de citoquina de mamífero.

[0008] WO98/49307 describe un receptor de tipo citoquina de mamífero.

[0009] Bresnihan, B., et al., Arthritis + Rheumatism, Vol.41, No.12, Diciembre 1998, páginas 2196-2204, describe el tratamiento de artritis reumatoide con antagonista de receptor de interleuquina-1 humano recombinante.

[0010] La presente invención proporciona la utilización de un polipéptido Zcytor14 soluble para la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación; donde dicho polipéptido soluble comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 70% idéntica a los residuos de aminoácidos 21-452 de SEC ID NO:2.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

50

[0011] La presente memoria proporciona un receptor nuevo, designado como "Zcytor14". La presente memoria también proporciona polipéptidos Zcytor14 y proteínas de fusión Zcytor14, así como moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos y proteínas, y métodos para utilizar estas moléculas de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos.

55

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Visión general

[0012] La SEC ID No. 1 proporciona una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica Zcytor14. EL polipéptido codificado presenta la siguiente secuencia de aminoácidos: MPVPWFLLSL ALGRSPVLS LERLVGPQDA THCSPGLSCR LWSDILCLP GDIVPAPGPV LAPTHLQTEL VLRCQKETDC DLCLRVAVHL AVHGHWEEPE DEEKFGGAAD SGVEEPRNAS LQAQVLSFQ AYPTARCILL EVQVPAALVQ FGQSVGSVVY DCFEAALGSE

VRIWSYTPQR YEKELNHTQQ LPALPWLNVN ADGDNVHLVL NVSEEQHFGL SLYWNQVQGP PKPRWHKNTL
 GPQITTLNHT DLVPCLCIQV WPLEPDSVRT NICPFREDPR AHQNLWQAAR LRLTLQSWL LDAPCSLPAE
 AALCWRAPGG DPCQPLVPL SWENVTVDKV LEFPLLKGHP NLCVQVNSSE KLQLQECLWA DSLGPKKDDV
 LLETRGPQD NRSLCALEPS GCTSLPSKAS TRAAARLGEYL LQDLQSGQCL QLWDDDLGAL WACPMDKYIH
 5 KRWALVWLAC LLFAAALSLI LLLKKDHAKA AARGRAALLL YSADDSGFER LVGALASALC QLPLRVAVDL
 WSRRELSAQQ PVAWFHAQRR QTLQEGGVV LLFSPGAVAL CSEWLQDGVS GPGAHGPHDA FRASLSCVLP
 DFLQGRAPGS YVGACFDRLL HPDAVPALFR TVPVFTLPSQ LPDFLQALQQ PRAPRSGRLQ ERAEQVSRAL
 QPALDSYFHP PGTPAPGRGV GPGAGPGAGD GT (SEC ID NO:2).

10 **[0013]** De este modo, el gen *Zcytor14* codifica un polipéptido de 692 aminoácidos. Las características de *Zcytor14* incluyen una posible secuencia señal (residuo de aminoácidos 1 a 20 de SEC ID NO:2), un dominio extracelular (residuos de aminoácidos 21 a 452 de SEC ID NO:2), un dominio transmembrana (residuos de aminoácidos 453 a 473 de SEC ID NO:2), y un dominio intracelular (que comprende los residuos de aminoácidos 474 a 677 de SEC ID NO:2).

15

[0014] Se identificó una variante de la proteína *Zcytor14*, designada como "*Zcytor14-1*", que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: EEPNASLQA QVLSFQAYP TARCVLLEVQ VPAALVQFGQ SVGSVYDCF
 EAALGSEVRI WSYTPRYEK ELNHTQQLPA LPWLNVNADG DNVHLVLNVN EEQHFGLSLY WNQVQGP
 RWHKNTLGPQ IITLHTDLV PCLCIQVWPL EPDSVRTNIC PFREDPRAHQ NLWQAARLRL LTLQSWLLDA
 20 PCSLPAAEAL CWRAPGGDPC QPLVPLSWE NVTVDVNSSE KLQLQECLWA DSLGPKKDDV LLETRGPQD
 NRSLCALEPS GCTSLPSKAS TRAAARLGEYL LQDLQSGQCL QLWDDDLGAL WACPMDKYIH KRWALVWLAC
 LLFAAALSLI LLLKKDHAKG WLRLLKQDVR SGAARGRAA LLLYSADDSG FERLVGALAS ALCQLPLRVA
 VDLWSRRELS AQGPVAFWAH QRRQTLQEGG VVLLFSPGA VALCSEWLQD GVS GPGAHGP HDAFRASLSC
 VLPDFLQGRA PGSYVGACFD RLLHPDAVPA LFRTVPVFTL PSQLPDFLGA LQQPRAPRSG RLQERAEQVS
 25 RALQPALDSY FHPPGTPAPG RGVGPGAGPG AGDGT (SEC ID NO:5). La SEC ID NO. 4 proporciona una
 secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica este polipéptido.

[0015] El análisis de secuencias reveló que *Zcytor14-1* es una forma truncada del polipéptido receptor. Es decir, *Zcytor14-1* carece de los residuos de aminoácidos 1-113 de SEC ID NO:2. La SEC ID NO: 10 presenta una
 30 secuencia de aminoácidos de un polipéptido *Zcytor14-1* que incluye la parte N-terminal de *Zcytor14*.

[0016] La comparación de las secuencias de aminoácidos de *Zcytor14* y *Zcytor14-1* también indicaban que los dos polipéptidos representan variantes de corte y empalme ("splice") alternado. La secuencia de aminoácidos de *Zcytor14* incluye un segmento de 17 aminoácidos (residuos de aminoácidos 339 a 355 de SEC ID NO:2), del que
 35 carece *Zcytor14-1*, mientras que *Zcytor14* carece, tras el aminoácido 479, de un segmento de 13 aminoácidos hallado en *Zcytor14-1* (residuos de aminoácidos 350 a 362 de SEC ID NO:5). La SEC ID No. 11 proporciona un polipéptido que contiene ambos segmentos de aminoácidos, mientras que la SEC ID No: 12 presenta la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que carece de ambos segmentos de 13 y 17 aminoácidos.

40 **[0017]** El gen de *Zcytor14* reside en el cromosoma 3p25 - 3p24. Tal como se describe a continuación, esta región está asociada con varios trastornos y enfermedades.

[0018] Un análisis Northern indica que existe una expresión importante del gen de *Zcytor14* en tejidos de tiroides, glándula adrenal, próstata, e hígado, y una menor expresión en tejidos de corazón, intestino delgado, estómago y
 45 tráquea. En cambio, no hubo expresión o muy escasa en cerebro, médula espinal, placenta, pulmón, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, testículos, ovario, colon, leucocitos de sangre periférica, médula espinal, nódulo linfático y médula ósea. Estas observaciones muestran que las secuencias de *Zcytor14* se pueden utilizar para diferenciar entre varios tejidos.

50 **[0019]** Tal como se describe a continuación, la presente memoria proporciona polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, o por lo menos un 90% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en: (a) residuos de aminoácidos 21 a 452 de SEC ID NO:2, (b) residuos de aminoácidos 21 a 435 de SEC ID NO: 10, (c) residuos de aminoácidos 21 a 677 de SEC ID NO:2, y (d) residuos de aminoácidos 1 a 692 de SEC ID NO:2, donde el polipéptido aislado se une
 55 específicamente con un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2, o la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10. Los polipéptidos ilustrativos incluyen un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, o SEC ID NO: 12.

60 **[0020]** La presente memoria también proporciona polipéptidos aislados que comprenden un dominio extracelular en los que el dominio extracelular comprende residuos de aminoácidos 21 a 452 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2 o residuos de aminoácidos 21 a 435 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:10. Dichos polipéptidos pueden comprender además un dominio transmembrana que reside en una posición carboxi terminal

relativa al dominio extracelular, en los que el dominio transmembrana comprende residuos de aminoácidos 453 a 473 de SEC ID NO:2. Estos polipéptidos pueden comprender también un dominio intracelular que reside en una posición carboxi terminal relativa al dominio transmembrana, en los que el dominio intracelular comprende residuos de aminoácidos 474 a 677 de SEC ID NO:2, o residuos de aminoácidos 457 a 673 de SEC ID NO: 10, y
 5 opcionalmente, una secuencia secretora señal que reside en una posición amino terminal relativa al dominio extracelular, en los que la secuencia señal secretora comprende residuos de aminoácidos 1 a 20 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2.

[0021] La presente memoria también incluye polipéptidos Zcytor 14 variantes, en los que la secuencia de
 10 aminoácidos del polipéptido variante comparte una identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2 seleccionada del grupo que consiste en por lo menos un 70% de identidad, por lo menos un 80% de identidad, por lo menos un 90% de identidad, por lo menos un 95% de identidad, o más de un 95% de identidad, y en los que cualquier diferencia entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido variante y la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:2 es debida a una o más sustituciones de aminoácidos conservativos.

15 [0022] La presente memoria proporciona además anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente con dichos polipéptidos. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos humanizados derivados de anticuerpos monoclonales murinos, y anticuerpos monoclonales humanos. Entre los fragmentos de anticuerpo de ejemplo se incluyen $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' ,
 20 Fab , Fv , $scFv$, y unidades de reconocimiento mínimo. La presente memoria proporciona además composiciones que comprenden un portador y un péptido, polipéptido, anticuerpo o anticuerpo anti-idiotipo descrito en la presente invención.

[0023] La presente memoria también proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido
 25 Zcytor14, en las que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en: (a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO:3, (b) una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos 21 a 677 de SEC ID NO:2 o los residuos de aminoácidos 21 a 673 de SEC ID NO: 10, y (c) una molécula de ácido nucleico que permanece
 30 hibridada después de condiciones de lavado astringentes a una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de nucleótidos 214 a 2184 de SEC ID NO: 1, o el complemento de los nucleótidos 214 a 2184 de SEC ID NO:1. Entre las moléculas de ácido nucleico de ejemplo se incluyen aquellas en las que cualquier diferencia entre la secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ácido nucleico (c) y la correspondiente secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2 es debido a la sustitución de aminoácidos conservativos. La presente memoria contempla además moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden nucleótidos 214 a 2184 de SEC
 35 ID NO:1 o nucleótidos 154 a 2184 de SEC ID NO: 1.

[0024] La presente memoria también incluye vectores y vectores de expresión que comprende dichas moléculas de
 40 ácido nucleico. Dichos vectores de expresión pueden comprender un promotor de la transcripción, y un terminador de la transcripción, donde el promotor está unido operativamente con la molécula de ácido nucleico y, donde la molécula de ácido nucleico está unida operativamente con el terminador de la transcripción. La presente memoria también incluye células huésped recombinantes y virus recombinantes que comprenden estos vectores y vectores de expresión. Entre las células huésped de ejemplo se incluyen células bacterianas, de levadura, fúngica, insecto, mamífero y planta. Las células huésped recombinantes que comprenden dichos vectores de expresión se pueden utilizar para producir los polipéptidos Zcytor14 mediante el cultivo de dichas células huésped recombinante que
 45 comprenden el vector de expresión y que producen la proteína Zcytor14 y, opcionalmente, aislar la proteína Zcytor14 de las células huésped recombinantes cultivadas.

[0025] Además, la presente memoria proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un portador
 50 farmacéuticamente aceptable y por lo menos uno de dicho vector de expresión o virus recombinante que comprende dichos vectores de expresión. La presente memoria incluye además composiciones farmacéuticas, que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y un polipéptido descrito en la presente invención.

[0026] La presente memoria también contempla métodos para detectar la presencia de ARN de Zcytor14 en una
 55 muestra biológica, que comprende las etapas de (a) poner en contacto un sonda de ácidos nucleicos de Zcytor14 bajo condiciones hibridantes con (i) moléculas de ARN de prueba aisladas de la muestra biológica, o (ii) moléculas de ácido nucleico sintetizadas de las moléculas de ARN aisladas, donde la sonda tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una parte de la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO:1, o su complemento, y (b) detectar la formación de híbridos de la sonda de ácido nucleico y las moléculas de ARN de prueba o las moléculas de ácido nucleico sintetizadas, donde la presencia de los híbridos indica la presencia de ARN de Zcytor14 en la
 60 muestra biológica.

[0027] La presente memoria proporciona además métodos para detectar la presencia de polipéptido Zcytor14 en una muestra biológica, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o un

fragmento de anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID No: 2, donde el contacto se realiza bajo condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la muestra biológica, y (b) detectar cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido.

5 Dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender además un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en radioisótopo, marcador fluorescente, marcador quimioluminiscente, marcador enzimático, marcador bioluminiscente, y oro coloidal.

10 **[0028]** La presente memoria también proporciona kits para realizar estos métodos de detección. Por ejemplo, un kit para la detección de la expresión del gen de *Zcytor 14* puede comprender un recipiente que comprende una molécula de ácido nucleico, donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos 214 a 2184 de SEC ID NO:1, (b) una molécula de ácido nucleico que comprende el complemento de nucleótidos 214 a 2184 de la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO:1, (c) una molécula de ácido nucleico que es un fragmento de (a) que consiste en por lo menos ocho nucleótidos, y (d) una molécula de ácido nucleico que es un fragmento de (b) que consiste en por lo menos ocho nucleótidos. Dicho kit también puede comprender un segundo recipiente que comprende uno o más reactivos capaces de indicar la presencia de la molécula de ácido nucleico. Por otro lado, un kit para detección de la proteína *Zcytor14* puede comprender un recipiente que comprende un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que se une específicamente con un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2.

20 **[0029]** La presente memoria también contempla anticuerpos anti-idiotipos o fragmentos de anticuerpos anti-idiotipos, que se unen específicamente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2 o SEC ID NO: 10.

25 **[0030]** La presente memoria también proporciona moléculas de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de secreción de *Zcytor14* y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido biológicamente activo, donde la secuencia señal de secreción de *Zcytor14* comprende una secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 20 de SEC ID NO: 2. Entre los polipéptidos biológicamente activos de ejemplo se incluyen Factor VIIa, proinsulina, insulina, hormona estimuladora de folículo, activador de plasminógeno de tipo tisular, factor de necrosis tumoral, interleuquina, factor estimulador de colonias, interferón, eritropoyetina, y trombopoyetina. Además, la presente memoria proporciona proteínas de fusión que comprenden una secuencia señal de secreción de *Zcytor14* y un polipéptido, donde la secuencia señal de secreción de *Zcytor14* comprende una secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 20 de SEC ID NO:2.

35 **[0031]** La presente memoria contempla además moléculas de ácido nucleico que codifican un dominio extracelular de *Zcytor14*, donde el dominio extracelular comprende los residuos de aminoácidos 21 a 452 de SEC ID NO:2, o los residuos de aminoácidos 21 a 435 de SEC ID NO: 10. La presente memoria también incluye polipéptidos aislados que consisten en los residuos de aminoácidos 21 a 452 de SEC ID NO:2, o los residuos de aminoácidos 21 a 435 de SEC ID NO: 10, anticuerpos que se unen específicamente a dichos polipéptidos, y anticuerpo anti-idiotipos que se unen específicamente con dichos anticuerpos.

40 **[0032]** La presente memoria también proporciona proteínas de fusión, que comprende un dominio extracelular de *Zcytor14* y un grupo de inmunoglobulina, donde el dominio extracelular de *Zcytor14* comprende los residuos de aminoácidos 21 a 452 de SEC ID NO:2, o los residuos de aminoácidos 21 a 435 de SEC ID NO:10. En dichas proteínas de fusión, el grupo de inmunoglobulina puede ser una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, tal como un fragmento de Fc humano. La presente memoria también incluye moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican dichas proteínas de fusión.

[0033] La presente invención será evidente tras la referencia a la siguiente descripción detallada.

50 2. Definiciones

[0034] En la siguiente descripción, se utilizan de manera amplia una serie de términos. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar el entendimiento de la invención.

55 **[0035]** Tal como se utiliza en la presente invención, "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fragmentos generados mediante cualquier acción de unión, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas de monómeros que son nucleótidos naturales (tales como ADN y ARN) o análogos de nucleótidos naturales (por ejemplo, formas α -enantioméricas de nucleótidos naturales), o una combinación de ambos. Las moléculas modificadas pueden presentar alteraciones en grupos azúcar y/o en grupos de base pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcares incluyen, por ejemplo, la sustitución de uno o más grupos

hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azida, o los azúcares se pueden funcionalizar como éteres o ésteres. Además, el grupo azúcar completo se puede sustituir por estructuras estéricamente y electrónicamente similares, tales como aza-azúcares y análogos de azúcares carbocíclicos. Ejemplos de modificaciones en un grupo base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos conocidos. Los monómeros de ácidos nucleicos se pueden unir mediante enlaces fosfodiéster o análogos de dichas uniones. Los análogos de uniones fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforanilidato, fosforamidato, y similares. El término "molécula de ácido nucleico" también incluye los denominados "ácidos nucleicos peptídicos", que comprenden bases de ácidos nucleicos naturales o modificados unidas a un esqueleto de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o cadena doble.

[0036] El término "complemento de una molécula de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria a 5' CCCGTGCAT 3'.

[0037] El término "contig" indica una molécula de ácido nucleico que tiene un tramo contiguo de secuencia idéntica o complementaria a otra molécula de ácido nucleico. Se dice que las secuencias contiguas se "solapan" con un tramo determinado de una molécula de ácido nucleico en su totalidad o a lo largo de un tramo parcial de la molécula de ácido nucleico.

[0038] El término "secuencia de nucleótidos degenerada" indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados en comparación con una molécula de ácido nucleico de referencia que codifica un polipéptido. Los codones degenerados contienen tripletes diferentes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo de aminoácido (es decir, los tripletes GAU y GAC codifican cada uno Asp).

[0039] El término "gen estructural" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se transcribe en ARN mensajero (ARNm), que a continuación se traduce en una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

[0040] Una "molécula de ácido nucleico aislada" es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que se ha separado de ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que se ha aislado de una especie particular es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de esa especie.

[0041] Una "construcción de molécula de ácido nucleico" es una molécula de ácido nucleico, de cadena sencilla o cadena doble, que se ha modificado a través de la intervención humana para contener segmentos de ácidos nucleico combinados y yuxtapuestos en una disposición que no existe en la naturaleza.

[0042] "ADN lineal" indica moléculas de ADN no circulares que tiene extremos 5' y 3' libres. El ADN lineal se puede preparar a partir de moléculas de ADN circular cerradas, tales como plásmidos, mediante digestión enzimática o alteración física.

[0043] "ADN complementario (ADNc)" es una molécula de ADN de cadena sencilla que se forma a partir de una plantilla de ARNm por la enzima transcriptasa inversa. Habitualmente, se utiliza un cebador complementario a partes de ARNm para el inicio de la transcripción inversa. Los expertos en la materia también utilizan el término "ADNc" para referirse a una molécula de ADN de doble cadena que consiste en dicha molécula de ADN de cadena sencilla y su cadena de ADN complementaria. El término "ADNc" también se refiere a un clon de una molécula de ADNc sintetizada a partir de una plantilla de ARN.

[0044] Un "promotor" es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Habitualmente, un promotor se localiza en la región no codificante 5' de un gen, proximal al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de la secuencia en promotores que actúan en el inicio de la transcripción se caracterizan a menudo por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos promotores incluyen sitios de unión a ARN polimerasa, secuencias TAT, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSEs; McGehee et al., Mol. Endocrinol. 7:551 (1993)), elementos de respuesta de AMP cíclico (CREs), elementos de respuesta a suero (SREs; Treisman, Seminars in Cancer Biol. 1:47 (1990)), elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs), y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF (O'Reilly et al., J. Biol. Chem. 267: 19938 (1992)), AP2 (Ye et al., J. Biol. Chem. 269:25728 (1994)), SP1, proteína de unión a elemento de respuesta de AMPc (CREB; Loeken, Gene Expr. 3:253 (1993)) y factores octámeros (véase, en general, Watson et al., eds., Molecular Biology of the Gene, 4th ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), y Lemaigre and Rousseau, Biochem. J. 303:1 (1994)). Si un promotor es un promotor inducible, entonces

la velocidad de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. En cambio, la velocidad de transcripción no está regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. Los promotores represivos también son conocidos.

5 **[0045]** Un "promotor central" contiene secuencias de nucleótidos esenciales para la función de promotor, incluyendo la caja TATA y el inicio de la transcripción. Por esta definición, un promotor central puede tener o no una actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden aumentar la actividad o conferir actividad específica de tejido.

10 **[0046]** Un "elemento regulador" es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor central. Por ejemplo, un elemento regular puede contener una secuencia de nucleótidos que se une con factores celulares que permiten la transcripción exclusivamente o preferencialmente en células, tejidos u orgánulos particulares. Estos tipos de elementos reguladores se asocian normalmente con genes que se expresan de una manera "específica de célula", "específica de tejido" o "específica de orgánulo". Por ejemplo, un promotor de Acytor14 debe estimular la

15 expresión de un gen unido operativamente en un grado mayor en tejidos de tiroides, glándula adrenal, próstata y tejido hepático, en oposición a tejidos de riñón, páncreas o bazo.

[0047] Un "potenciador" es un tipo de elemento regulador que puede incrementar la eficacia de la transcripción, independientemente de la distancia u orientación del potenciador en relación al sitio de inicio de la transcripción.

20

[0048] "ADN heterólogo" se refiere a una molécula de ADN, o una población de moléculas de ADN, que no existen de forma natural en una célula huésped determinada. Las moléculas de ADN heterólogas para una célula huésped particular pueden contener ADN derivado de la especie de célula huésped (es decir, ADN endógeno), siempre que el ADN huésped se combine con ADN no huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que

25 contiene un segmento de ADN no huésped que codifica un polipéptido unido operativamente a un segmento de ADN huésped que comprende un promotor de la transcripción se considera que es una molécula de ADN heterólogo. En cambio, una molécula de ADN heteróloga puede comprender un gen endógeno unido operativamente con un promotor exógeno. Como otro ejemplo, una molécula de ADN que comprende un gen derivado de una célula de tipo salvaje se considera que es un ADN heterólogo si esa molécula de ADN se introduce en una célula mutante que

30 carece del gen de tipo salvaje.

[0049] Un "polipéptido" es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sea producido naturalmente o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos se refieren normalmente como "péptidos"

35

[0050] una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. La célula en la que se produce la proteína puede añadir sustituyentes carbohidrato u otros sustituyentes no peptídicos a una proteína y variará con el tipo de células. Las proteínas se definen en la presente invención en términos de sus estructuras en el

40 esqueleto de aminoácidos; los sustituyentes, tales como grupos carbohidrato, en general, no se especifican, pero no obstante pueden estar presentes.

[0051] Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN no huésped es un péptido o polipéptido "heterólogo".

45

[0052] Un "elemento genético integrado" es un segmento de ADN que se ha incorporado en un cromosoma de una célula huésped después de introducir ese elemento en la célula a través de manipulación humana. En la presente invención, los elementos genéticos integrados derivan habitualmente de plásmidos linealizados que se introducen en las células mediante electroporación u otras técnicas. Los elementos genéticos integrados pasan de la célula

50 huésped original a su progenie.

[0053] Un "vector de clonación" es una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, cósmico, o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse autónomamente en una célula huésped. Los vectores de clonación contienen habitualmente uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que permiten

55 la inserción de una molécula de ácido nucleico de una manera determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para el uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Entre los genes marcadores se incluyen habitualmente genes que proporcionan resistencia a tetraciclina o resistencia a ampicilina.

60 **[0054]** Un "vector de expresión" es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula huésped. Habitualmente, un vector de expresión comprende un promotor de la transcripción, un gen, y un terminador de la transcripción. La expresión génica se sitúa normalmente bajo el control de un promotor, y se dice que dicho gen está "unido operativamente" al promotor. De manera similar, un elemento regulador y un promotor

central se unen operativamente si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

5 **[0055]** Un "huésped recombinante" es una célula que contiene una molécula de ácido nucleico heteróloga, tal como un vector de clonación o un vector de expresión. En el presente contexto, un ejemplo de un huésped recombinante es una célula que produce Zcytor14 a partir de un vector de expresión. En cambio, Zcytor14 se puede producir mediante una célula que es una "fuente natural" de Zcytor14, y que carece de un vector de expresión.

10 **[0056]** "Transformantes integradores" son células huésped recombinantes en las que el ADN heterólogo se ha integrado en el ADN genómico de las células.

15 **[0057]** Una "proteína de fusión" es una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos de como mínimo dos genes. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender como mínimo parte de un polipéptido Zcytor14 fusionado con un polipéptido que se une a una matriz de afinidad. Dicha proteína de fusión proporciona un medio para aislar grandes cantidades de Zcytor14 utilizando cromatografía de afinidad.

20 **[0058]** El término "receptor" indica una proteína asociada a célula que se une a una molécula bioactiva denominada un "ligando". Esta interacción media el efecto del ligando en la célula. Los receptores pueden estar unidos a membrana, citosólicos o nucleares; monoméricos (por ejemplo, receptor de la hormona estimuladora de tiroideas, receptor beta-adrenérgico) o multiméricos (por ejemplo, receptor de PDGF, receptor de la hormona de crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6). Los receptores unidos a membrana se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio efector intracelular que están implicados habitualmente en la transducción de señales. En ciertos receptores unidos a membrana, el dominio de unión a ligando extracelular y el dominio efector intracelular se localizan en polipéptidos separados que comprenden el receptor funcional completo.

30 **[0059]** En general, la unión de ligando a receptor da lugar a un cambio conformacional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y otra u otras moléculas en la célula, que, a su vez, conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los sucesos metabólicos que están unidos a menudo a interacciones receptor-ligando incluyen la transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP cíclica, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de inositol lípidos e hidrólisis de fosfolípidos.

35 **[0060]** El término "secuencia señal secretora" indica una secuencia de ADN que codifica un péptido (un "péptido secretor") que, como componente de un polipéptido más grande, dirige el polipéptido más grande a través de un mecanismo secretor de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido más grande se separa habitualmente para extraer el péptido secretor durante el tránsito a través del mecanismo secretor.

40 **[0061]** Un "polipéptido aislado" es un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidrato, lípido u otras impurezas proteináceas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Habitualmente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, como mínimo aproximadamente un 80% puro, como mínimo aproximadamente un 90% puro, como mínimo aproximadamente un 95% puro, más de un 95% puro, o más de un 99% puro. Una manera de mostrar que una preparación de proteína particular contiene un polipéptido aislado es mediante la aparición de una única banda después de la electroforesis en gel con dodecil sulfato sódico (SDS)-poliacrilamida de la preparación de proteína y tinción del gel con Azul Coomassie Brillante. Sin embargo, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas glicosiladas de manera alternativa o derivadas.

50 **[0062]** Los términos "amino-terminal" y "carboxil-terminal" se utilizan en la presente invención para indicar posiciones en polipéptidos. Cuando el contexto lo permita, estos términos se utilizan con referencia a una secuencia particular o una parte de un polipéptido para indicar proximidad o una posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia situada carboxi-terminal a una secuencia de referencia en un polipéptido se localiza proximal al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

55 **[0063]** El término "expresión" se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en ARNm y la traducción de ARNm en uno o más polipéptidos.

60 **[0064]** El término "variante por corte y empalme ("splice")" se utiliza en la presente invención para indicar formas alternativas de ARN transcrito de un gen. La variación por corte y empalme surge de forma natural mediante el uso de sitios de corte y empalme alternativos en una molécula de ADN transcrita o menos habitualmente entre moléculas de ARN transcritas por separado y puede dar lugar a varios ARN transcritos a partir del mismo gen. Las variantes

por corte y empalme pueden codificar polipéptidos que presentan una secuencia de aminoácidos alterada. El término variante por corte y empalme también se utiliza en la presente invención para indicar un polipéptido codificado por una variante por corte y empalme de un ARNm transcrito a partir de un gen.

5 [0065] Tal como se utiliza en la presente invención, el término "inmunomodulador" incluye citoquinas, factores de crecimiento de células madre, linfotoxinas, moléculas coestimuladoras, factores hematopoyéticos, y análogos sintéticos de estas moléculas.

10 [0066] El término "pareja complemento/anticomplemento" indica grupos no idénticos que forman una pareja estable, no covalentemente asociada bajo condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de una pareja de complemento/anticomplemento. Otras parejas complemento/anticomplemento de ejemplo incluyen parejas receptor/ligando, parejas anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), parejas de polinucleótidos de sentido/antisentido, y similares. Cuando es deseable una posterior disociación de la pareja complemento/anticomplemento, la pareja complemento/anticomplemento presenta
15 preferiblemente una afinidad de unión inferior a 10^9 M^{-1} .

20 [0067] Un "anticuerpo anti-idiotipo" es un anticuerpo que se une con el dominio de una región variable de una inmunoglobulina. En el presente contexto, un anticuerpo anti-idiotipo se une con la región variable de un anticuerpo anti-Zcytor14 y, de este modo, un anticuerpo anti-idiotipo mimetiza un epítipo de Zcytor14.

25 [0068] Un "fragmento de anticuerpo" es una parte de un anticuerpo, tal como $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-Zcytor14 se une con un epítipo de Zcytor14.

30 [0069] El término "fragmento de anticuerpo" también incluye un polipéptido sintético o modificado genéticamente que se une a un antígeno específico, tal como polipéptidos que consisten en una región variable de cadena ligera, fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas de polipéptidos de cadena sencilla recombinante en las que las regiones variables de cadena ligera y pesada están conectadas por un péptido enlazador ("proteínas scFv") y unidades mínimas de reconocimiento que consisten en residuos de aminoácidos que mimetizan la región hipervariable.

35 [0070] Un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y regiones determinante de complementariedad derivadas de un anticuerpo de roedor, mientras que el resto de la molécula de anticuerpo deriva de un anticuerpo humano.

40 [0071] "Anticuerpos humanizados" son proteínas recombinantes en las que las regiones determinantes de complementariedad murinas de un anticuerpo monoclonal se han transferido de cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina murina a un dominio variable humano.

45 [0072] Tal como se utiliza en la presente invención, un "agente terapéutico" es una molécula o átomo, que está conjugado a un grupo anticuerpo para producir un conjugado que es útil para terapia. Entre los ejemplos de agentes terapéuticos se incluyen fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes y radioisótopos.

[0073] Un "marcador detectable" es una molécula o átomo, que puede estar conjugado a un grupo anticuerpo para producir una molécula útil para el diagnóstico. Entre los ejemplos de marcadores detectables se incluyen quelantes, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos, u otros grupos marcadores.

50 [0074] El término "etiqueta de afinidad" se utiliza en la presente invención para indicar un segmento de polipéptido que se puede unir a un segundo polipéptido para proporcionar la purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para la unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, cualquier péptido o proteína para los que está disponible un anticuerpo u otros agentes de unión específica se puede utilizar como etiqueta de afinidad. Las etiquetas de afinidad incluyen un tracto de polihistidina, la proteína A (Nilsson et al., EMBO J. 4: 1075
55 (1985); Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3 (1991)), glutatión S transferasa (Smith and Johnson, Gene 67: 31 (1988)), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp et al., Biotechnology 6:1204 (1988)), péptido de unión a estreptavidina, u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95 (1991). Las moléculas de ADN que codifican etiquetas de unión se pueden obtener de proveedores comerciales (por ejemplo,
60 Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

[0075] Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo entero, en contraposición a un fragmento de anticuerpo, que no está conjugado con un agente terapéutico. Los anticuerpos desnudos incluyen los anticuerpos policlonales y

monoclonales, así como determinados anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados.

5 [0076] Tal como se utiliza en la presente invención, el término "componente de anticuerpo" incluye tanto un anticuerpo entero como un fragmento de anticuerpo.

[0077] Un "inmunoconjugado" es un conjugado de un componente de anticuerpo con un agente terapéutico o un marcador detectable.

10 [0078] Tal como se utiliza en la presente invención, el término "proteína de fusión a anticuerpo" hace referencia a una molécula recombinante que comprende un componente de anticuerpo y un componente de polipéptido del Zcytor14. Los ejemplos de una proteína de fusión a anticuerpo incluyen una proteína que comprende un dominio extracelular del Zcytor14 y un dominio Fc, o bien una región de unión a antígeno.

15 [0079] Un "polipéptido diana" o un "péptido diana" es una secuencia de aminoácidos que comprende, como mínimo, un epítipo y que está expresada en una célula diana, tal como una célula tumoral, o una célula que porta un antígeno de un agente infeccioso. Las células T reconocen epítipos peptídicos presentados por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad a un polipéptido diana o a un péptido diana y, habitualmente, lisan la célula diana o reclutan otras células inmunes para que se dirijan al sitio de la célula diana, matando de este modo la célula
20 diana.

[0080] Un "péptido antigénico" es un péptido que se unirá a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad para formar un complejo MHC-péptido, que es reconocido por una célula T y, de este modo, inducirá una respuesta de linfocitos citotóxicos tras la presentación a la célula T. De este modo, los péptidos antigénicos son capaces de
25 unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad adecuada e inducir una respuesta de células T citotóxicas, tales como, lisis celular o liberación de citoquinas específicas contra la célula diana, que se une al antígeno o lo expresa. El péptido antigénico puede unirse en el contexto de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o clase II, en una célula presentadora de antígeno o en una célula diana.

30 [0081] En los eucariotas, la ARN polimerasa II cataliza la transcripción de un gen estructural para producir ARNm. Se puede diseñar una molécula de ácido nucleico para contener una plantilla de ARN polimerasa II en la cual el transcrito de ARN tiene una secuencia que es complementaria a la de un ARNm específico. El transcrito de ARN se denomina "ARN no codificante" y una molécula de ácido nucleico que codifica el ARN no codificante se denomina "gen no codificante". Las moléculas de ARN no codificante son capaces de unirse a las moléculas de ARNm, dando
35 lugar a una inhibición de la traducción del ARNm.

[0082] Un "oligonucleótido no codificante específico para el Zcytor14" o un "oligonucleótido no codificante del Zcytor14" es un oligonucleótido que tiene una secuencia (a) capaz de formar una cadena triple estable con una parte del gen *Zcytor14* o (b) capaz de formar una cadena doble estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen
40 *Zcytor14*.

[0083] Una "ribozima" es una molécula de ácido nucleico que contiene un centro catalítico. El término incluye enzimas del ARN, ARN autoempalmantes ("selfsplicing"), los ARN autoseparables y las moléculas de ácido nucleico que realizan estas funciones catalíticas. Una molécula de ácido nucleico que codifica una ribozima se denomina
45 "gen de ribozima".

[0084] Una "secuencia guía externa" es una molécula de ácido nucleico que dirige a la ribozima endógena, ARNasa P, a una especie particular de ARNm intracelular, dando lugar a la separación del ARNm por la ARNasa P. Una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia guía externa se denomina un "gen de secuencia guía
50 externa".

[0085] El término "variante del gen *Zcytor14*" se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una modificación de la SEC. ID. N.º 2. Dichas variantes incluyen polimorfismos naturales de los genes *Zcytor14*, así como los genes sintéticos que contienen sustituciones conservadoras de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2. Las formas variantes
55 adicionales de los genes *Zcytor14* son moléculas de ácido nucleico que contienen inserciones o eliminaciones de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente invención. Una variante del gen *Zcytor14* puede identificarse, por ejemplo, determinando si el gen se hibrida con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1, o su complemento, en condiciones rigurosas.

60 [0086] Como alternativa, las variantes de los genes *Zcytor14* pueden identificarse por comparación de las secuencias. Dos secuencias de aminoácidos tienen un "100% de identidad en las secuencias de aminoácidos" si los residuos de aminoácidos de las dos secuencias de aminoácidos son iguales cuando se las alinea para obtener la

máxima correspondencia. De forma similar, dos secuencias de nucleótidos tienen un “100% de identidad de las secuencias de nucleótidos” si los residuos de nucleótidos de las dos secuencias de nucleótidos son iguales cuando se las alinea para obtener la máxima correspondencia. Las comparaciones de secuencias pueden realizarse utilizando programas informáticos estándar tales como los incluidos en el juego de programas de bioinformática para ordenador LASERGENE, producido por DNASTAR (Madison, Wisconsin). Otros métodos para comparar dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos determinando el alineamiento óptimo son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Peruski y Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997), Wu et al. (eds.), “Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins”, en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 123-151 (CRC Press, Inc. 1997) y Bishop (ed.), *Guide to Human Genome Computing*, 2a Edición (Academic Press, Inc. 1998)). A continuación se describen métodos particulares para determinar la identidad de las secuencias.

[0087] Independientemente del método en particular utilizado para identificar una variante del gen *Zcytor14* o una variante del polipéptido *Zcytor14*, puede caracterizarse funcionalmente una variante de un gen o polipéptido codificado por una variante de un gen por la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo contra el *Zcytor14*.

[0088] El término “variante alélica” se utiliza en la presente invención para indicar cualesquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de manera natural a través de la mutación y puede dar lugar a un polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con una secuencia de aminoácidos alterada. El término variante alélica también se usa en la presente invención para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

[0089] El término “ortólogo” indica un polipéptido o una proteína obtenidos de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o una proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencias entre los ortólogos son el resultado de la especiación.

[0090] Los “parálogos” son proteínas diferentes pero estructuralmente relacionadas producidas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen por duplicación génica. Por ejemplo, la α -globina, la β -globina y la mioglobina son parálogos entre sí.

[0091] La presente memoria incluye fragmentos funcionales de los genes *Zcytor14*. Dentro del contexto de esta memoria, un “fragmento funcional” de un gen *Zcytor14* se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una parte de un polipéptido *Zcytor14*, que es un dominio que se describe en la presente invención o, como mínimo, se une específicamente con un anticuerpo contra el *Zcytor14*.

[0092] Debido a la imprecisión de los métodos analíticos estándar, se entiende que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros son valores aproximados. Cuando uno de dichos valores se expresa como “aproximadamente” X o “aproximadamente” X, se entenderá que el valor X expresado tiene una exactitud de $\pm 10\%$.

3. Producción de genes *Zcytor14*

[0093] Las moléculas de ácido nucleico que codifican un gen *Zcytor14* humano pueden obtenerse cribando una genoteca de ADNc o biblioteca genómica humana con sondas de polinucleótidos basadas en las SEC. ID. N.º 1 o SEC. ID. N.º 4. Estas técnicas son estándar y están bien establecidas.

[0094] A modo de ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un gen *Zcytor14* humano puede aislarse de una genoteca de ADNc. En este caso, la primera etapa sería preparar la genoteca de ADNc aislando ARN de un tejido, tal como tejido de la tiroides, la glándula suprarrenal, la próstata o el hígado con métodos bien conocidos por los expertos en la materia. En general, las técnicas de aislamiento del ARN deben proporcionar un método para romper las células, un medio para inhibir la degradación del ARN dirigida por la ARNasa y un método para separar el ARN de los contaminantes de ADN, proteínas y polisacáridos. Por ejemplo, el ARN total puede aislarse congelando el tejido en nitrógeno líquido, moliendo el tejido congelado con un mortero para lisar las células, extrayendo el tejido molido con una solución de fenol/cloroformo para extraer las proteínas y separando el ARN de las impurezas restantes mediante precipitación selectiva con cloruro de litio (véanse, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª edición, páginas 4-1 a 4-6 (John Wiley & Sons 1995) [“Ausubel (1995)”]; Wu et al., *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 33-41 (CRC Press, Inc. 1997) [“Wu (1997)”]).

[0095] Como alternativa, el ARN total puede aislarse extrayendo el tejido molido con isotiocianato de guanidinio, extrayéndolo con disolventes orgánicos y separando el ARN de los contaminantes mediante centrifugación diferencial (véanse, por ejemplo, Chirgwin et al., *Biochemistry* 18:52 (1979); Ausubel (1995) en las páginas 4-1 a 4-

6;Wu (1997) en las páginas 33-41).

5 **[0096]** Con el fin de construir una genoteca de ADNc, el ARN poli(A)+ debe aislarse de una preparación de ARN total. El ARN poli(A)+ puede aislarse del ARN total mediante la técnica estándar de cromatografía con oligo(dT)-celulosa (véanse, por ejemplo, Aviv y Leder, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:1408 (1972); Ausubel (1995) en las páginas 4-11 a 4-12).

10 **[0097]** Las moléculas de ADNc de doble cadena se sintetizan a partir del ARN poli(A)+ mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Wu (1997) en las páginas 41-46). Además, se pueden utilizar kits disponibles comercialmente para sintetizar moléculas de ADNc de doble cadena. Por ejemplo, dichos kits pueden obtenerse de Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Promega Corporation (Madison, WI) y STRATAGENE (La Jolla, CA).

15 **[0098]** Diversos vectores de clonación resultan adecuados para la construcción de una genoteca de ADNc. Por ejemplo, una genoteca de ADNc puede prepararse en un vector derivado de un bacteriófago, tal como el vector γ gt10. Véanse, por ejemplo, Huynh et al., "Constructing and Screening cDNA Libraries in γ gt10 and γ gt11", en DNA Cloning: A Practical Approach vol. I, Glover (ed.), pág. 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) en las páginas 47-52.

20 **[0099]** Como alternativa, las moléculas de ADNc de doble cadena se pueden insertar en un vector plasmídico, tal como un vector PBLUESCRIPT (STRATAGENE; La Jolla, CA), un vector LAMDAGEM-4 (Promega Corp.) u otros vectores disponibles comercialmente. También pueden obtenerse vectores de clonación adecuados de la American Type Culture Collection, (Manassas, VA).

25 **[0100]** Para amplificar las moléculas de ADNc clonado, la genoteca de ADNc se inserta en un huésped procariota empleando las técnicas estándar. Por ejemplo, puede introducirse una genoteca de ADNc en células de E. coli DH5 competentes que pueden obtenerse, por ejemplo, de Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD).

30 **[0101]** Se puede preparar una genoteca genómica humana por medios bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) en las páginas 307-327). El ADN genómico puede aislarse lisando el tejido con el detergente Sarkosyl, digiriendo el lisado con la proteinasa K, eliminando los restos insolubles del lisado por centrifugación, precipitando el ácido nucleico del lisado con isopropanol y purificando el ADN resuspendido en un gradiente de densidad de cloruro de cesio.

35 **[0102]** Los fragmentos de ADN que son adecuados para la producción de una genoteca genómica pueden obtenerse mediante la fragmentación aleatoria de ADN genómico o mediante la digestión parcial de ADN genómico con endonucleasas de restricción. Los fragmentos de ADN genómico pueden insertarse en un vector, tal como, un vector bacteriófago o cósmido, de acuerdo con las técnicas convencionales, tales como el uso de digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos terminales adecuados, el uso de tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable de moléculas de ADN y la unión con ligasas adecuadas. Las técnicas de dicha manipulación son bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) en las páginas 307-327).

45 **[0103]** Como alternativa, las genotecas genómicas humanas pueden obtenerse de fuentes comerciales, tales como, Research Genetics (Huntsville, AL) y la American Type Culture Collection (Manassas, VA).

[0104] Una genoteca que contiene clones de ADNc o genómicos puede cribarse con una o más sondas de polinucleótidos basadas en las SEC. ID. N.º 1 o SEC. ID. N.º 4, utilizando métodos estándar (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 6-1 a 6-11).

50 **[0105]** Las moléculas de ácido nucleico que codifican un gen *Zcytor14* humano también pueden obtenerse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores oligonucleótidos que tienen secuencias de nucleótidos basadas en las secuencias de nucleótidos del gen *Zcytor14*, tal como se describe en la presente invención. Los métodos generales para cribar las genotecas con PCR son proporcionados, por ejemplo, por Yu et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries", en Methods in Molecular Biology, vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 211-215 (Humana Press, Inc. 1993). Además, las técnicas para usar la PCR para aislar genes relacionados han sido descritas, por ejemplo, por Preston, "Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members", en Methods in Molecular Biology, vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 317-337 (Humana Press, Inc. 1993).

60 **[0106]** Los anticuerpos contra el *Zcytor14* producidos según se describe a continuación, también pueden usarse para aislar secuencias de ADN que codifican genes *Zcytor14* humanos de genotecas de ADNc. Por ejemplo, pueden

utilizarse los anticuerpos para cribar genotecas de expresión del γ gt11 o pueden utilizarse los anticuerpos para realizar un inmunocribado posterior a la selección y traducción de los híbridos (véanse, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 6-12 a 6-16; Margolis et al., "Screening γ expression libraries with antibody and protein probes", en DNA Cloning 2: Expression Systems, 2.a Edición, Glover et al. (eds.), páginas 1-14 (Oxford University Press 1995)).

5

[0107] Como alternativa, un gen *Zcytor14* puede obtenerse sintetizando moléculas de ácido nucleico con oligonucleótidos largos mutuamente cebantes y las secuencias de nucleótidos descritas en la presente invención (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 8-8 a 8-9). Las técnicas establecidas que usan la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad de sintetizar moléculas de ADN de una longitud de, como

10

mínimo, dos kilobases (Adang et al., Plant Molec. Biol. 21:1131 (1993), Bambot et al., PCR Methods and Applications 2:266 (1993), Dillon et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes", en Methods in Molecular Biology, vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc. 1993) y Holowachuk et al., PCR Methods Appl. 4:299 (1995)).

15

[0108] Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente invención también pueden sintetizarse con "máquinas genéticas", utilizando protocolos tales como el método de la fósforamidita. Si se requiere ADN de doble cadena sintetizado químicamente para una aplicación tal como la síntesis de un gen o de un fragmento génico, entonces cada cadena complementaria se fabrica por separado. La producción de genes cortos (de 60 a 80 pares de bases) es técnicamente sencilla y se puede lograr sintetizando las cadenas complementarias y luego apareándolas. Sin embargo, para la producción de genes más largos (>300 pares de bases), es posible que se requieran estrategias especiales porque la eficiencia de acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis química de ADN rara vez del 100%. Para superar este problema, los genes sintéticos (doble cadena) se ensamblan en forma modular a partir de fragmentos de cadena sencilla que tienen una longitud de entre 20 y 100 nucleótidos. Para consultar las revisiones sobre la síntesis de polinucleótidos, véanse, por ejemplo, Glick y Pasternak, Molecular

20

25

Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press 1994), Itakura et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323 (1984) y Climie et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:633 (1990).

[0109] La secuencia de un ADNc del *Zcytor14* o un fragmento genómico del *Zcytor14* puede determinarse mediante métodos estándar. Las secuencias de polinucleótidos del *Zcytor14* divulgadas en la presente invención también

30

pueden usarse como sondas o cebadores para clonar regiones 5' no codificantes de un gen *Zcytor14*. Los elementos promotores de un gen *Zcytor14* pueden usarse para dirigir la expresión de genes heterólogos en, por ejemplo, el tejido tiroideo de animales transgénicos o de pacientes tratados con terapia génica. La identificación de los fragmentos genómicos que contienen un elemento promotor o regulador del *Zcytor14* puede lograrse mediante técnicas bien establecidas, tales como el análisis de las eliminaciones (véase, en general, Ausubel (1995)).

35

[0110] La clonación de las secuencias que flanquean a 5' también facilita la producción de las proteínas del *Zcytor14* por "activación génica", según se divulga en la patente de los EE. UU. N.º 5.641.670. En resumen, la expresión de un gen *Zcytor14* endógeno en una célula se altera introduciendo en el locus del *Zcytor14* una construcción de ADN que comprende, como mínimo, una secuencia de reconocimiento, una secuencia reguladora, un exón y un sitio donante de empalme no apareado. La secuencia de reconocimiento es una secuencia 5' no codificante del *Zcytor14* que permite la recombinación homóloga de la construcción con el locus endógeno del *Zcytor14*, por la cual las secuencias dentro de la construcción se ligan operativamente a la secuencia codificante endógena del *Zcytor14*. De esta manera, un promotor endógeno del *Zcytor14* puede reemplazarse o suplementarse con otras secuencias reguladoras para proporcionar una expresión potenciada, específica para un tejido o, en cualquier caso, regulada.

40

45

4. Producción de variantes del gen *Zcytor14*

[0111] La presente memoria proporciona una variedad de moléculas de ácido nucleico, incluidas moléculas de ADN y ARN, que codifican los polipéptidos del *Zcytor14* dados a conocer en la presente invención. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que, en vista de la degeneración del código genético, es posible que exista una variación considerable en las secuencias entre estas moléculas de polinucleótidos. La SEC. ID. N.º 3 es una secuencia de nucleótidos degenerada que abarca a todas las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido del *Zcytor14* de la SEC. ID. N.º 2. Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia degenerada de la SEC. ID. N.º 3 también proporciona todas las secuencias de ARN que codifican la SEC. ID. N.º 2, sustituyendo

50

55

T por U. Por lo tanto, la presente invención contempla moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de *Zcytor14* que comprenden los nucleótidos 154 a 2229 de la SEC. ID. N.º 1 y sus equivalentes de ARN. De manera similar, la secuencia degenerada del *Zcytor14-1* de la SEC. ID. N.º 6 también proporciona todas las secuencias de ARN que codifican la SEC. ID. N.º 5, sustituyendo T por U.

60

[0112] La Tabla 1 presenta los códigos de una sola letra utilizados dentro de las SEC. ID. N.º 3 y 6 para indicar posiciones de nucleótidos degenerados. Las "resoluciones" son nucleótidos indicados con una letra del código. El "complemento" indica el código del nucleótido o nucleótidos complementarios. Por ejemplo, el código Y indica C o T

y su complemento R indica A o G, siendo A complementario de T y siendo G complementario de C.

Tabla 1

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

5

[0113] Los codones degenerados utilizados en las SEC ID NOs:3 y 6, que comprenden todos los posibles codones para un aminoácido determinado, se indican en la Tabla 2.

Tabla 2

10

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

[0114] Un experto en la materia apreciará que se introduce cierta ambigüedad al determinar un codón degenerado, representativo de todos los codones posibles que codifican un aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para serina (WSN) puede, en ciertas circunstancias, codificar arginina (AGR) y el codón degenerado para arginina (MGN) puede, en ciertas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre los codones que codifican fenilalanina y leucina. De este modo, algunos polinucleótidos comprendidos por la secuencia degenerada pueden codificar variantes de secuencias de aminoácidos, pero un experto en la materia puede identificar fácilmente dichas variantes de secuencias por referencia a las secuencias de aminoácidos de las SEC. ID. N.º 2, 5 y 10 a 12. La

funcionalidad de las variantes de las secuencias se puede probar fácilmente según se describe en la presente invención.

[0115] Diferentes especies pueden mostrar el "uso de codones preferenciales". En general, véanse Grantham et al., Nucl. Acids Res. 8:1893 (1980), Haas et al. Curr. Biol. 6:315 (1996), Wain-Hobson et al., Gene 13:355 (1981), Grosjean y Fiers, Gene 18:199 (1982), Holm, Nuc. Acids Res. 14:3075 (1986), Ikemura, J. Mol. Biol. 158:573 (1982), Sharp y Matassi, Curr. Opin. Genet. Dev. 4:851 (1994), Kane, Curr. Opin. Biotechnol. 6:494 (1995) y Makrides, Microbiol. Rev. 60:512 (1996). Tal como se los usa en la presente invención, los términos "uso de codones preferenciales" o "codones preferenciales" son un término de la técnica que hace referencia a codones de traducción de proteínas que se utilizan más frecuentemente en las células de una especie determinada, favoreciendo de ese modo a uno o a unos pocos representantes de los posibles codones que codifican cada aminoácido (véase la Tabla 2). Por ejemplo, el aminoácido treonina (Thr) puede ser codificado por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en las células de los mamíferos, ACC es el codón usado más habitualmente; en otras especies, por ejemplo, células de insectos, levaduras, virus o bacterias, pueden ser preferibles otros codones de Thr distintos. Los codones preferenciales para una especie en particular pueden introducirse en los polinucleótidos mediante una serie de métodos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codones preferenciales en el ADN recombinante puede, por ejemplo, aumentar la producción de la proteína haciendo que la traducción de la proteína sea más eficiente dentro de un tipo o especie celular en particular. Por lo tanto, las secuencias de codones degenerados dadas a conocer en la presente sirven como plantilla para optimizar la expresión de polinucleótidos en diversos tipos y especies celulares que se usan habitualmente en la técnica y se describen en la presente invención. Las secuencias que contienen codones preferenciales pueden probarse y optimizarse para su expresión en diversas especies y su funcionalidad puede probarse según se describe en la presente invención.

[0116] La presente invención además proporciona variantes de polipéptidos y moléculas de ácido nucleico que representan homólogos de otras especies (ortólogos). Estas especies incluyen, pero sin limitación, especies de mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y otras especies de vertebrados e invertebrados. De particular interés resultan los polipéptidos Zcytor14 de otras especies de mamíferos, incluidos los de ratón, porcinos, ovinos, bovinos, caninos, felinos, equinos y otros polipéptidos de primates. Los ortólogos del Zcytor14 humano se pueden clonar usando información y composiciones provistas por la presente invención en combinación con las técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, un ADNc del Zcytor14 puede clonarse usando ARNm obtenido de un tejido o tipo celular que exprese el Zcytor14 según se describe en la presente invención. Pueden identificarse fuentes adecuadas de ARNm por sondaje de transferencias northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias descritas en la presente invención. A continuación, se prepara una genoteca a partir de ARNm de un tejido o una línea celular positivos.

[0117] Un ADNc que codifica el Zcytor14 puede aislarse con diversos métodos, por ejemplo, el sondaje con un ADNc humano completo o parcial, o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas basadas en las secuencias descritas. Un ADNc también puede clonarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores diseñados a partir de las secuencias representativas del Zcytor14 humano descritas en la presente invención. Además, puede usarse una genoteca de ADNc para transformar o transfectar células huésped y la expresión del ADNc de interés puede detectarse con un anticuerpo contra el polipéptido del Zcytor14.

[0118] Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia descrita en la SEC. ID. N.º 1 representa un único alelo del Zcytor14 humano y que se espera que se produzcan variación alélica y empalmes alternativos. Las variantes alélicas de esta secuencia pueden clonarse sondando genotecas de ADNc o genotecas genómicas de diferentes individuos según los procedimientos estándar. Las variantes alélicas de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente invención, incluidas las que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las cuales las mutaciones tienen como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos, se encuentran descritas en la presente invención, al igual que las proteínas, que son variantes alélicas de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente invención. Las moléculas de ADNc generadas a partir de ARNm empalmados en forma alternativa, que conservan las propiedades del polipéptido del Zcytor14 están incluidas dentro del alcance de la presente invención, al igual que los polipéptidos codificados por dichos ADNc y ARNm. Las variantes alélicas y las variantes por empalme de estas secuencias pueden clonarse por sondaje de genotecas de ADNc o genotecas genómicas de diferentes individuos o tejidos según los procedimientos estándar conocidos en la técnica.

[0119] Las moléculas de ácido nucleico aisladas pueden hibridarse en condiciones rigurosas a moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos descritas en la presente invención. Por ejemplo, dichas moléculas de ácidos nucleicos pueden hibridarse en condiciones rigurosas a moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1, a moléculas de ácido nucleico que consisten en la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 154 a 2229 de la SEC. ID. N.º 1, o a moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos complementaria a la SEC. ID. N.º 1 o a los nucleótidos 154 a 2229 de la SEC. ID. N.º 1. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la

temperatura (a una fuerza iónica y un pH definidos) a la cual el 50% de la secuencia de reconocimiento se hibrida con una sonda que coincide perfectamente.

[0120] Un par de moléculas de ácido nucleico, tales como, ADN-ADN, ARN-ARN y ADN-ARN, puede hibridarse si las secuencias de nucleótidos tienen cierto grado de complementariedad. Los híbridos pueden tolerar pares de bases no coincidentes en la doble hélice, pero la estabilidad del híbrido se ve influenciada por el grado de falta de coincidencia. La T_m del híbrido no coincidente disminuye 1°C por cada 1 a 1,5% de falta de coincidencia en los pares de bases. Variar la rigurosidad de las condiciones de la hibridación permite controlar el grado de falta de coincidencia que se presentará en el híbrido. El grado de rigurosidad aumenta a medida que aumenta la temperatura de hibridación y disminuye la fuerza iónica de la solución tampón de hibridación. Las condiciones de hibridación rigurosas abarcan temperaturas de aproximadamente $5\text{-}25^\circ\text{C}$ por debajo de la T_m del híbrido y una solución tampón de hibridación que tiene hasta 1 M de Na^+ . Grados de rigurosidad superiores a menores temperaturas pueden lograrse mediante la adición de formamida, que reduce la T_m del híbrido aproximadamente 1°C por cada 1% de formamida en la solución tampón. En general, dichas condiciones rigurosas incluyen temperaturas de $20\text{-}70^\circ\text{C}$, y una solución tampón de hibridación que contiene hasta $6\times\text{SSC}$ y $0\text{-}50\%$ de formamida. Se puede lograr un mayor grado de rigurosidad a temperaturas entre 40 y 70°C con una solución tampón de hibridación que tiene hasta $4\times\text{SSC}$, y entre 0 y 50% de formamida. Las condiciones muy rigurosas habitualmente comprenden temperaturas de $42\text{-}70^\circ\text{C}$ con una solución tampón de hibridación que tiene hasta $1\times\text{SSC}$ y entre 0 y 50% de formamida. Pueden usarse diferentes grados de rigurosidad durante la hibridación y el lavado para lograr la máxima unión específica a la secuencia de reconocimiento. Habitualmente, los lavados posteriores a la hibridación se realizan con grados crecientes de rigurosidad para eliminar las sondas de polinucleótidos no hibridadas de los complejos hibridados.

[0121] Las condiciones anteriores pretenden servir a modo de guía y se encuentra dentro de la capacidad de un experto en la materia adaptar estas condiciones para usarlas con el híbrido de un polipéptido en particular. La T_m para una secuencia de reconocimiento específica es la temperatura (en condiciones definidas) a la cual el 50% de la secuencia de reconocimiento se hibridará a una secuencia de sondas perfectamente coincidente. Las condiciones que influyen en la T_m incluyen el tamaño y el contenido de los pares de bases de la sonda de polinucleótidos, la fuerza iónica de la solución de hibridación y la presencia de agentes desestabilizantes en la solución de hibridación. Se conocen en la técnica numerosas ecuaciones para calcular la T_m , y estas son específicas para híbridos de ADN, ARN y ADN-ARN y secuencias de sondas de polinucleótidos de longitud variable (véanse, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger y Kimmel (eds.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, (Academic Press, Inc. 1987) y Wetmur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:227 (1990)). Existen herramientas disponibles como software para análisis de secuencias, por ejemplo, OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) y Primer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), así como sitios en internet, para analizar una secuencia determinada y calcular la T_m en base a criterios definidos por el usuario. Dichos programas también pueden analizar una secuencia determinada en condiciones definidas e identifican secuencias de sondas adecuadas. Habitualmente, la hibridación de secuencias de polinucleótidos más largas, >50 pares de bases, se realiza a temperaturas de aproximadamente $20\text{-}25^\circ\text{C}$ por debajo de la T_m calculada. Para sondas más pequeñas, <50 pares de bases, la hibridación habitualmente se lleva a cabo a la T_m , o $5\text{-}10^\circ\text{C}$ por debajo. Esto permite la máxima tasa de hibridación para híbridos de ADN-ADN y ADN-ARN.

[0122] La longitud de la secuencia de polinucleótidos influye en la tasa y la estabilidad de la formación de híbridos. Las secuencias de sondas más pequeñas, <50 pares de bases, alcanzan el equilibrio con las secuencias complementarias rápidamente, pero es posible que formen híbridos menos estables. Se pueden utilizar tiempos de incubación que pueden variar entre algunos minutos y horas para lograr la formación de los híbridos. Las secuencias de sondas más largas alcanzan el equilibrio más lentamente, pero forman complejos más estables incluso a temperaturas más bajas. Se deja que las incubaciones procedan durante la noche o durante más tiempo. En general, las incubaciones se realizan durante un período igual a tres veces el tiempo Cot calculado. El tiempo Cot es el tiempo que tardan las secuencias de polinucleótidos en volver a asociarse y puede calcularse para una secuencia en particular con métodos conocidos en la técnica.

[0123] La composición de pares de bases de la secuencia de polinucleótidos afectará la estabilidad térmica del complejo híbrido y, influyendo así en la elección de la temperatura de hibridación y la fuerza iónica de la solución tampón de hibridación. Los pares A-T son menos estables que los pares G-C en soluciones acuosas que contienen cloruro de sodio. Por lo tanto, cuanto mayor sea el contenido de G-C, más estable será el híbrido. La distribución uniforme de residuos G y C dentro de la secuencia también contribuye positivamente a la estabilidad del híbrido. Además, la composición de pares de bases puede manipularse para alterar la T_m de una secuencia determinada. Por ejemplo, se puede sustituir la desoxicitidina por 5-metil-desoxicitidina y la timidina por 5-bromo-desoxuridina para aumentar la T_m , mientras que la guanósina se puede sustituir por 7-deaza-2'-desoxiguanósina para reducir la dependencia de la T_m .

[0124] La concentración iónica de la solución tampón de hibridación también afecta a la estabilidad del híbrido. Las

soluciones tampón de hibridación generalmente contienen agentes bloqueantes, por ejemplo, la solución de Denhardt (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), ADN de esperma de salmón desnaturalizado, ARNt, leche en polvo (BLOTTO), heparina o SDS, y una fuente de Na⁺, por ejemplo, SSC (1x SSC: cloruro de sodio 0,15 M, citrato de sodio 15 mM) o SSPE (1x SSPE: NaCl 1,8 M, NaH₂PO₄ 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,7). Habitualmente, las soluciones

5 tampón de hibridación contienen entre 10 mM y 1 M de Na⁺. La adición de agentes desestabilizantes o desnaturalizantes, tales como formamida, sales de tetraalquilamonio, cationes de guanidinio o cationes de tiocianato, a la solución de hibridación alterará la T_m de un híbrido. Habitualmente, la formamida se usa en una concentración de hasta un 50% para permitir que se lleven a cabo las incubaciones a temperaturas más convenientes y más bajas. La formamida también reduce la base no específica cuando se usan sondas de ARN.

10

[0125] A modo de ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica una variante del polipéptido del Zcytor14 puede hibridarse con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) a 42°C, durante la noche, en una solución que comprende formamida al 50%, 5x SSC, fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt (100x solución de Denhardt: Ficoll 400 al 2% (p/v), polivinilpirrolidona

15 al 2% (p/v) y albúmina de suero bovino al 2% (p/v)), sulfato de dextrano al 10% y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado. Un experto en la materia puede idear variaciones de estas condiciones de hibridación. Por ejemplo, la mezcla de hibridación puede incubarse a una temperatura mayor, tal como, aproximadamente 65°C, en una solución que no contiene formamida. Además, existen soluciones de hibridación mezcladas previamente (por ejemplo, ExpressHyb Hybridization Solution de Clontech Laboratories, Inc.) y la

20 hibridación puede llevarse a cabo según las instrucciones del fabricante.

25

[0126] Después de la hibridación, las moléculas de ácido nucleico pueden lavarse para eliminar las moléculas de ácido nucleico no hibridadas en condiciones rigurosas o en condiciones muy rigurosas. Las condiciones de lavado rigurosas habituales incluyen lavado en una solución de 0,5x-2x SSC con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1% a

25 55-65°C. A modo de ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que codifican una variante del polipéptido del Zcytor14 permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) después de la aplicación de condiciones de lavado rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5x-2x SSC con SDS al 0,1% a 55-65°C, incluyendo 0,5x SSC con SDS al 0,1% a 55°C, o 2xSSC con SDS al 0,1% a 65°C. Un experto en la materia puede fácilmente idear condiciones

30 equivalentes, por ejemplo, sustituyendo SSC por SSPE en la solución de lavado.

35

[0127] Las condiciones de lavado muy rigurosas habituales incluyen el lavado en una solución de 0,1x-0,2x SSC con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1% a 50-65°C. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que codifican una variante del polipéptido del Zcytor14 permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que consiste en la

35 secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) después de la aplicación de condiciones de lavado muy rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,1x-0,2x SSC con SDS al 0,1% a 50-65°C e incluye 0,1x SSC con SDS al 0,1% a 50°C o 0,2xSSC con SDS al 0,1% a 65°C.

40

[0128] La presente memoria también proporciona polipéptidos del Zcytor14 aislados que tienen una identidad de secuencias sustancialmente similar a los polipéptidos de la SEC. ID. N.º 2 o sus ortólogos. El término "identidad de secuencias sustancialmente similar" se usa en la presente invención para indicar polipéptidos que tienen una identidad de secuencias de, como mínimo, un 70%; como mínimo, un 80%; como mínimo un 90%; como mínimo, un 95% o más del 95% con las secuencias mostradas en la SEC. ID. N.º 2 o sus ortólogos.

45

[0129] La presente memoria también contempla variantes de las moléculas de ácido nucleico del Zcytor14 que se puedan identificar aplicando dos criterios: determinación de la similitud entre el polipéptido codificado con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2 y un ensayo de hibridación, según se ha descrito más arriba. Dichas variantes del Zcytor14 incluyen las moléculas de ácido nucleico (1) que permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) después de ser

50 sometida a condiciones de lavado rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5x-2x SSC con SDS al 0,1% a 55-65°C y (2) que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de, como mínimo, un 70%; como mínimo, un 80%; como mínimo, un 90%; como mínimo, un 95% o más del 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2. Como alternativa, las variantes del Zcytor14 pueden caracterizarse como moléculas de ácido nucleico (1) que permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que consiste

55 en la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) después de ser sometida a condiciones de lavado muy rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,1x-0,2x SSC con SDS al 0,1% a 50-65°C y (2) que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de, como mínimo, un 70%; como mínimo, un 80%; como mínimo, un 90%; como mínimo, un 95% o más del 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2.

60

[0130] El porcentaje de identidad de secuencias se determina por métodos convencionales. Véanse, por ejemplo, Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48:603 (1986) y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992). En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar los valores de alineamiento utilizando una

penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 1 y la matriz de valoración "blosum62" de Henikoff y Henikoff (ibid.) tal como se muestra en la Tabla 3 (los aminoácidos se indican con códigos estándar de una sola letra). A continuación, se calcula el porcentaje de identidad como: $([\text{Número total de coincidencias idénticas}] / [\text{longitud de la secuencia más larga más el número de espacios introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias}])(100)$.

Tabla 3

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

- 10 [0131] Los expertos en la materia apreciarán que existen muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un método de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos descrita en la presente invención y la secuencia de aminoácidos de una posible variante del Zcytor14. El algoritmo FASTA ha sido descrito por Pearson y Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) y por Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990). En resumen, el FASTA caracteriza en primer lugar la similitud entre secuencias identificando las regiones compartidas por la secuencia de consulta (por ejemplo, SEC. ID. N.º 2) y una secuencia de prueba que tienen la mayor densidad de identidad (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup=2), sin tener en cuenta sustituciones, inserciones o eliminaciones conservadoras de aminoácidos. A continuación, se vuelven a puntuar las diez regiones con la mayor densidad de identidades comparando la similitud de todos los aminoácidos apareados mediante una matriz de sustitución de aminoácidos, y se "recortan" los extremos de las regiones para incluir únicamente aquellos residuos que contribuyan a la mayor puntuación. Si hay varias regiones con valoraciones mayores que el valor de "corte" (calculado mediante una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor de ktup), entonces las regiones iniciales recortadas se examinan para determinar si pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con espacios. Finalmente, las regiones con la mayor puntuación de las dos secuencias de aminoácidos se alinean mediante una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26:787 (1974)), que permite las inserciones y eliminaciones de aminoácidos. Los parámetros de ejemplo del análisis por el método FASTA son: ktup=1, penalización por apertura de espacio =10, penalización por extensión de espacio=1 y matriz de sustitución=blosum62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de la matriz de puntuación ("SMATRIX"), tal como se explica en el Anexo 2 de Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990).

[0132] El FASTA también puede utilizarse para determinar la identidad de secuencias de moléculas de ácido nucleico utilizando una relación tal como se ha descrito más arriba. Para las comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor de ktup puede variar entre uno y seis, preferentemente entre tres y seis; más preferentemente tres, con los demás parámetros fijados según se ha descrito más arriba.

[0133] La presente memoria incluye moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene un cambio conservador de aminoácidos, en comparación con una secuencia de aminoácidos descrita en la presente invención. Por ejemplo, se pueden obtener variantes que contienen una o más sustituciones de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2, en la cual un alquil aminoácido sustituye a un alquil aminoácido de una secuencia de aminoácidos del Zcytor14, un aminoácido aromático sustituye a un aminoácido aromático de una secuencia de aminoácidos del Zcytor14, un

- aminoácido que contiene azufre sustituye a un aminoácido que contiene azufre de una secuencia de aminoácidos del Zcytor14, un aminoácido que contiene hidroxilo sustituye a un aminoácido que contiene hidroxilo de una secuencia de aminoácidos del Zcytor14, un aminoácido ácido sustituye a un aminoácido ácido de una secuencia de aminoácidos del Zcytor14, un aminoácido básico sustituye a un aminoácido básico de una secuencia de aminoácidos del Zcytor14 o un aminoácido monocarboxílico dibásico sustituye a un aminoácido monocarboxílico dibásico de una secuencia de aminoácidos del Zcytor14. Entre los aminoácidos comunes, por ejemplo, una "sustitución conservadora de aminoácidos" se muestra una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) fenilalanina, tirosina y triptófano; (3) serina y treonina; (4) aspartato y glutamato; (5) glutamina y asparragina; y (6) lisina, arginina e histidina.
- 10 [0134] La tabla BLOSUM62 es una matriz de sustitución de aminoácidos derivada de aproximadamente 2.000 alineamientos múltiples locales de segmentos de secuencias de proteínas, que representan regiones altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)). Por consiguiente, las frecuencias de sustitución de la tabla BLOSUM62 pueden utilizarse para
- 15 definir sustituciones conservadoras de aminoácidos que se pueden introducir en las secuencias de aminoácidos de la presente invención. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácidos basadas únicamente en las propiedades químicas (como se analizó más arriba), la expresión "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere, preferentemente, a una sustitución representada por un valor de la tabla BLOSUM62 mayor que -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos es conservadora si la sustitución se caracteriza por un valor de la tabla
- 20 BLOSUM62 de 0, 1, 2 ó 3. Según este sistema, las sustituciones conservadoras de aminoácidos preferidas se caracterizan por un valor de la tabla BLOSUM62 de, como mínimo, 1 (por ejemplo, 1, 2 ó 3), mientras que las sustituciones conservadoras de aminoácidos más preferidas se caracterizan por un valor de la tabla BLOSUM62 de, como mínimo, 2 (por ejemplo, 2 ó 3).
- 25 [0135] Las variantes particulares del Zcytor14 se caracterizan por tener una identidad con la secuencia de aminoácidos correspondiente (por ejemplo, SEC. ID. N.º 2) de, como mínimo, un 70%; como mínimo, un 80%; como mínimo, un 90%; como mínimo, un 95% o mayor del 95%, donde la variación en la secuencia de aminoácidos se debe a una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos.
- 30 [0136] Los cambios conservadores de aminoácidos en un gen *Zcytor14* pueden introducirse, por ejemplo, sustituyendo los nucleótidos enumerados en la SEC. ID. N.º 1 por nucleótidos. Tales variantes "conservadoras de aminoácidos" pueden obtenerse por mutagénesis dirigida por oligonucleótido, mutagénesis por cribado de enlazadores, mutagénesis utilizando la reacción en cadena de la polimerasa y similares (véanse, Ausubel (1995) en las páginas 8-10 a 8-22 y McPherson (ed.), Directed Mutagenesis: A Practical Approach (IRL Press 1991)). Una
- 35 variante de un polipéptido del Zcytor14 puede identificarse por la capacidad de unirse específicamente a anticuerpos contra el Zcytor14.
- [0137] Las proteínas de la presente invención también pueden comprender residuos de aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales, incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, N-metilglicina, alo-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido piperídico, ácido tiazolidin carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, ter-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. En la técnica, se conocen varios métodos para incorporar residuos de aminoácidos no naturales a las proteínas. Por ejemplo, puede utilizarse un sistema in vitro donde se supriman las mutaciones antisentido utilizando ARNt
- 40 supresores químicamente aminoacilados. Los métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt son conocidos en la técnica. La transcripción y la traducción de plásmidos que contienen mutaciones antisentido habitualmente se realizan en un sistema sin células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas y otros reactivos disponibles comercialmente. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véanse, por ejemplo, Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722 (1991), Ellman et al., Methods Enzymol. 202:301 (1991), Chung et al., Science 259:806 (1993) y Chung et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:10145 (1993).
- 45 [0138] En un segundo método, la traducción se realiza en ovocitos de *Xenopus* por microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271:19991 (1996)). En un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural, que debe ser reemplazado (por ejemplo, fenilalanina), y en presencia del aminoácido o aminoácidos no naturales deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido no natural se incorpora a la proteína en lugar de su homólogo natural. Véase, Koide et al., Biochem. 33:7470 (1994). Los residuos de aminoácidos naturales pueden convertirse en especies no naturales mediante modificación química in vitro. La modificación química puede combinarse con mutagénesis sitio dirigida para ampliar aún más el conjunto de
- 50 sustituciones (Wynn y Richards, Protein Sci. 2:395 (1993)).
- [0139] Los residuos de aminoácidos del Zcytor14 pueden sustituirse por una cantidad limitada de aminoácidos no conservadores, aminoácidos no codificados por el código genético, aminoácidos no naturales y aminoácidos

contranaturales.

[0140] Los aminoácidos esenciales de los polipéptidos pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como, mutagénesis sitio dirigida o mutagénesis por rastreo de alanina (Cunningham y Wells, Science 244:1081 (1989), Bass et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:4498 (1991), Coombs y Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering", en Proteins: Analysis and Design, Angeletti (ed.), páginas 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)). En esta última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada residuo de la molécula y se prueban las moléculas mutantes por resultantes a fin de determinar su actividad biológica para identificar residuos de aminoácidos que resultan críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton et al., J. Biol. Chem. 271:4699 (1996).

[0141] Aunque se puede usar un análisis de secuencias para definir mejor la región de unión a ligandos del Zcytor14, también pueden determinarse los aminoácidos que cumplen una función en la actividad de unión del Zcytor14 mediante un análisis físico de la estructura, determinado por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de supuestos aminoácidos del sitio de contacto. Véanse, por ejemplo, de Vos et al., Science 255:306 (1992), Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899 (1992) y Wlodaver et al., FEBS Lett. 309:59 (1992).

[0142] Se pueden realizar múltiples sustituciones de aminoácidos y analizarlas utilizando métodos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241:53 (1988)) o Bowie y Sauer (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:2152 (1989)). En resumen, estos autores describen métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar el polipéptido funcional, y a continuación secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones admisibles en cada posición. Otros métodos que se pueden utilizar incluyen la expresión en fagos (por ejemplo, Lowman et al., Biochem. 30:10832 (1991), Ladner et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.223.409, Huse, publicación internacional No. WO 92/06204), y la mutagénesis dirigida de región (Derbyshire et al., Gene 46:145 (1986) y Ner et al., DNA 7:127, (1988)). Además, el Zcytor14 marcado con biotina o FITC puede utilizarse para la clonación de la expresión.

[0143] También pueden generarse variantes de las secuencias de nucleótidos y polipéptidos del Zcytor14 descritas a través de la transposición de secuencias de ADN, según se describe por Stemmer, Nature 370:389 (1994), Stemmer, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:10747 (1994) y la publicación internacional No. WO 97/20078. En resumen, se generan variantes de moléculas de ADN por recombinación homóloga in vitro por fragmentación aleatoria de un ADN parental, seguida de reensamblaje mediante PCR, lo cual da como resultado mutaciones puntuales introducidas al azar. Esta técnica puede modificarse utilizando una familia de moléculas de ADN parental, tales como, variantes alélicas o moléculas de ADN de diferentes especies para introducir variabilidad adicional en el proceso. La selección o el cribado para la actividad deseada, seguidos de iteraciones adicionales de mutagénesis y análisis, proporcionan la "evolución" rápida de las secuencias seleccionando las mutaciones deseables y, a la vez, seleccionando contra los cambios perjudiciales.

[0144] Los métodos de mutagénesis descritos en la presente invención pueden combinarse con métodos de cribado automatizado de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos mutagenizados clonados en células huésped. Las moléculas de ADN mutagenizado que codifican polipéptidos biológicamente activos o polipéptidos que se unen a anticuerpos contra el Zcytor14, se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente utilizando equipos modernos. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

[0145] La presente memoria también incluye "fragmentos funcionales" de polipéptidos del Zcytor14 y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales. Se pueden realizar análisis de eliminación de rutina de moléculas de ácido nucleico para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido del Zcytor14. A modo de ejemplo, las moléculas de ADN con la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 pueden digerirse con Bal31 nucleasa para obtener una serie de eliminaciones anidadas. A continuación, los fragmentos se insertan en vectores de expresión en el marco de lectura adecuado, y los polipéptidos expresados se aíslan y se analizan para determinar su capacidad para unirse a anticuerpos contra el Zcytor14. Una alternativa a la digestión con exonucleasas es usar mutagénesis dirigida por oligonucleótidos para introducir eliminaciones o codones de terminación para especificar la producción de un fragmento deseado. Como alternativa, pueden sintetizarse fragmentos particulares de un gen *Zcytor14* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

[0146] A modo de ejemplo de este enfoque general, los estudios del truncamiento en cualquiera de los extremos terminales, o en ambos extremos terminales, de los interferones han sido resumidos por Horisberger y Di Marco, Pharmac. Ther. 66:507 (1995). Además, las técnicas estándar para el análisis funcional de las proteínas han sido descritas, por ejemplo, por Treuter et al., Molec. Gen. Genet. 240:113 (1993), Content et al., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon", en Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), páginas 65-72 (Nijhoff 1987),

Herschman, "The EGF Receptor", en Control of Animal Cell Proliferation, vol. 1, Boynton et al., (eds.) páginas 169-199 (Academic Press 1985), Coumilleau et al., J. Biol. Chem. 270:29270 (1995); Fukunaga et al., J. Biol. Chem. 270:25291 (1995); Yamaguchi et al., Biochem. Pharmacol. 50:1295 (1995) y Meisel et al., Plant Molec. Biol. 30:1 (1996).

5 [0147] Un ejemplo de un fragmento funcional de un polipéptido del Zcytor14 es una forma soluble del Zcytor14 que carece de un dominio transmembrana. Las formas solubles del Zcytor14 de ejemplo incluyen polipéptidos que consisten en los residuos de aminoácidos 1 a 452 de la SEC. ID. N.º 2, los residuos de aminoácidos 21 a 452 de la SEC. ID. N.º 2, los residuos de aminoácidos 1 a 435 de la SEC. ID. N.º 10, o los residuos de aminoácidos 21 a 435 de la SEC. ID. N.º 10.

15 [0148] La presente memoria también contempla fragmentos funcionales de un gen *Zcytor14* que tienen cambios en los aminoácidos, en comparación con una secuencia de aminoácidos descrita en la presente invención. Una variante del gen *Zcytor14* puede identificarse en base a la estructura determinando el nivel de identidad con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos descritas, tal como se analizó más arriba. Un enfoque alternativo a la identificación de una variante de un gen en base a la estructura es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica una posible variante del gen *Zcytor14* puede hibridarse con una molécula de ácido nucleico que comprenda una secuencia de nucleótidos, tal como, la SEC. ID. N.º 1 o la SEC. ID. N.º 4.

20 [0149] La presente memoria también proporciona fragmentos de polipéptidos o péptidos que comprenden una parte portadora de epítomos de un polipéptido del Zcytor14 descrito en la presente invención. Dichos fragmentos o péptidos pueden comprender un "epítomo inmunógeno", que es parte de una proteína que produce una respuesta de anticuerpos cuando se utiliza toda la proteína como inmunógeno. Los péptidos portadores de epítomos inmunógenos pueden identificarse utilizando métodos estándar (véase, por ejemplo, Geysen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:3998 (1983)).

30 [0150] En cambio, los fragmentos de polipéptidos o péptidos pueden comprender un "epítomo antigénico", que es una región de una molécula proteica a la cual se puede unir específicamente un anticuerpo. Ciertos epítomos consisten en un tramo lineal o contiguo de aminoácidos, y la antigenicidad de dicho epítomo no es alterada por los agentes desnaturizantes. Se sabe en la técnica que pueden utilizarse péptidos sintéticos relativamente cortos capaces de imitar los epítomos de una proteína para estimular la producción de anticuerpos contra la proteína (véase, por ejemplo, Sutcliffe et al., Science 219:660 (1983)). Por consiguiente, los péptidos y polipéptidos portadores de epítomos antigénicos de la presente invención son útiles para desarrollar anticuerpos que se unan a los polipéptidos descritos en la presente invención.

35 [0151] Los péptidos y polipéptidos portadores de epítomos antigénicos pueden contener, como mínimo, entre cuatro y diez aminoácidos; como mínimo, entre diez y quince aminoácidos, o aproximadamente de entre 15 y 30 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos descrita en la presente invención. Dichos péptidos y polipéptidos portadores de epítomos pueden producirse fragmentando un polipéptido del Zcytor14, o por síntesis química de péptidos, tal como se describe en la presente invención. Además, los epítomos pueden seleccionarse por expresión en fagos de bibliotecas de péptidos aleatorios (véanse, por ejemplo, Lane y Stephen, Curr. Opin. Immunol. 5:268 (1993) y Cortese et al., Curr. Opin. Biotechnol. 7:616 (1996)). Los métodos estándar para identificar epítomos y producir anticuerpos a partir de péptidos pequeños que comprenden un epítomo son descritos, por ejemplo, por Mole, "Epitope Mapping", en Methods in Molecular Biology, vol. 10, Manson (ed.), páginas 105-116 (The Humana Press, Inc. 1992), Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, Ritter y Ladyman (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995) y Coligan et al. (eds.), Current Protocols in Immunology, páginas 9.3.1-9.3.5 y páginas 9.4.1-9.4.11 (John Wiley & Sons 1997).

50 [0152] Para cualquier polipéptido del Zcytor14, incluidas las variantes y las proteínas de fusión, un experto en la materia puede generar fácilmente una secuencia de polinucleótidos totalmente degenerada que codifica dicha variante utilizando la información presentada en las Tablas 1 y 2 anteriores. Además, los expertos en la materia pueden usar software estándar para idear variantes del Zcytor14 basadas en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos descritas en la presente invención. Por consiguiente, la presente memoria incluye un medio legible por ordenador y codificado con una estructura de datos que proporciona, como mínimo, una de las siguientes secuencias: SEC. ID. N.º 1, SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 6, SEC. ID. N.º 8, SEC. ID. N.º 9, SEC. ID. N.º 10, SEC. ID. N.º 11 y SEC. ID. N.º 12. Las formas adecuadas de medios legibles por ordenador incluyen medios magnéticos y ópticos. Ejemplos de medios magnéticos incluyen un disco duro o fijo, un chip de memoria de acceso aleatorio (random access memory, RAM), un disco flexible, una cinta digital lineal (digital linear tape, DLT), una memoria caché en disco y un disco ZIP. Los ejemplos de medios ópticos incluyen discos compactos (por ejemplo, memoria de solo lectura en disco compacto (CD-read only memory, ROM), CD reescribible (CD-rewritable, RW) y CD grabable (CD-recordable)), además de discos digitales versátiles/de vídeo (digital versatile/video disc, DVD) (por ejemplo, DVD-ROM, DVD-RAM y DVD+RW).

6. Producción de polipéptidos de Zcytor14

[0153] Se pueden producir polipéptidos, incluidos los polipéptidos de longitud completa, los fragmentos funcionales y las proteínas de fusión, en células huésped recombinantes siguiendo las técnicas convencionales. Para expresar un gen *Zcytor14*, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido debe estar unida operativamente a secuencias reguladoras que controlan la expresión transcripcional en un vector de expresión y, a continuación, debe ser introducida en una célula huésped. Además de las secuencias reguladoras de la transcripción, tales como, promotores y potenciadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencias reguladoras de la traducción y un gen marcador adecuado para la selección de las células que portan el vector de expresión.

[0154] Los vectores de expresión adecuados para la producción de una proteína foránea en células eucariotas habitualmente contienen (1) elementos de ADN procariota que codifican un origen de replicación bacteriana y un marcador de resistencia a antibióticos para permitir el crecimiento y la selección del vector de expresión en un huésped bacteriano; (2) elementos de ADN eucariota que controlan el inicio de la transcripción, tal como un promotor; y (3) elementos de ADN que controlan el procesamiento de los transcritos, tales como, una secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación. Como se analizó más arriba, los vectores de expresión también pueden incluir secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de secreción que dirige al polipéptido heterólogo hacia el mecanismo secretor de una célula huésped. Por ejemplo, un vector de expresión del *Zcytor14* puede comprender un gen *Zcytor14* y una secuencia secretora derivada de cualquier gen secretado.

[0155] Las proteínas del *Zcytor14* pueden expresarse en células de mamíferos. Ejemplos de células huésped de mamíferos adecuadas incluyen células de riñón de mono verde africano (Vero; ATCC CRL 1587), células de riñón de embrión humano (293-HEK; ATCC CRL 1573), células de riñón de hámster lactante (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células de riñón canino (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin et al., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986)), células de pituitaria de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de riñón de mono transformadas por SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

[0156] Para un huésped mamífero, las señales reguladoras de la transcripción y la traducción pueden derivarse de fuentes virales, tales como, adenovirus, virus del papiloma bovino, virus de simio, o similares, en los cuales las señales reguladoras están asociadas con un gen en particular, que tiene un alto nivel de expresión. También pueden obtenerse secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción adecuadas de genes de mamíferos, tales como, los genes de actina, colágeno, miosina y metalotioneína.

[0157] Las secuencias reguladoras de la transcripción incluyen una región promotora suficiente para dirigir el inicio de la síntesis de ARN. Los promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor del gen de la metalotioneína I de ratón (Hamer et al., J. Molec. Appl. Genet. 1:273 (1982)), el promotor TK del virus Herpes (McKnight, Cell 31:355 (1982)), el promotor temprano de SV40 (Benoist et al., Nature 290:304 (1981)), el promotor del virus del sarcoma de Rous (Gorman et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 79:6777 (1982)), el promotor del citomegalovirus (Foecking et al., Gene 45:101 (1980)) y el promotor del virus del tumor mamario de ratón (véase, en general, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (ed.), páginas 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

[0158] Alternativamente, puede usarse un promotor procariota, tal como, el promotor para la ARN polimerasa del bacteriófago T3, para controlar la expresión génica del *Zcytor14* en células de mamíferos si el promotor procariota es regulado por un promotor eucariota (Zhou et al., Mol. Cell. Biol. 10:4529 (1990) y Kaufman et al., Nucl. Acids Res. 19:4485 (1991)).

[0159] Puede introducirse un vector de expresión en las células huésped utilizando un conjunto de técnicas estándar, incluyendo la transfección con fosfato de calcio, la transfección mediada por liposomas, la liberación mediada por microproyectiles, la electroporación y similares. Las células transfectadas pueden seleccionarse y propagarse para proporcionar células huésped recombinantes que comprenden el vector de expresión integrado de manera estable en el genoma de la célula huésped. Las técnicas para introducir los vectores en las células eucariotas y las técnicas para seleccionar dichos transformantes estables utilizando un marcador seleccionable dominante han sido descritas, por ejemplo, por Ausubel (1995) y por Murray (ed.), Gene Transfer and Expression Protocols (Humana Press 1991).

[0160] Por ejemplo, un marcador seleccionable adecuado es un gen que proporciona resistencia al antibiótico neomicina. En este caso, la selección se realiza en presencia de un fármaco del tipo de la neomicina, tal como, el G-418 o similar. Los sistemas de selección también pueden usarse para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, proceso conocido como "amplificación". La amplificación se realiza cultivando transfectantes en presencia de

- un nivel bajo del agente selectivo y a continuación aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar las células que producen altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable amplificable adecuado es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato. También pueden utilizarse otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a la higromicina, resistencia a múltiples fármacos, puromicina acetiltransferasa). Alternativamente, pueden utilizarse marcadores que introducen un fenotipo alterado, tal como la proteína fluorescente verde o las proteínas de superficie celular, tales como los CD4, los CD8, el MHC de Clase I y la fosfatasa alcalina placentaria, para diferenciar las células transfectadas de las no transfectadas por medios, tales como la clasificación FACS o la tecnología de separación con perlas magnéticas.
- 5
- 10 **[0161]** Los polipéptidos del Zcytor14 también pueden producirse por células de mamíferos cultivadas con un sistema de liberación viral. Los ejemplos de virus para este fin incluyen el adenovirus, virus herpes, virus vaccinia y virus adenoasociado (AAV). El adenovirus, un virus de ADN de doble cadena, es actualmente el vector de transferencia génica mejor estudiado para la liberación de ácido nucleico heterólogo (para revisión, véanse Becker et al., Meth. Cell Biol. 43:161 (1994) y Douglas y Curiel, Science & Medicine 4:44 (1997)). Las ventajas del sistema del adenovirus incluyen la introducción de insertos de ADN relativamente grandes, la capacidad de crecer hasta un título alto, la capacidad de infectar una amplia gama de tipos de células de mamíferos y la flexibilidad que permite su uso con una gran cantidad de vectores disponibles que contienen diferentes promotores.
- 15
- [0162]** Al eliminar las partes del genoma del adenovirus, se pueden introducir insertos mayores (hasta 7 kb) de ADN heterólogo. Estos insertos se pueden incorporar en el ADN viral mediante unión directa o por recombinación homóloga con un plásmido cotransfectado. Una opción es eliminar el gen esencial E1 del vector viral, lo cual tiene como consecuencia la incapacidad de replicarse a menos que el gen E1 sea provisto por la célula huésped. Por ejemplo, las células 293 humanas infectadas por el vector adenovirus (ATCC N.º CRL-1573, 45504, 45505) pueden desarrollarse como células adherentes o en cultivo en suspensión a una densidad celular relativamente alta para producir cantidades de proteína significativas (véase, Garnier et al., Cytotechnol. 15:145 (1994)).
- 20
- [0163]** El Zcytor14 también puede expresarse en otras células eucariotas superiores, tales como, células aviares, fúngicas, de insectos, levaduras o plantas. El sistema del baculovirus proporciona un medio eficiente para introducir genes *Zcytor14* clonados en células de insectos. Los vectores de expresión adecuados se basan en el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de la *Autographa californica* (AcMNPV), y contienen promotores bien conocidos, tales como el promotor 70 de la proteína de choque térmico de la *Drosophila* (hsp), el promotor temprano inmediato del gen del virus de la polihedrosis nuclear de la *Autographa californica* (ie-1) y el promotor 39K temprano retrasado, el promotor p10 del baculovirus y el promotor de la metalotioneína de la *Drosophila*. Un segundo método para fabricar baculovirus recombinantes utiliza un sistema basado en transposones descrito por Luckow (Luckow, et al., J. Virol. 67:4566 (1993)). Este sistema, que utiliza vectores de transferencia, se vende en el kit BAC-to-BAC (Life Technologies, Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, PFASTBAC (Life Technologies), que contiene un transposón Tn7 para trasladar el ADN que codifica el polipéptido del Zcytor14 a un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un gran plásmido denominado "bácmido". Véanse, Hill-Perkins y Possee, J. Gen. Virol. 71:971 (1990), Bonning, et al., J. Gen. Virol. 75:1551 (1994) y Chazenbalk y Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543 (1995). Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión dentro del marco con ADN que codifica un epítipo etiqueta en el extremo C- o N-terminal del polipéptido del Zcytor14 expresado, por ejemplo, un epítipo etiqueta Glu-Glu (Grussenmeyer et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 82:7952 (1985)). Utilizando una técnica conocida en la técnica, un vector de transferencia que contiene un gen *Zcytor14* se transforma en *E. coli*, y se criba para detectar bácmidos, que contienen un gen *lacZ* interrumpido indicativo de baculovirus recombinante. A continuación, se aísla el ADN del bácmido que contiene el genoma del baculovirus recombinante utilizando técnicas habituales.
- 30
- 35
- 40
- 45
- [0164]** El vector pFastBac de ejemplo puede modificarse en un grado considerable. Por ejemplo, el promotor de la poliedrina puede extraerse y sustituirse por el promotor de la proteína básica del baculovirus (conocido también como promotor Pcor, p6.9 o MP), que se expresa más temprano en la infección por baculovirus y se ha demostrado que es ventajoso para expresar proteínas secretadas (véanse, por ejemplo, Hill-Perkins y Possee, J. Gen. Virol. 71:971 (1990), Bonning, et al., J. Gen. Virol. 75:1551 (1994) y Chazenbalk y Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543 (1995). En dichas construcciones de vectores de transferencia, puede utilizarse una versión corta o larga del promotor de la proteína básica. Además, pueden construirse vectores de transferencia que reemplacen las secuencias señal de secreción nativas del Zcytor14 con secuencias señal de secreción derivadas de proteínas de insectos. Por ejemplo, puede utilizarse una secuencia señal de secreción de la Ecdisteroide Glucosiltransferasa (EGT), la melitina de abeja melífera (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA) o el baculovirus gp67 (PharMingen; San Diego, CA) en construcciones para reemplazar la secuencia señal de secreción nativa del Zcytor14.
- 55
- 60 **[0165]** El virus recombinante o el bácmido se usan para transfectar células huésped. Las células huésped de insectos adecuadas incluyen líneas celulares derivadas de IPLB-Sf-21, una línea celular de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda*, tal como Sf9 (ATCC CRL 1711), Sf21AE y Sf21 (Invitrogen Corporation; San Diego, CA), así como células Schneider-2 de *Drosophila*, y la línea celular HIGH FIVEO (Invitrogen) derivada de la *Trichoplusia ni*

(Patente de los EE. UU. N.º 5.300.435). Para desarrollar y mantener las células puede utilizarse un medio sin suero disponible comercialmente. Los medios adecuados son Sf900 IITM (Life Technologies) o ESF 921TM (Expression Systems) para las células Sf9; y Ex-cello405TM (JRH Biosciences, Lenexa, KS) o Express FiveOTM (Life Technologies) para las células de T. ni. Cuando se utiliza un virus recombinante, las células habitualmente se desarrollan a partir de una densidad de inoculación de aproximadamente $2-5 \times 10^5$ células a una densidad de $1-2 \times 10^6$ células, en cuyo momento se agrega un lote de virus recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 a 10, más habitualmente cerca de 3.

[0166] Las técnicas establecidas para producir proteínas recombinantes en sistemas de baculovirus son provistas por Bailey et al., "Manipulation of Baculovirus Vectors", en *Methods in Molecular Biology*, Volumen 7: Gene Transfer and Expression Protocols, Murray (ed.), páginas 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991), por Patel et al., "The baculovirus expression system", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2.a edición, Glover et al. (ed.), páginas 205-244 (Oxford University Press 1995), por Ausubel (1995) en las páginas 16-37 a 16-57, por Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995) y por Lucknow, "Insect Cell Expression Technology", en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), páginas 183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).

[0167] Las células fúngicas, incluyendo las células de levaduras, también pueden utilizarse para expresar los genes descritos en la presente invención. Las especies de levaduras de interés particular en este sentido incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Los promotores adecuados para la expresión en levaduras incluyen los promotores de GAL1 (galactosa), PGK (fosfoglicerato quinasa), ADH (alcohol deshidrogenasa), AOX1 (alcohol oxidasa), HIS4 (histidinol deshidrogenasa) y similares. Se han diseñado muchos vectores de clonación en levaduras, que están fácilmente disponibles. Estos vectores incluyen vectores basados en Ylp, tal como, Ylp5; vectores YRp, tales como, YRp17; vectores YEp, tales como YEp13; y vectores YCp, tales como YCp19. Los métodos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de éstas se describen, por ejemplo, en Kawasaki, Patente de los EE. UU. N.º 4.599.311, Kawasaki et al., Patente de los EE. UU. N.º 4.931.373, Brake, Patente de los EE. UU. N.º 4.870.008, Welch et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.037.743 y Murray et al., Patente de los EE. UU. N.º 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por fenotipo determinado por el marcador seleccionable, la resistencia a fármacos habituales o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema de vectores adecuado para usar en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema de vectores POT1 descrito por Kawasaki et al. (Patente de los EE. UU. N.º 4.931.373), que permite seleccionar las células transformadas mediante el crecimiento en un medio que contenga glucosa. Los promotores y terminadores adecuados adicionales para usar en levaduras incluyen los genes de enzimas glucolíticas (véanse, por ejemplo, Kawasaki, Patente de los EE. UU. N.º 4.599.311, Kingsman et al., Patente de los EE. UU. N.º 4.615.974 y Bitter, Patente de los EE. UU. N.º 4.977.092) y genes de la alcohol deshidrogenasa. Véanse también, las Patentes de los EE. UU. N.º 4.990.446, 5.063.154, 5.139.936 y 4.661.454.

[0168] En la técnica, se conocen sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*. Véanse, por ejemplo, Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* 132:3459 (1986) y Cregg, Patente de los EE. UU. N.º 4.882.279. Pueden utilizarse células de *Aspergillus* según los métodos de McKnight et al., Patente de los EE. UU. N.º 4.935.349. Los métodos para transformar *Acremonium chrysogenum* han sido descritos por Sumino et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.162.228. Los métodos para transformar *Neurospora* han sido descritos por Lambowitz, Patente de los EE. UU. N.º 4.486.533.

[0169] Por ejemplo, el uso de *Pichia methanolica* como huésped para la producción de proteínas recombinantes ha sido divulgado por Raymond, Patente de los EE. UU. N.º 5.716.808, Raymond, Patente de los EE. UU. N.º 5.736.383, Raymond et al., *Yeast* 14:11-23 (1998) y en las publicaciones internacionales N.º WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 y WO 98/02565. Habitualmente, las moléculas de ADN para uso en la transformación de *P. methanolica* se prepararán como plásmidos circulares de doble cadena que, preferiblemente, se linealizan antes de la transformación. Para la producción de polipéptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y el terminador del plásmido sean de un gen de *P. methanolica*, tal como, el gen de utilización de alcohol de *P. methanolica* (AUG1 o AUG2). Otros promotores útiles incluyen los de los genes de la dihidroxiacetona sintasa (DHAS), la formato deshidrogenasa (FMD) y la catalasa (CAT). Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma huésped, se prefiere tener la totalidad del segmento de expresión del plásmido flanqueado en ambos extremos por secuencias de ADN del huésped. Un marcador seleccionable adecuado para usar en *Pichia methanolica* es un gen ADE2 de *P. methanolica*, que codifica la fosforibosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21) y que permite que las células huésped del ade2 crezcan en ausencia de adenina. Para procesos industriales a gran escala, en los que es deseable minimizar el uso de metanol, pueden utilizarse células huésped en las cuales se ha eliminado los genes de utilización del metanol (AUG1 y AUG2). Para la producción de proteínas secretadas, se prefieren células huésped con deficiencia de los genes de la proteasa vacuolar (PEP4 y PRB1). Se utiliza la electroporación para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un polipéptido de interés en las células de *P.*

methanolica. Las células de *P. methanolica* pueden transformarse por electroporación utilizando un campo eléctrico pulsado con atenuación exponencial con una potencia de campo de entre 2,5 y 4,5 kV/cm; preferentemente, aproximadamente 3,75 kV/cm y una constante de tiempo (t) que varía entre 1 y 40 milisegundos; más preferentemente, aproximadamente 20 milisegundos.

5
 [0170] También se pueden introducir vectores de expresión en protoplastos de origen vegetal, tejidos de origen vegetal intactos y células de origen vegetal aisladas. Los métodos para introducir vectores de expresión en tejido de origen vegetal incluyen la infección directa o el cocultivo de tejido de origen vegetal con *Agrobacterium tumefaciens*, la liberación mediada por microproyectiles, la inyección de ADN, la electroporación y otros similares. Véanse, por ejemplo, Horsch et al., *Science* 227:1229 (1985), Klein et al., *Biotechnology* 10:268 (1992) y Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants", en *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick et al. (eds.), páginas 67-88 (CRC Press, 1993).

15
 [0171] Alternativamente, los genes *Zcytor14* pueden expresarse en células huésped procariotas. Los promotores adecuados que pueden utilizarse para expresar los polipéptidos del *Zcytor14* en un huésped procariota son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen los promotores capaces de reconocer las polimerasas T4, T3, Sp6 y T7, los promotores PR y PL del bacteriófago lambda, los promotores trp, recA, choque térmico, lacUV5, tac, lpp-lacSpr, phoA y lacZ de *E. coli*, los promotores de la *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, los promotores de *Streptomyces*, el promotor int del bacteriófago lambda, el promotor bla del pBR322 y el promotor
 20 CAT del gen de la cloranfenicol acetil transferasa. Los promotores procariotas han sido revisados por Glick, *J. Ind. Microbiol.* 1:277 (1987), Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4a ed. (Benjamin Cummins 1987) y por Ausubel et al. (1995).

25
 [0172] Los ejemplos de huéspedes procariotas incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las cepas adecuadas de *E. coli* incluyen BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF', DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451 y ER1647 (véase, por ejemplo, Brown (ed.), *Molecular Biology Labfax* (Academic Press 1991)). Las cepas adecuadas de *Bacillus subtilis* incluyen BR151, YB886, MI119, MI120, y B170 (véase, por ejemplo, Hardy, "Bacillus Cloning Methods", en *DNA Cloning: A Practical Approach*, Glover (ed.) (IRL Press 1985)).

30
 [0173] Cuando se expresa un polipéptido del *Zcytor14* en bacterias, tales como, *E. coli*, el polipéptido puede ser retenido en el citoplasma, habitualmente en forma de gránulos insolubles, o puede ser dirigido al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se lisan, se recuperan los gránulos y se desnaturalizan con, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado
 35 puede replegarse a continuación y dimerizarse diluyendo el desnaturalizante, tal como, por diálisis contra una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguido de diálisis contra una solución salina tamponada. En el último caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional alterando las células (por ejemplo, por sonicación o choque osmótico) para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando así la necesidad de desnaturalizar y replegar.

40
 [0174] Los métodos para expresar las proteínas en los huéspedes procariotas son bien conocidos por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Williams et al., "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2.a edición, Glover et al. (eds.), página 15 (Oxford University Press 1995), Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies",
 45 en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995) y Georgiou, "Expression of Proteins in Bacteria", en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), página 101 (JohnWiley& Sons, Inc. 1996)).

[0175] Los métodos estándar para introducir vectores de expresión en células de bacterias, levaduras, insectos y
 50 plantas, han sido proporcionados, por ejemplo, por Ausubel (1995).

[0176] Los métodos generales para expresar y recuperar la proteína foránea producida por el sistema celular de un mamífero, han sido proporcionados, por ejemplo, por Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), página 163 (Wiley-Liss, Inc.
 55 1996). Las técnicas estándar para recuperar la proteína producida por un sistema bacteriano han sido proporcionadas, por ejemplo, por Grisshammer et al., "Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2.a edición, Glover et al. (eds.), páginas 59-92 (Oxford University Press 1995). Los métodos establecidos para aislar proteínas recombinantes de un sistema de baculovirus han sido descritos por Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995).

60
 [0177] Como alternativa, los polipéptidos pueden sintetizarse por síntesis en fase sólida exclusiva, métodos de fase sólida parcial, condensación de fragmentos o la síntesis de soluciones clásica. Estos métodos de síntesis son bien conocidos por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1963),

Stewart et al., "Solid Phase Peptide Synthesis" (2.a edición), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer y Rapp, Chem. Pept. Prot. 3:3 (1986), Atherton et al., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press 1989), Fields y Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis", Methods in Enzymology Volume 289 (Academic Press 1997) y Lloyd-Williams et al., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (CRC Press, Inc. 1997)). Las variaciones de las estrategias de síntesis química total, tales como, "unión química nativa" y "unión de proteínas expresadas" también son estándar (véanse, por ejemplo, Dawson et al., Science 266:776 (1994), Hackeng et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94:7845 (1997), Dawson, Methods Enzymol. 287: 34 (1997), Muir et al, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:6705 (1998) y Severinov y Muir, J. Biol. Chem. 273:16205 (1998)).

10 **[0178]** Los péptidos y polipéptidos descritos en la presente invención comprenden como mínimo seis, como mínimo nueve o como mínimo 15 residuos de aminoácidos contiguos de la SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 10, SEC. ID. N.º 11 o SEC. ID. N.º 12. Por ejemplo, la presente memoria incluye polipéptidos que comprenden, o consisten en, 15 aminoácidos contiguos de las siguientes secuencias de aminoácidos: los residuos de aminoácidos 21 a 452 de la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2, los residuos de aminoácidos 21 a 435 de la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 10, los residuos de aminoácidos 474 a 677 de la SEC. ID. N.º 2, o los residuos de aminoácidos 457 a 673 de la SEC. ID. N.º 10. Dentro de ciertas aplicaciones, los polipéptidos comprenden 20, 30, 40, 50, 100 o más residuos contiguos de estas secuencias de aminoácidos. A manera de ejemplo, la presente memoria incluye polipéptidos que comprenden, o consisten en, 30 ó 40 aminoácidos contiguos de las siguientes secuencias de aminoácidos: los residuos de aminoácidos 21 a 452 de la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2, los residuos de aminoácidos 21 a 435 de la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 10, los residuos de aminoácidos 474 a 677 de la SEC. ID. N.º 2, o los residuos de aminoácidos 457 a 673 de la SEC. ID. N.º 10. Las moléculas de ácido nucleico que codifican dichos péptidos y polipéptidos son útiles como cebadores y sondas para la reacción en cadena de la polimerasa.

25 7. Producción de proteínas de fusión Zcytor14 y conjugados

[0179] Una clase general de análogos del Zcytor14 son variantes que tienen una secuencia de aminoácidos que es una mutación de la secuencia de aminoácidos descrita en la presente invención. Otra clase general de análogos del Zcytor14 es proporcionada por los anticuerpos antiidiotipo y fragmentos de los mismos, tal como se describe a continuación. Además, los anticuerpos recombinantes que comprenden dominios variables antiidiotipo pueden utilizarse como análogos, (véase, por ejemplo, Monfardini et al., Proc. Assoc. Am. Physicians 108:420 (1996)). Dado que los dominios variables de los anticuerpos antiidiotipo contra el Zcytor14 mimetizan el Zcytor14, estos dominios pueden proporcionar actividad de unión a Zcytor14. Los métodos para producir anticuerpos catalíticos antiidiotípicos son conocidos por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Joron et al., Ann. N Y Acad. Sci. 672:216 (1992), Friboulet et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 47:229 (1994) y A Valle et al., Ann. N Y Acad. Sci. 864:118 (1998)).

[0180] Se proporciona otra estrategia para identificar análogos del Zcytor14 mediante el uso de bibliotecas combinatorias. Los métodos para construir y cribar bibliotecas de expresión en fagos y otras bibliotecas combinatorias han sido proporcionados, por ejemplo, por Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press 1996), Verdine, Patente de los EE. UU. N.º 5.783.384, Kay, et. al., Patente de los EE. UU. N.º 5.747.334 y Kauffman et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.723.323.

[0181] Los polipéptidos del Zcytor14 tienen usos in vivo e in vitro. A manera de ejemplo, una forma soluble del Zcytor14 puede añadirse a un medio de cultivo celular para inhibir los efectos del ligando del Zcytor14 producido por las células cultivadas.

[0182] Las proteínas de fusión del Zcytor14 pueden utilizarse para expresar el Zcytor14 en un huésped recombinante y para aislar el Zcytor14 producido. Tal como se describe más abajo, las proteínas de fusión del Zcytor14 también tienen usos en el diagnóstico y tratamiento. Un tipo de proteína de fusión comprende un péptido que guía a un polipéptido del Zcytor14 desde una célula huésped recombinante. Para dirigir un polipéptido del Zcytor14 hacia el mecanismo de secreción de una célula huésped eucariota, se proporciona una secuencia señal de secreción (también conocida como péptido señal, secuencia líder, secuencia prepro o presecuencia) en el vector de expresión del Zcytor14. Aunque la secuencia señal de secreción puede derivarse del Zcytor14, una secuencia señal adecuada también puede derivarse de otra proteína segregada o sintetizada de novo. La secuencia señal de secreción está unida operativamente a una secuencia que codifica el Zcytor14 de modo tal que ambas secuencias están unidas en el marco de lectura correcto y posicionadas para dirigir el polipéptido nuevo sintetizado hacia el mecanismo de secreción de la célula huésped. Las secuencias señal de secreción están habitualmente en posición 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés, aunque determinadas secuencias señal de secreción pueden estar situadas en otro lugar de la secuencia de nucleótidos de interés (véanse, por ejemplo, Welch et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.037.743; Holland et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.143.830).

[0183] Aunque la secuencia señal de secreción del Zcytor14 o de otra proteína producida por células de mamíferos

(por ejemplo, la secuencia señal del activador de tipo tisular del plasminógeno, tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE. UU. N.º 5.641.655) es útil para la expresión del Zcytor14 en huéspedes de mamíferos recombinantes, se prefiere una secuencia señal de levadura para la expresión en células de levadura. Los ejemplos de secuencias señal de levaduras adecuadas son las derivadas del factor α de la feromona sexual de las levaduras (codificado por el gen MF α 1), la invertasa (codificada por el gen SUC2) o la fosfatasa ácida (codificada por el gen PHO5). Véase, por ejemplo, Romanos et al., "Expression of Cloned Genes in Yeast", en DNA Cloning 2: A Practical Approach, 2.a edición, Glover y Hames (eds.), páginas 123-167 (Oxford University Press 1995).

[0184] En las células bacterianas, a menudo es deseable expresar una proteína heteróloga como proteína de fusión a fin de disminuir la toxicidad, aumentar la estabilidad y mejorar la recuperación de la proteína expresada. Por ejemplo, el Zcytor14 puede expresarse como una proteína de fusión que comprende un polipéptido de la glutatión S transferasa. Las proteínas de fusión de la glutatión S transferasa habitualmente son solubles y se pueden purificar con facilidad a partir de lisados de *E. coli* en columnas de glutatión inmovilizado. En estrategias similares, una proteína de fusión del Zcytor14 que comprende un polipéptido de una proteína de unión a maltosa puede aislarse con una columna de resina de amilosa, mientras que una proteína de fusión que comprende el extremo C terminal de un gen truncado de la Proteína A puede purificarse utilizando IgG-Sefarosa. Las técnicas establecidas para expresar un polipéptido heterólogo como una proteína de fusión en una célula bacteriana han sido descritas, por ejemplo, por Williams et al., "Expression of Foreign Proteins in *E. coli* Using Plasmid Vectors and Purification of Specific Polyclonal Antibodies", en DNA Cloning 2: A Practical Approach, 2.a edición, Glover y Hames (eds.), páginas 15-58 (Oxford University Press 1995). Además, existen sistemas de expresión disponibles comercialmente. Por ejemplo, el sistema de purificación de proteínas PINPOINT Xa (Promega Corporation; Madison, WI) proporciona un método para aislar una proteína de fusión que comprende un polipéptido que se biotinila durante la expresión con una resina que comprende la avidina.

[0185] Las etiquetas peptídicas que son útiles para aislar polipéptidos heterólogos expresados por células eucariotas o procariotas incluyen las etiquetas de polihistidina (que tienen afinidad por la resina quelante del níquel), las etiquetas c-myc, la proteína de unión a la calmodulina (aislada mediante cromatografía de afinidad a calmodulina), la sustancia P, la etiqueta RYIRS (que se une a los anticuerpos contra el RYIRS), la etiqueta Glu-Glu y la etiqueta FLAG (que se une con anticuerpos contra FLAG). Véanse, por ejemplo, Luo et al., Arch. Biochem. Biophys. 329:215 (1996), Morganti et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 23:67 (1996) y Zheng et al., Gene 186:55 (1997). Las moléculas de ácido nucleico que codifican dichas etiquetas peptídicas están disponibles, por ejemplo de Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO).

[0186] La presente memoria también contempla el uso de la secuencia señal de secreción contenida en los polipéptidos del Zcytor14 de la presente invención para dirigir otros polipéptidos en el mecanismo de secreción. Puede crearse un polipéptido señal de fusión en el cual una secuencia señal de secreción derivada de los residuos de aminoácidos 1 a 20 de la SEC. ID. N.º 2 se une operativamente a otro polipéptido mediante métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente invención. La secuencia señal de secreción contenida en los polipéptidos de fusión se fusiona, preferentemente, en la región amino terminal a un péptido adicional para dirigir el péptido adicional hacia el mecanismo de secreción. Dichas construcciones tienen numerosas aplicaciones conocidas en la técnica. Por ejemplo, estas nuevas construcciones de fusión de secuencia señal de secreción pueden dirigir la secreción de un componente activo de una proteína normalmente no segregada, tal como un receptor. Dichas fusiones pueden utilizarse en un animal transgénico o en un huésped recombinante cultivado para dirigir los péptidos a través del mecanismo de secreción. Con respecto a lo último, los ejemplos de polipéptidos incluyen moléculas farmacéuticamente activas, tales como Factor VIIa, proinsulina, insulina, hormona estimuladora de folículos, activador de tipo tisular del plasminógeno, factor de necrosis tumoral, interleuquinas (por ejemplo, interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17 e IL-18), factores estimuladores de colonias (por ejemplo, factor estimulador de colonias de granulocitos y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos), interferones (por ejemplo, interferones- α , - β , - γ , - ω , - δ , - ϵ , y - τ), factor de crecimiento de células madre denominado "Factor S1", eritropoyetina y trombopoyetina. La secuencia señal de secreción del Zcytor14 contenida en los polipéptidos de fusión de la presente invención se fusiona, preferentemente, en la región amino terminal a un péptido adicional para dirigir el péptido adicional en el mecanismo de secreción. Las proteínas de fusión que comprenden una secuencia señal de secreción del Zcytor14 pueden construirse utilizando técnicas estándar.

[0187] Otra forma de proteína de fusión comprende un polipéptido del Zcytor14 y una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, habitualmente un fragmento Fc, que contiene dos o tres dominios de región constante y una región bisagra pero carece de la región variable. A manera de ejemplo, Chang et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.723.125, describen una proteína de fusión que comprende un interferón humano y un fragmento Fc de inmunoglobulina humana. El C terminal del interferón está unido al N terminal del fragmento Fc por una fracción enlazadora peptídica. Un ejemplo de enlazador peptídico es un péptido que comprende principalmente una secuencia inerte de célula T, que es inmunológicamente inerte. Un ejemplo de enlazador peptídico tiene la

secuencia de aminoácidos: GGSGG SGGGG SGGGG S (SEC. ID. N.º 7). En esta proteína de fusión, una fracción Fc preferida es una cadena γ 4 humana que es estable en solución y tiene escasa o nula actividad activadora de complemento. Por consiguiente, la presente memoria contempla una proteína de fusión del Zcytor14 que comprende una fracción del Zcytor14 y un fragmento Fc humano, donde el C terminal de la fracción del Zcytor14 está unida al N terminal del fragmento Fc a través de un enlazador peptídico, tal como un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 7. La fracción del Zcytor14 puede ser una molécula del Zcytor14 o un fragmento de la misma. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender un fragmento del Zcytor14 que contiene el dominio extracelular (por ejemplo, un receptor soluble del Zcytor14) y un fragmento Fc (por ejemplo, un fragmento Fc humano).

10

[0188] En otra variante, una proteína de fusión del Zcytor14 comprende una secuencia de IgG, una fracción del Zcytor14 unida de forma covalente con el extremo amino terminal de la secuencia de IgG y un péptido señal unido de forma covalente al amino terminal de la fracción del Zcytor14, donde la secuencia de IgG consiste en los siguientes elementos en el siguiente orden: una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Por consiguiente, la secuencia de IgG carece de dominio CH1. La fracción del Zcytor14 muestra actividad del Zcytor14, tal como se describe en la presente invención, tal como la capacidad de unirse a un ligando del Zcytor14. Este enfoque general para la producción de proteínas de fusión que comprenden tanto partes de anticuerpo como partes que no son de anticuerpo se ha descrito por LaRochelle et al., EP 742830 (WO 95/21258).

15

[0189] Las proteínas de fusión que comprenden una fracción del Zcytor14 y una fracción Fc pueden utilizarse, por ejemplo, como herramientas para ensayos in vitro. Por ejemplo, la presencia de un ligando del Zcytor14 en una muestra biológica puede detectarse utilizando una proteína de fusión Zcytor14-inmunoglobulina, en la cual la fracción del Zcytor14 se utiliza para unir el ligando y una macromolécula, tal como la Proteína A o el anticuerpo contra el Fc, se utiliza para unir la proteína de fusión a un soporte sólido. Dichos sistemas pueden utilizarse para identificar los agonistas y antagonistas que interfieren en la unión de un ligando del Zcytor14 a su receptor.

25

[0190] Otros ejemplos de proteínas de fusión de anticuerpos incluyen polipéptidos que comprenden un dominio de unión a un antígeno y un fragmento del Zcytor14 que contiene un dominio extracelular del Zcytor14. Dichas moléculas pueden utilizarse para reconocer tejidos específicos para el beneficio de la actividad de unión al Zcytor14.

30

[0191] La presente memoria proporciona además una serie de otras fusiones de polipéptidos. Por ejemplo, una parte o la totalidad de los dominios que confieren una función biológica pueden intercambiarse entre el Zcytor14 descrito en la presente invención por el dominio o dominios funcionalmente equivalentes de otro miembro de la familia de receptores de las citoquinas. Las fusiones de polipéptidos pueden expresarse en células huésped recombinantes para producir una variedad de análogos de fusión del Zcytor14. Un polipéptido del Zcytor14 puede fusionarse con dos o más fracciones o dominios, tales como una etiqueta de afinidad para purificación y un dominio de reconocimiento. Las fusiones de polipéptidos también pueden comprender uno o más sitios de separación, en particular entre dominios. Véase, por ejemplo, Tuan et al., *Connective Tissue Research* 34:1 (1996).

35

[0192] Las proteínas de fusión pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia preparando cada componente de la proteína de fusión y conjugándolos químicamente. Como alternativa, se puede generar un polinucleótido que codifica ambos componentes de la proteína de fusión en el marco de lectura adecuado mediante técnicas conocidas y expresarse por los métodos descritos en la presente invención. Los métodos generales para la separación enzimática y química de las proteínas de fusión se han descrito, por ejemplo, por Ausubel (1995) en las páginas 16-19 a 16-25.

45

[0193] Los polipéptidos del Zcytor14 pueden utilizarse para identificar y aislar ligandos del Zcytor14. El dominio extracelular del Zcytor14 (por ejemplo, los residuos de aminoácidos 1 a 452 ó 21 a 452 de la SEC. ID. N.º 2) y otras formas de un receptor soluble del Zcytor14 resultan particularmente útiles para estos métodos. Por ejemplo, las proteínas y los péptidos de la presente invención pueden inmovilizarse en una columna y utilizarse para unirse a ligandos de una muestra biológica que se hace pasar por la columna (Hermanson et al. (eds.), *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, páginas 195-202 (Academic Press 1992)).

50

[0194] La actividad de un polipéptido del Zcytor14 puede observarse mediante un microfisiómetro biosensor con base de sílice, que mide la tasa de acidificación extracelular o la excreción de protones asociada con la unión a receptores y las respuestas fisiológicas celulares posteriores. Un ejemplo de dicho dispositivo es el microfisiómetro Cytosensor fabricado por Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Con este método es posible medir una serie de respuestas celulares, tales como la proliferación celular, transporte iónico, producción de energía, respuesta inflamatoria, activación de la regulación y de los receptores, y similares (véanse, por ejemplo, McConnell et al., *Science* 257:1906 (1992), Pitchford et al., *Meth. Enzymol.* 228:84 (1997), Arimilli et al., *J. Immunol. Meth.* 212:49 (1998), Van Liefde et al., *Eur. J. Pharmacol.* 346:87 (1998)). El microfisiómetro puede usarse para hacer analizar células eucariotas, procariotas, adherentes o no adherentes. Al medir los cambios de la acidificación extracelular en

55

60

los medios celulares en el tiempo, el microfisiómetro mide directamente las respuestas celulares a diversos estímulos, incluidos agonistas, ligandos o antagonistas del Zcytor14.

5 [0195] El microfisiómetro puede usarse para medir las respuestas de una célula eucariota que expresa el Zcytor14, en comparación con una célula eucariota de control que no expresa el polipéptido del Zcytor14. Las células adecuadas que responden a los estímulos moduladores del Zcytor14 incluyen las células huésped recombinantes que comprenden un vector de expresión del Zcytor14, y células que expresan de forma natural el Zcytor14. La acidificación extracelular proporciona una medida de una respuesta celular modulada por el Zcytor14. Además, este enfoque puede utilizarse para identificar ligandos, agonistas y antagonistas del ligando del Zcytor14. Por ejemplo, 10 puede identificarse una molécula como agonista del ligando del Zcytor14 proporcionando células que expresen un polipéptido del Zcytor14, cultivando una primera parte de las células en ausencia del compuesto de prueba, cultivando una segunda parte de las células en presencia del compuesto de prueba y determinando si la segunda parte muestra una respuesta celular en comparación con la primera parte.

15 [0196] Como alternativa, puede utilizarse un sistema de fase sólida para identificar un ligando del Zcytor14, o un agonista o antagonista de un ligando del Zcytor14. Por ejemplo, un polipéptido del Zcytor14 o una proteína de fusión del Zcytor14 pueden inmovilizarse sobre la superficie de un chip de receptores de un instrumento biosensor disponible comercialmente (BIACORE, Biacore AB; Uppsala, Suecia). El uso de este instrumento ha sido descrito, por ejemplo, por Karlsson, *Immunol. Methods* 145:229 (1991) y Cunningham y Wells, *J. Mol. Biol.* 234:554 (1993). 20

[0197] En resumen, un polipéptido o una proteína de fusión del Zcytor14 se unen de forma covalente, mediante química de aminas o sulfhidrilos, a fibras de dextrano que están unidas a una película de oro dentro de una celda de flujo. A continuación, se hace pasar una muestra de prueba por la celda. Si hay un ligando presente en la muestra, éste se unirá al polipéptido o proteína de fusión inmovilizados, causando un cambio en el índice de refracción del 25 medio, que es detectado como un cambio en la resonancia del plasmón de superficie de la película de oro. Este sistema permite la determinación de las fases de encendido y apagado, a partir de las cuales se puede calcular la afinidad de unión, y la evaluación de la estequiometría de unión. Este sistema también puede utilizarse para examinar las interacciones anticuerpo-antígeno y las interacciones de otros pares de complemento/anticomplemento. 30

[0198] Los dominios de unión del Zcytor14 pueden caracterizarse además mediante el análisis físico de la estructura, determinado por técnicas, tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de posibles aminoácidos de sitios de contacto de los agonistas de los ligandos del Zcytor14. Véanse, por ejemplo, de Vos et al., *Science* 255:306 (1992), Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899 (1992) y Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59 (1992). 35

[0199] La presente memoria también contempla composiciones del Zcytor14 químicamente modificadas en las cuales un polipéptido del Zcytor14 se une con un polímero. Los polipéptidos del Zcytor14 de ejemplo son polipéptidos solubles que carecen de un dominio transmembrana funcional. Habitualmente, el polímero es soluble en agua, de modo que el conjugado de Zcytor14 no precipita en un medio acuoso, tal como un medio fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es un polímero que ha sido modificado para tener un solo grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación, o un aldehído para alquilación. De esta manera, puede controlarse el grado de polimerización. Un ejemplo de un aldehído reactivo es propionaldehído de polietilenglicol, o sus derivados mono-(C1-C10) alcoxi, o ariloxi (véase, por ejemplo, Harris, et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.252.714). El polímero 45 puede ser ramificado o no ramificado. Además, puede utilizarse una mezcla de polímeros para producir conjugados del Zcytor14.

[0200] Los conjugados del Zcytor14 utilizados para tratamiento pueden comprender fracciones del polímero solubles en agua, farmacéuticamente aceptables. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), 50 monometoxi-PEG, mono-(C1-C10)alcoxi-PEG, ariloxi-PEG, poli-(N-vinil pirrolidona)PEG, tresil monometoxi PEG, propionaldehído de PEG, bis-succinimidil carbonato PEG, homopolímeros del propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxetilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, dextrano, celulosa u otros polímeros a base de carbohidratos. El PEG adecuado puede tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, incluidos, por ejemplo, 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un 55 conjugado del Zcytor14 también puede comprender una mezcla de dichos polímeros solubles en agua.

[0201] Un ejemplo de un conjugado del Zcytor14 comprende una fracción del Zcytor14 y una fracción de óxido de polialquilo unida al N terminal de la fracción del Zcytor14. El PEG es un óxido de polialquilo adecuado. A modo de ejemplo, el Zcytor14 puede modificarse con PEG, proceso conocido como "PEGilación". La PEGilación del Zcytor14 60 puede realizarse mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, EP 0 154 316, Delgado et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9:249 (1992), Duncan y Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* 27:290 (1994) y Francis et al., *Int J Hematol* 68:1 (1998)). Por ejemplo, la PEGilación se puede realizar mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de

polietilenglicol reactiva. En un enfoque alternativo, los conjugados del Zcytor14 se forman condensando PEG activado, en el cual un grupo hidroxilo o amino terminal del PEG ha sido reemplazado por un enlazador activado (véase, por ejemplo, Karasiewicz et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.382.657).

5 **[0202]** La PEGilación por acilación habitualmente requiere hacer reaccionar un derivado éster activo del PEG con un polipéptido del Zcytor14. Un ejemplo de un éster de PEG activado es el PEG esterificado a N-hidroxisuccinimida. Tal como se lo utiliza en la presente invención, el término "acilación" incluye los siguientes tipos de uniones entre el Zcytor14 y un polímero soluble en agua: amida, carbamato, uretano y similares. Los métodos para preparar el Zcytor14 PEGilado por acilación comprenderán habitualmente las etapas de (a) hacer reaccionar un polipéptido del Zcytor14 con PEG (tal como, un éster reactivo de un derivado aldehído del PEG) en condiciones en las cuales uno o más grupos PEG se unen al Zcytor14, y (b) obtener el producto o productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán en base a los parámetros conocidos y los resultados deseados. Por ejemplo, cuanto mayor sea la proporción de PEG:Zcytor14, mayor será el porcentaje de producto Zcytor14 poliPEGilado.

15 **[0203]** El producto de la PEGilación por acilación es habitualmente un producto Zcytor14 poliPEGilado donde los grupos ϵ -amino de la lisina se PEGilan a través de un grupo de enlace acilo. Un ejemplo de una unión de conexión es una amida. Habitualmente, el Zcytor14 resultante estará, como mínimo, un 95% mono-, di- o tri-pegilado, aunque pueden formarse algunas especies con mayores grados de PEGilación según las condiciones de la reacción. Las especies PEGiladas pueden separarse de los polipéptidos del Zcytor14 no conjugados por métodos de purificación estándar, tales como diálisis, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares.

20 **[0204]** La PEGilación por alquilación en general implica hacer reaccionar un derivado aldehído terminal del PEG con el Zcytor14 en presencia de un agente reductor. Preferiblemente, los grupos PEG están unidos al polipéptido a través de un grupo $-\text{CH}_2\text{-NH}$.

30 **[0205]** La derivatización mediante alquilación reductora para producir un producto monoPEGilado aprovecha la diferencia de reactividad entre distintos tipos de grupos amino primarios disponibles para la derivatización. Habitualmente, la reacción se lleva a cabo a un pH que permite aprovechar las diferencias de pKa entre los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y el grupo α -amino del residuo N terminal de la proteína. Mediante dicha derivatización selectiva se controla la unión de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo, tal como, un aldehído, a una proteína. La conjugación con el polímero se produce, de forma predominante, en el N terminal de la proteína, sin que se produzca una modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos aminos de la cadena lateral de lisina. La presente memoria proporciona un preparado sustancialmente homogéneo de conjugados de monopolímeros del Zcytor14.

40 **[0206]** La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de moléculas de conjugados de monopolímeros del Zcytor14 puede comprender las siguientes etapas: (a) hacer reaccionar un polipéptido del Zcytor14 con un PEG reactivo en condiciones de alquilación reductora, a un pH adecuado para permitir la modificación selectiva del grupo α -amino en el amino terminal del Zcytor14; y (b) obtener el producto o productos de reacción. El agente reductor utilizado para la alquilación reductora debe ser estable en solución acuosa y, preferiblemente, debe ser capaz de reducir únicamente la base de Schiff formada en el proceso inicial de alquilación reductora. Los agentes reductores preferidos incluyen borohidruro sódico, cianoborohidruro sódico, dimetilamino borano, trimetilamino borano y piridin borano.

50 **[0207]** Para una población sustancialmente homogénea de conjugados de monopolímeros del Zcytor14, las condiciones de la reacción de alquilación reductora son las que permiten la unión selectiva de la fracción del polímero soluble en agua al N terminal del Zcytor14. Dichas condiciones de reacción, en general, proporcionan las diferencias de pKa entre los grupos amino de la lisina y el grupo α -amino en el N terminal. El pH también afecta a la proporción de polímero con respecto a la proteína que se utilizará. En general, si el pH es más bajo, será deseable una mayor proporción de polímero con respecto a la proteína porque cuanto menos reactivo es el grupo α de N terminal, más polímero se necesita para lograr las condiciones óptimas. Si el pH es más elevado, no es necesario que la proporción polímero:Zcytor14 sea tan grande porque hay más grupos reactivos disponibles. Habitualmente, el pH está dentro del intervalo de 3 a 9 ó 3 a 6.

60 **[0208]** Otro factor a considerar es el peso molecular del polímero soluble en agua. En general, cuanto mayor es el peso molecular del polímero, menor es la cantidad de moléculas de polímero que pueden unirse a la proteína. Para las reacciones de PEGilación, el peso molecular habitual es de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa; de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa; o de aproximadamente 12 kDa a aproximadamente 25 kDa. La proporción molar de polímero soluble en agua a Zcytor14 se encontrará, en general, dentro del intervalo de 1:1 a 100:1. Habitualmente, la proporción molar de polímero soluble en agua con respecto a Zcytor14 será entre 1:1

y 20:1 para la poliPEGilación, y entre 1:1 y 5:1 para la monoPEGilación.

[0209] Los métodos generales para producir conjugados que comprenden un polipéptido y fracciones de polímero solubles en agua son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Karasiewicz et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.382.657, Greenwald et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.738.846, Nieforth et al., Clin. Pharmacol. Ther. 59:636 (1996), Monkarsch et al., Anal. Biochem. 247:434 (1997)).

[0210] La presente memoria contempla composiciones que comprenden un péptido o polipéptido descrito en la presente invención. Dichas composiciones pueden además comprender un vehículo. El vehículo puede ser un vehículo convencional orgánico o inorgánico. Los ejemplos de los vehículos incluyen agua, solución amortiguadora, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y similares.

8. Aislamiento de polipéptidos Zcytor14

[0211] Los polipéptidos pueden purificarse hasta una pureza de, como mínimo, aproximadamente el 80%; hasta una pureza de, como mínimo, aproximadamente el 90%; hasta una pureza de, como mínimo, aproximadamente el 95%; o hasta una pureza aún mayor del 95% con respecto a las macromoléculas contaminantes, en particular, otras proteínas y ácidos nucleicos, y libres de agentes infecciosos y pirogénicos. Los polipéptidos también pueden purificarse hasta un estado farmacéuticamente puro, que es una pureza mayor del 99,9%. En determinados preparados, un polipéptido purificado está libre sustancialmente de otros polipéptidos, en particular otros polipéptidos de origen animal.

[0212] Se pueden usar métodos de purificación por fraccionamiento y/o métodos de purificación convencionales para obtener preparados del Zcytor14 purificado a partir de fuentes naturales (por ejemplo, tejido de la próstata o la tiroides), polipéptidos sintéticos del Zcytor14, y polipéptidos recombinantes del Zcytor14 y polipéptidos de fusión del Zcytor14 purificados a partir de células huésped recombinantes. En general, pueden utilizarse la precipitación con sulfato de amonio y la extracción con ácido o iones caotrópicos para fraccionar las muestras. Los ejemplos de etapas de purificación pueden incluir hidroxipatita, exclusión por tamaño, cromatografía líquida de rápido rendimiento (FPLC) y cromatografía líquida de alto rendimiento con inversión de fases. Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices especiales y similares. Se prefieren los derivados de PEI, DEAE, QAE y Q. Los ejemplos de medios cromatográficos incluyen los medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como, Fenil-Sefarosa FF (Farmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octil-Sefarosa (Farmacia) y similares; o resinas poliacrílicas, tales como, Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas a base de sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa entrecruzada, perlas de poliestireno, resinas de poliacrilamida entrecruzada y similares, que son insolubles en las condiciones en las que se los utilizarán. Estos soportes pueden modificarse con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o fracciones de carbohidratos.

[0213] Los ejemplos de las químicas de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida y derivados carboxilo y amino para las químicas de acoplamiento con carbodiimidas. Estos y otros medios sólidos son bien conocidos y son utilizados ampliamente en la técnica y están disponibles en proveedores comerciales. La selección de un método en particular para el aislamiento y la purificación de los polipéptidos es una cuestión de diseño de rutina y está determinada, en parte, por las propiedades del soporte elegido. Véanse, por ejemplo, Affinity Chromatography: Principles & Methods (Farmacia LKB Biotechnology 1988) y Doonan, Protein Purification Protocols (The Humana Press 1996).

[0214] Los expertos en la materia podrán idear variantes adicionales en el aislamiento y la purificación del Zcytor14. Por ejemplo, los anticuerpos contra el Zcytor14 obtenidos según se describe más abajo, se pueden usar para aislar grandes cantidades de proteína mediante purificación por inmunofluorescencia.

[0215] Los polipéptidos también pueden aislarse por explotación de propiedades particulares. Por ejemplo, la cromatografía por adsorción a iones metálicos inmovilizados (IMAC) puede utilizarse para purificar proteínas ricas en histidina, incluidas las que comprenden etiquetas de polihistidina. En resumen, primero se carga un gel con iones metálicos divalentes para formar un quelado (Sulkowski, Trends in Biochem. 3:1 (1985)). Las proteínas ricas en histidina se adsorberán a esta matriz con diferentes afinidades, dependiendo del ión metálico utilizado, y serán eluidas por elución competitiva, reduciendo el pH o utilizando agentes quelantes fuertes. Otros métodos de purificación incluyen la purificación de proteínas glicosiladas por cromatografía de afinidad a la lectina y cromatografía de intercambio iónico (M. Deutscher, (ed.), Meth. Enzymol. 182:529 (1990)). Dentro de las realizaciones adicionales de la invención, puede construirse una fusión del polipéptido de interés y una etiqueta de afinidad (por ejemplo, proteína de unión a maltosa, un domino de inmunoglobulina) para facilitar la purificación.

[0216] También pueden prepararse polipéptidos del Zcytor14 o sus fragmentos mediante síntesis química, según se describió más arriba. Los polipéptidos del Zcytor14 pueden ser monómeros o multímeros, glicosilados o no glicosilados, PEGilados o no PEGilados y pueden o no incluir un residuo de aminoácido metionina inicial.

5 9. Producción de anticuerpos contra las proteínas de Zcytor14

[0217] Los anticuerpos contra el Zcytor14 pueden obtenerse, por ejemplo, usando el producto de un vector de expresión del Zcytor14 o Zcytor14 aislado de una fuente natural como un antígeno. Los anticuerpos contra el Zcytor14 particularmente útiles “se unen específicamente” al Zcytor14. Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si los anticuerpos muestran, como mínimo, una de las siguientes dos propiedades: (1) los anticuerpos se unen al Zcytor14 con un nivel umbral de actividad de unión, y (2) los anticuerpos no tienen reacciones cruzadas significativas con polipéptidos relacionados con el Zcytor14.

[0218] Con respecto a la primera característica, los anticuerpos se unen específicamente si se unen a un polipéptido, péptido o epítipo del Zcytor14, con una afinidad de unión (K_a) de $10^6 M^{-1}$ o mayor; preferentemente, $10^7 M^{-1}$ o mayor; más preferentemente, $10^8 M^{-1}$ o mayor; y muy preferentemente, $10^9 M^{-1}$ o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660 (1949)). Con respecto a la segunda característica, los anticuerpos no tienen reacciones cruzadas significativas con moléculas de polipéptidos relacionados, por ejemplo, si detectan el Zcytor14, pero no polipéptidos actualmente conocidos mediante un análisis de transferencia Western estándar. Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos incluyen a los receptores de citoquinas conocidos.

[0219] Los anticuerpos contra el Zcytor14 pueden producirse con péptidos y polipéptidos antigénicos portadores de epítopos del Zcytor14. Los péptidos y polipéptidos antigénicos portadores de epítopos descritos en la presente invención contienen una secuencia de, como mínimo, nueve, o entre 15 a aproximadamente 30 aminoácidos contenidos dentro de la SEC. ID. N.º 2 u otra secuencia de aminoácidos descrita en la presente invención. Sin embargo, los péptidos o polipéptidos que comprenden una parte mayor de una secuencia de aminoácidos de la presente invención, que contienen entre 30 y 50 aminoácidos, o que tiene cualquier longitud hasta, inclusive, la totalidad de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, también son útiles para inducir anticuerpos que se unen al Zcytor14. Resulta deseable que la secuencia de aminoácidos del péptido portador del epítipo se seleccione para proporcionar una solubilidad sustancial en disolventes acuosos (es decir, la secuencia incluye residuos relativamente hidrófilos, mientras que los residuos hidrófobos, preferentemente, se evitan). Además, las secuencias de aminoácidos que contienen residuos de prolina también pueden ser deseables para la producción de anticuerpos.

[0220] A modo de ejemplo, se identificaron posibles sitios antigénicos en el Zcytor14 utilizando el método de Jameson-Wolf, Jameson y Wolf, CABIOS 4:181, (1988), implementado por el programa PROTEAN (versión 3.14) de LASERGENE (DNASTAR; Madison, WI). En este análisis se usaron los parámetros predeterminados.

[0221] El método de Jameson-Wolf predice potenciales determinantes antigénicos combinando seis subrutinas principales para la predicción estructural de proteínas. En resumen, el método de Hopp-Woods, Hopp et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 78:3824 (1981), se utilizó en primer lugar para identificar secuencias de aminoácidos que representa las áreas con la mayor hidrofiliencia local (parámetro: siete residuos de promedio). En la segunda etapa, se utilizó el método de Emini, Emini et al., J. Virology 55:836 (1985), para calcular las probabilidades de superficie (parámetro: umbral de decisión de superficie (0,6) = 1). En tercer lugar, se utilizó el método de Karplus-Schultz, Karplus y Schultz, Naturwissenschaften 72:212 (1985), para predecir la flexibilidad de la cadena del esqueleto (parámetro: umbral de flexibilidad (0,2) = 1). En las etapas cuatro y cinco del análisis, se aplicaron predicciones de estructura secundaria a los datos utilizando los métodos de Chou-Fasman, Chou, “Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition”, en Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Fasman (ed.), páginas 549-586 (Plenum Press 1990) y de Garnier-Robson, Garnier et al., J. Mol. Biol. 120:97 (1978) (parámetros de Chou-Fasman: tabla de conformación = 64 proteínas; umbral de región α = 103; umbral de región β = 105; parámetros del Garnier-Robson: constantes de decisión α y β = 0). En la sexta subrutina, se combinaron los parámetros de flexibilidad y los factores de hidropatía/accesibilidad del disolvente para determinar un valor de contorno de superficie, designado como “índice antigénico”. Finalmente, se aplicó una función de ampliación del pico al índice antigénico, que amplía los principales picos de superficie sumando el 20, 40, 60 u 80% del valor del pico respectivo para representar la energía libre adicional derivada de la movilidad de las regiones de superficie en relación con las regiones interiores. Sin embargo, este cálculo no se aplicó a ningún pico principal que resida en una región helicoidal, ya que éstas tienden a ser menos flexibles.

[0222] Los resultados de este análisis indicaron que las siguientes secuencias de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2 proporcionarían péptidos antigénicos adecuados: aminoácidos 26 a 33 (“péptido antigénico 1”), aminoácidos 41 a 46 (“péptido antigénico 2”), 74 a 81 (“péptido antigénico 3”), aminoácidos 95 a 105 (“péptido antigénico 4”), aminoácidos 109 a 119 (“péptido antigénico 5”), aminoácidos 95 a 119 (“péptido antigénico 6”), aminoácidos 178 a 185 (“péptido

- antigénico 7”), aminoácidos 200 a 206 (“péptido antigénico 8”), aminoácidos 231 a 238 (“péptido antigénico 9”), aminoácidos 231 a 241 (“péptido antigénico 10”), aminoácidos 264 a 270 (“péptido antigénico 11”), aminoácidos 274 a 281 (“péptido antigénico 12”), aminoácidos 317 a 324 (“péptido antigénico 13”), aminoácidos 357 a 363 (“péptido antigénico 14”), aminoácidos 384 a 392 (“péptido antigénico 15”), aminoácidos 398 a 411 (“péptido antigénico 16”), aminoácidos 405 a 411 (“péptido antigénico 17”), aminoácidos 423 a 429 (“péptido antigénico 18”) y aminoácidos 434 a 439 (“péptido antigénico 19”). La presente memoria contempla el uso de cualquiera de los péptidos antigénicos 1 a 19 para generar anticuerpos contra el Zcytor14. La presente memoria también contempla polipéptidos que comprenden, como mínimo, uno de los péptidos antigénicos 1 a 19.
- 10 **[0223]** Los anticuerpos policlonales contra la proteína del Zcytor14 recombinante o contra el Zcytor14 aislado de fuentes naturales pueden prepararse utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la materia Véanse, por ejemplo, Green et al., “Production of Polyclonal Antisera”, en *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), páginas 1-5 (Humana Press 1992) y Williams et al., “Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies”, en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2.a edición, Glover et al. (eds.), página 15 (Oxford University Press 1995). La inmunogenicidad de un polipéptido del Zcytor14 puede aumentarse mediante el uso de un adyuvante, tal como el alum (hidróxido de aluminio) o el adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para la inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones del Zcytor14 o una parte de los mismos con un polipéptido de inmunoglobulina o con una proteína de unión a maltosa. El inmunógeno del polipéptido puede ser una molécula de longitud completa o una parte de la misma. Si la parte del polipéptido es de “tipo hapteno”, dicha parte puede unirse o ligarse ventajosamente a un vehículo macromolecular (tal como la hemocianina de lapa californiana (KLH), la albúmina de suero bovino (BSA) o el toxoide tetánico) para inmunización.
- 15 **[0224]** Aunque los anticuerpos policlonales habitualmente se desarrollan en animales, tales como, caballos, vacas, perros, pollos, ratas, ratones, conejos, cobayas, cabras u ovejas, un anticuerpo contra el Zcytor14 de la presente invención también puede derivarse de un anticuerpo de primate subhumano. Las técnicas generales para desarrollar anticuerpos diagnóstica y terapéuticamente útiles en babuinos pueden encontrarse, por ejemplo en Goldenberg et al., publicación de patente internacional N.º WO 91/11465 y en Losman et al., *Int. J. Cancer* 46:310 (1990).
- 20 **[0225]** Como alternativa, se pueden generar anticuerpos monoclonales contra el Zcytor14. Los anticuerpos monoclonales de roedores contra antígenos específicos pueden obtenerse por métodos conocidos por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), Coligan et al. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, vol. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) [“Coligan”], Picklesley et al., “Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*”, en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2.a edición, Glover et al. (eds.), página 93 (Oxford University Press 1995)).
- 30 **[0226]** En resumen, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse inyectando a ratones una composición que comprende un producto génico del Zcytor14, verificando la presencia de producción de anticuerpos extrayendo una muestra de suero, extirpando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando los clones positivos que producen anticuerpos contra el antígeno, cultivando los clones que producen anticuerpos contra el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de los hibridomas.
- 35 **[0227]** Además, un anticuerpo contra el Zcytor14 puede derivarse de un anticuerpo monoclonal humano. Los anticuerpos monoclonales humanos se obtienen de ratones transgénicos que han sido manipulados para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta al estímulo antigénico. En esta técnica, se introducen elementos del locus de cadena pesada y ligera humano en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones reconocidas de los locus endógenos de cadena pesada y de cadena ligera. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos y los ratones pueden usarse para producir hibridomas que segregan anticuerpos humanos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos de ratones transgénicos han sido descritos, por ejemplo, por Green et al., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg et al., *Nature* 368:856 (1994) y Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579 (1994).
- 40 **[0228]** Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y purificarse a partir de cultivos de hibridomas mediante una serie de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína A-Sefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico (véanse, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y las páginas 2.9.1-2.9.3; Baines et al., “Purification of Immunoglobulin G (IgG)”, en *Methods in Molecular Biology*, vol. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).
- 45 **[0229]** Para determinados usos, puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos contra el Zcytor14. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse, por ejemplo, por hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de los anticuerpos enteros por métodos convencionales. A modo de ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por separación enzimática de
- 50

- anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S que se indica como F(ab')₂. Este fragmento puede separarse nuevamente con un agente reductor de tioles para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. De manera opcional, la reacción de separación puede realizarse con un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que resultan de la separación de las uniones disulfuro. Como alternativa, una separación enzimática con pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, Patente de los EE. UU. N.º 4.331.647, Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89:230 (1960), Porter, Biochem. J. 73:119 (1959), Edelman et al., en *Methods in Enzymology* vol. 1, página 422 (Academic Press 1967) y por Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.
- 10 **[0230]** También pueden utilizarse otros métodos para separar anticuerpos, tales como la separación de las cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadenas ligeras-pesadas, separación posterior de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre y cuando los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.
- 15 **[0231]** Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de las cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, según se ha descrito en Ibar et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659 (1972). Como alternativa, las cadenas variables pueden estar unidas por una unión disulfuro intermolecular o entrecruzadas con compuestos químicos tales como el glutaraldehído (véase, por ejemplo, Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437 (1992)).
- 20 **[0232]** Los fragmentos Fv pueden comprender cadenas VH y VL, que están conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de una sola cadena (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que es posteriormente introducido en una célula huésped, tal como E. coli. Las células huésped recombinantes sintetizan una sola cadena del polipéptido con un péptido enlazador que forma un puente entre los dos dominios V. Los métodos para producir las scFv han sido descritos, por ejemplo, por Whitlow et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97 (1991) (véanse también, Bird et al., Science 242:423 (1988), Ladner et al., Patente de los EE. UU. N.º 4.946.778, Pack et al., Bio/Technology 11:1271 (1993) y Sandhu, supra).
- 25 **[0233]** A modo de ejemplo, puede obtenerse una scFV exponiendo linfocitos al polipéptido del Zcytor14 in vitro y seleccionando bibliotecas de expresión de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de una proteína o un péptido del Zcytor14 inmovilizados o marcados). Los genes que codifican polipéptidos que tienen potenciales dominios de unión al polipéptido del Zcytor14 pueden obtenerse cribando bibliotecas peptídicas aleatorias expresadas en fagos (expresión de fagos) o en bacterias, tales como E. coli. Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos pueden obtenerse de una serie de maneras, por ejemplo, a través de mutagénesis aleatoria y de síntesis aleatoria de polinucleótidos. Estas bibliotecas de expresión de péptidos aleatorios pueden usarse para cribar péptidos que interaccionan con una diana conocida que puede ser una proteína o un polipéptido, tal como un ligando o un receptor, una macromolécula biológica o sintética, o sustancias orgánicas o inorgánicas. Las técnicas para crear y cribar dichas bibliotecas de expresión de péptidos aleatorios son conocidas en la técnica (Ladner et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.223.409, Ladner et al., Patente de los EE. UU. N.º 4.946.778, Ladner et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.403.484, Ladner et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.571.698 y Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc. 1996)) y las bibliotecas de expresión de péptidos aleatorios y los kits para cribar dichas bibliotecas se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, de Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Las bibliotecas de expresión de péptidos aleatorios pueden cribarse con las secuencias del Zcytor14 descritas en la presente invención para identificar las proteínas que se unen al Zcytor14.
- 30 **[0234]** Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") pueden obtenerse construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable del ARN de células productoras de anticuerpos (véanse, por ejemplo, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106 (1991), Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), página 166 (Cambridge University Press 1995) y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al., (ed.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).
- 35 **[0235]** Como alternativa, un anticuerpo contra el Zcytor14 puede derivarse de un anticuerpo monoclonal "humanizado". Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo regiones determinantes de complementariedad de ratón de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano. A continuación, se sustituyen los residuos típicos de los anticuerpos humanos en las regiones armazón ("framework") de su homólogas murinas. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos

- monoclonales humanizados obvia los posibles problemas asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes murinas. Las técnicas generales para clonar los dominios variables de las inmunoglobulinas murinas han sido descritas, por ejemplo, por Orlandi et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:3833 (1989). Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados han sido descritas, por ejemplo, por Jones et al., Nature 321:522 (1986),
- 5 Carter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285 (1992), Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437 (1992), Singer et al., J. Immun. 150:2844 (1993), Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols (Humana Press, Inc. 1995), Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", en Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (eds.), páginas 399-434 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) y por Queen et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.693.762 (1997).
- 10 **[0236]** Se pueden preparar anticuerpos policlonales antiidiotipo inmunizando animales con anticuerpos o con fragmentos de anticuerpos contra el Zcytor14, utilizando técnicas estándar. Véase, por ejemplo, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera", en Methods In Molecular Biology: Immunochemical Protocols, Manson (ed.), páginas 1-12 (Humana Press 1992). Además, véase Coligan en las páginas 2.4.1-2.4.7. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos monoclonales antiidiotipo usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra el
- 15 Zcytor14 como inmunógenos, con las técnicas descritas más arriba. Como otra alternativa, pueden prepararse anticuerpos antiidiotipo humanizados o anticuerpos antiidiotipo de primate subhumano utilizando las técnicas descritas más arriba. Los métodos para producir anticuerpos antiidiotipo han sido descritos, por ejemplo, por Irie, Patente de los EE. UU. N.º 5.208.146, Greene, et. al., Patente de los EE. UU. N.º 5.637.677 y Varthakavi y Minocha, J. Gen. Virol. 77:1875 (1996).
- 20
10. Uso de secuencias de nucleótidos de Zcytor14 para detectar la expresión génica y la estructura génica
- [0237]** Pueden utilizarse moléculas de ácido nucleico para detectar la expresión de un gen *Zcytor14* en una muestra biológica. Determinadas moléculas sonda incluyen moléculas de ácido nucleico de doble cadena que comprenden la
- 25 secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1, la SEC. ID. N.º 4 o una parte de las mismas, así como moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla que tienen el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1, la SEC. ID. N.º 4 o una parte de las mismas. Las moléculas sonda pueden ser ADN, ARN, oligonucleótidos y similares. Tal como se lo usa en la presente invención, el término "parte" se refiere de, como mínimo, 8 hasta, como mínimo, 20 o más nucleótidos. Determinadas sondas se unen a regiones del gen *Zcytor14* que tienen una baja similitud de
- 30 secuencias con respecto a regiones comparables en otros genes de receptores de citoquinas.
- [0238]** En un ensayo básico, una molécula de sonda de cadena sencilla se incuba con ARN, aislado de una muestra biológica, en condiciones de temperatura y fuerza iónica que promueven el apareamiento de bases entre la sonda y la muestra de ARN del Zcytor14 diana. Después de separar la sonda no unida de las moléculas hibridadas, se
- 35 detecta la cantidad de híbridos.
- [0239]** Los métodos de hibridación para detección de ARN bien establecidos incluyen el análisis de transferencia northern y la hibridación por transferencia en puntos/ranuras (véanse, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 4-1 a 4-27 y Wu et al. (eds.), "Analysis of Gene Expression at the RNA Level", en Methods in Gene Biotechnology,
- 40 páginas 225-239 (CRC Press, Inc. 1997)). Las sondas de ácido nucleico pueden marcarse para que sean detectables con radioisótopos tales como ³²P o ³⁵S. Como alternativa, el ARN del Zcytor14 puede detectarse con un método de hibridación no radiactivo (véase, por ejemplo, Isaac (ed.), Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes (Humana Press, Inc. 1993)). Habitualmente, la detección no radiactiva se logra mediante la conversión enzimática de sustratos cromogénicos o quimioluminiscentes. Fracciones no radiactivas de ejemplo
- 45 incluyen biotina, fluoresceína y digoxigenina.
- [0240]** Las sondas de oligonucleótidos del Zcytor14 también son útiles para el diagnóstico in vivo. A modo de ejemplo, pueden administrarse oligonucleótidos marcados con ¹⁸F a un sujeto y pueden visualizarse por tomografía por emisión de positrones (Tavitian et al., Nature Medicine 4:467 (1998)).
- 50
- [0241]** Numerosos procedimientos de diagnóstico aprovechan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para aumentar la sensibilidad de los métodos de detección. Las técnicas estándar para realizar la PCR son bien conocidos (véanse, en general, Mathew (ed.), Protocols in Human Molecular Genetics (Humana Press, Inc. 1991), White (ed.), PCR Protocols: Current Methods and Applications (Humana Press, Inc. 1993), Cotter (ed.), Molecular
- 55 Diagnosis of Cancer (Humana Press, Inc. 1996), Hanausek y Walaszek (eds.), Tumor Marker Protocols (Humana Press, Inc. 1998), Lo (ed.), Clinical Applications of PCR (Humana Press, Inc. 1998) y Meltzer (ed.), PCR in Bioanalysis (Humana Press, Inc. 1998)).
- [0242]** Los cebadores para PCR pueden diseñarse para amplificar una parte del gen *Zcytor14* que tiene una baja
- 60 similitud de secuencias con respecto a una región comparable en otras proteínas, tales como otras proteínas receptoras de citoquinas.
- [0243]** Una variación de la PCR para ensayos de diagnóstico es la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR). En la

técnica de RT-PCR, se aísla el ARN de una muestra biológica, se realiza la transcripción inversa al ADNc, y el ADNc se incuba con cebadores del *Zcytor14* (véase, por ejemplo, Wu et al. (eds.), "Rapid Isolation of Specific cDNAs or Genes by PCR", en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 15-28 (CRC Press, Inc. 1997)). A continuación, se realiza la PCR y se analizan los productos con técnicas estándar.

5

[0244] A modo de ejemplo, se aísla el ARN de una muestra biológica utilizando, por ejemplo, el procedimiento de lisis celular con tiocianato de guanidinio descrito más arriba. Como alternativa, puede utilizarse una técnica de fase sólida para aislar el ARNm de un lisado celular. Puede cebarse una reacción de transcripción inversa con el ARN aislado mediante oligonucleótidos aleatorios, homopolímeros cortos de dT u oligómeros no codificantes del *Zcytor14*.

10 Los cebadores Oligo-dT ofrecen la ventaja de que las diversas secuencias de nucleótidos de ARNm que se amplifican pueden proporcionar secuencias diana de control. Las secuencias del *Zcytor14* son amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores oligonucleótidos flanqueantes que habitualmente tienen 20 bases de longitud.

15 **[0245]** Los productos de amplificación por PCR pueden detectarse mediante una serie de estrategias. Por ejemplo, los productos de la PCR se pueden fraccionar por electroforesis en gel y visualizar mediante tinción con bromuro de etidio. Como alternativa, los productos de la PCR fraccionados pueden transferirse a una membrana, hibridarse con una sonda del *Zcytor14* marcada para que sea detectable y examinarse por autorradiografía. Las estrategias alternativas adicionales incluyen el uso de trifosfatos de ácido desoxirribonucleico marcados con digoxigenina para
20 proporcionar la detección por quimioluminiscencia y el ensayo colorimétrico C-TRAK.

[0246] Otra estrategia para la detección de la expresión del *Zcytor14* es la tecnología de sondas cíclicas (CPT), en la cual un ADN de cadena sencilla diana se une con un exceso de sonda quimérica de ADN-ARN-ADN para formar un complejo, la parte del ARN se separa con ARNasa H y se detecta la presencia de la sonda quimérica separada
25 (véanse, por ejemplo, Beggs et al., *J. Clin. Microbiol.* 34:2985 (1996), Bekkaoui et al., *Biotechniques* 20:240 (1996)). Los métodos alternativos para la detección de secuencias del *Zcytor14* pueden utilizar estrategias, tales como la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico, la amplificación cooperativa de plantillas por hibridación cruzada y la reacción en cadena de la ligasa (véanse, por ejemplo, Marshall et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.686.272 (1997), Dyer et al., *J. Virol. Methods* 60:161 (1996), Ehrlich et al., *Eur. J. Biochem.* 243:358 (1997) y
30 Chadwick et al., *J. Virol. Methods* 70:59 (1998)). Los expertos en la materia conocen otros métodos estándar.

[0247] Las sondas y los cebadores del *Zcytor14* también pueden usarse para detectar y localizar la expresión del gen *Zcytor14* en muestras de tejido. Los métodos para dicha hibridación in situ son bien conocidos por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Choo (ed.), *In Situ Hybridization Protocols* (Humana Press, Inc. 1994), Wu et al.
35 (eds.), "Analysis of Cellular DNA or Abundance of mRNA by Radioactive In Situ Hybridization (RISH)", en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 259-278 (CRC Press, Inc. 1997) y Wu et al. (eds.), "Localization of DNA or Abundance of mRNA by Fluorescence In Situ Hybridization (RISH)", en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 279-289 (CRC Press, Inc. 1997)). Existen diversas estrategias de diagnóstico adicionales que son bien conocidas para los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc.
40 1991), Coleman y Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Humana Press, Inc. 1996) y Elles, *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (Humana Press, Inc., 1996)). Las muestras para pruebas adecuadas incluyen sangre, orina, saliva, biopsia de tejido y material de autopsia.

[0248] El gen *Zcytor14* reside en el cromosoma humano 3p25-3p24. Esta región está asociada con diversos
45 trastornos, incluidos xerodermia pigmentosa, trastorno del tejido conectivo de tipo Marfan, miocardiopatía, diabetes mellitus, anemia de Fanconi, carcinoma de células renales, síndrome de Marfan, síndrome de Von Hippel-Lindau y blefarofimosis. Además, las mutaciones de los receptores de citoquinas están asociadas con determinadas enfermedades. Por ejemplo, los polimorfismos de los receptores de citoquinas están asociados con la proteinosis alveolar pulmonar, la fiebre periódica hereditaria y la eritroleucemia. De este modo, pueden utilizarse secuencias de
50 nucleótidos del *Zcytor14* en pruebas basadas en las uniones para diversas enfermedades, y para determinar si los cromosomas de un sujeto contienen una mutación en el gen *Zcytor14*. Las aberraciones cromosómicas detectables en el locus del gen *Zcytor14* incluyen, pero sin limitación, aneuploidía, cambios en la cantidad de copias del gen, inserciones, eliminaciones, cambios en los sitios de restricción y reajustes. Resultan de particular interés las alteraciones genéticas que inactivan un gen *Zcytor14*.

55

[0249] Las aberraciones asociadas con el locus del *Zcytor14* pueden detectarse usando moléculas de ácido nucleico descritas en la presente invención utilizando técnicas de genética molecular, tales como análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, análisis de las repeticiones en tándem de tamaño corto con técnicas de PCR, análisis del sistema de mutaciones refractarias a la amplificación, detección de polimorfismo de la conformación de
60 cadena sencilla, métodos de separación por RNasa, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, análisis de faltas de coincidencia con fluorescencia y otras técnicas de análisis genético conocidas en el sector (véanse, por ejemplo, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), Marian, *Chest* 108:255 (1995), Coleman y Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Humana Press, Inc. 1996), Elles (ed.) *Molecular Diagnosis of*

Genetic Diseases (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), Laboratory Protocols for Mutation Detection (Oxford University Press 1996), Birren et al. (eds.), Genome Analysis, vol. 2: Detecting Genes (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998), Dracopoli et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons 1998) y Richards y Ward, "Molecular Diagnostic Testing", en Principles of Molecular Medicine, páginas 83-88 (Humana Press, Inc. 1998)).

[0250] La prueba de truncamiento de proteínas también es útil para detectar la inactivación de un gen en el cual las mutaciones terminadoras de la traducción producen solo partes de la proteína codificada (véase, por ejemplo, Stoppa-Lyonnet et al., Blood 91:3920 (1998)). Según esta estrategia, se aísla el ARN de una muestra biológica y se utiliza para sintetizar ADNc. A continuación, se utiliza la PCR para amplificar la secuencia diana del *Zcytor14* y para introducir un promotor de la ARN polimerasa, una secuencia de inicio de la traducción y un triplete ATG dentro del marco. Los productos de la PCR se transcriben utilizando una ARN polimerasa y los transcritos se traducen in vitro con un sistema de lisado de reticulocitos acoplados a T7. A continuación, los productos de la traducción se fraccionan por SDS-PAGE para determinar las longitudes de los productos de traducción. La prueba de truncamiento de proteínas ha sido descrita, por ejemplo, por Dracopoli et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, páginas 9.11.1-9.11.18 (John Wiley & Sons 1998).

[0251] La presente memoria también contempla kits para realizar un ensayo de diagnóstico de la expresión del gen *Zcytor14* o para detectar mutaciones en el gen *Zcytor14*. Dichos kits comprenden sondas de ácido nucleico, tales como moléculas de ácido nucleico de doble cadena que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 o la SEC. ID. N.º 4, o una parte de las mismas, así como moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla que tienen el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 o la SEC. ID. N.º 4, o una parte de las mismas. Las moléculas sonda pueden ser ADN, ARN, oligonucleótidos y similares. Los kits pueden comprender cebadores de ácido nucleico para realizar la PCR.

[0252] Dicho kit puede contener todos los elementos necesarios para realizar un ensayo de diagnóstico de ácido nucleico según se describió más arriba. Un kit comprenderá, como mínimo, un envase que comprende una sonda o cebador del *Zcytor14*. El kit también puede comprender un segundo envase que comprende uno o más reactivos capaces de indicar la presencia de secuencias del *Zcytor14*. Los ejemplos de dichos reactivos indicadores incluyen marcadores detectables, tales como marcadores radiactivos, fluorocromos, agentes quimioluminiscentes y similares. Un kit también puede comprender un medio para transmitir al usuario el hecho de que las sondas y los cebadores del *Zcytor14* se usan para detectar la expresión del gen *Zcytor14*. Por ejemplo, las instrucciones escritas pueden indicar que las moléculas de ácido nucleico incluidas pueden utilizarse para detectar una molécula de ácido nucleico que codifica el *Zcytor14* o una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica el *Zcytor14*. El material escrito puede aplicarse directamente a un envase o puede proporcionarse en forma de prospecto del envase.

11. Uso de anticuerpos contra *Zcytor14* para detectar *Zcytor14*

[0253] La presente memoria contempla el uso de anticuerpos contra el *Zcytor14* para cribar muestras biológicas in vitro para detectar la presencia del *Zcytor14*. En un tipo de ensayo in vitro, los anticuerpos contra el *Zcytor14* se utilizan en fase líquida. Por ejemplo, la presencia del *Zcytor14* en una muestra biológica puede analizarse mezclando la muestra biológica con una cantidad en trazas de *Zcytor14* marcado y un anticuerpo contra el *Zcytor14* en condiciones que promuevan la unión entre el *Zcytor14* y su anticuerpo. Los complejos de *Zcytor14* y anticuerpo contra el *Zcytor14* presentes en la muestra pueden separarse de la mezcla de reacción poniendo el complejo en contacto con una proteína inmovilizada que se une al anticuerpo, tal como un anticuerpo Fc o una proteína A de *Staphylococcus*. La concentración de *Zcytor14* en la muestra biológica será inversamente proporcional a la cantidad de *Zcytor14* marcado unido al anticuerpo y estará relacionada directamente con la cantidad de *Zcytor14* marcado libre. Las muestras biológicas de ejemplo incluyen sangre, orina, saliva, biopsia de tejido y material de autopsia.

[0254] Como alternativa, se pueden realizar ensayos in vitro en los cuales el anticuerpo contra el *Zcytor14* se une a un vehículo en fase sólida. Por ejemplo, el anticuerpo puede adherirse a un polímero, tal como el aminodextrano, con el fin de unir el anticuerpo a un soporte insoluble, tal como una perla, una placa o un tubo recubiertos con polímero. Otros ensayos in vitro adecuados resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

[0255] En otra estrategia, los anticuerpos contra el *Zcytor14* pueden utilizarse para detectar el *Zcytor14* en secciones de tejido preparados a partir de una muestra para biopsia. Dicha detección inmunológica puede utilizarse para determinar la abundancia relativa del *Zcytor14* y para determinar la distribución del *Zcytor14* en el tejido examinado. Las técnicas de inmunología generales están bien establecidas (véanse, por ejemplo, Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application", en Mammalian Development: A Practical Approach, Monk (ed.), páginas 115-38 (IRL Press 1987), Coligan en las páginas 5.8.1-5.8.8, Ausubel (1995) en las páginas 14.6.1 a 14.6.13 (Wiley Interscience 1990) y Manson (ed.), Methods In Molecular Biology, vol. 10: Immunochemical Protocols (The Humana Press, Inc. 1992)).

- [0256]** La detección inmunoquímica puede realizarse poniendo en contacto una muestra biológica con un anticuerpo contra el Zcytor14 y a continuación poniendo en contacto la muestra biológica con una molécula marcada para que sea detectable que se une al anticuerpo. Por ejemplo, la molécula marcada para que sea detectable puede comprender una fracción de anticuerpo que se une al anticuerpo contra el Zcytor14. Como alternativa, el anticuerpo contra el Zcytor14 puede conjugarse con avidina/estreptavidina (o biotina) y la molécula marcada para que sea detectable puede comprender la biotina (o avidina/estreptavidina). Existen numerosas variaciones de esta técnica básica que son bien conocidas por los expertos en la materia.
- [0257]** Como alternativa, se puede conjugar un anticuerpo contra el Zcytor14 con un marcador detectable para formar un inmunocombinado contra el Zcytor14. Los marcadores detectables adecuados incluyen, por ejemplo, un radioisótopo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente u oro coloidal. Los métodos para fabricar y detectar dichos inmunocombinados marcados para que sean detectables son bien conocidos para los expertos en la materia y se describen de manera más detallada más abajo.
- [0258]** El marcador detectable puede ser un radioisótopo que es detectado por autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para los objetivos de la presente invención son ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C .
- [0259]** Los inmunocombinados contra el Zcytor14 también pueden marcarse con un compuesto fluorescente. La presencia de un anticuerpo marcado con fluorescencia se determina exponiendo el inmunocombinado a una luz de la longitud de onda adecuada y detectando la fluorescencia resultante. Los compuestos para marcación fluorescente incluyen el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina, la ficocianina, la aloficocianina, el o-ftaldehído y la fluorescamina.
- [0260]** Como alternativa, los inmunocombinados contra el Zcytor14 pueden marcarse para que sean detectables acoplado un componente de anticuerpo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del inmunocombinado marcado con quimioluminiscencia se determina detectando la presencia de luminiscencia que surge en el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de los compuestos para marcación quimioluminiscente incluyen luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster de oxalato.
- [0261]** De manera similar, se puede utilizar un compuesto bioluminiscente para marcar inmunocombinados contra el Zcytor14 de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en los sistemas biológicos en los cuales una proteína catalítica aumenta la eficiencia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes que son útiles para el marcaje incluyen la luciferina, la luciferasa y la aequorina.
- [0262]** Como alternativa, los inmunocombinados contra el Zcytor14 pueden marcarse para que sean detectables uniendo un componente de anticuerpo contra el Zcytor14 a una enzima. Cuando se incubaba el conjugado de anticuerpo contra el Zcytor14 y la enzima en presencia del sustrato adecuado, la fracción enzimática reacciona con el sustrato para producir una fracción química que puede ser detectada, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Los ejemplos de las enzimas que se pueden usar para marcar inmunocombinados poliespecíficos para que sean detectables incluyen la β -galactosidasa, la glucosa oxidasa, la peroxidasa y la fosfatasa alcalina.
- [0263]** Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención. La unión de fracciones de marcadores a anticuerpos contra el Zcytor14 puede realizarse utilizando técnicas estándar conocidas en el sector. La metodología típica en este sentido ha sido descrita por Kennedy et al., *Clin. Chim. Acta* 70:1 (1976), Schurs et al., *Clin. Chim. Acta* 81:1 (1977), Shih et al., *Int'l J. Cancer* 46:1101 (1990), Stein et al., *Cancer Res.* 50:1330 (1990) y Coligan, *supra*.
- [0264]** Además, la conveniencia y versatilidad de la detección inmunoquímica puede potenciarse utilizando anticuerpos contra el Zcytor14 que hayan sido conjugados con avidina, estreptavidina y biotina (véanse, por ejemplo, Wilchek et al. (eds.), "Avidin-Biotin Technology", *Methods In Enzymology*, vol. 184 (Academic Press 1990) y Bayer et al., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology", en *Methods In Molecular Biology*, vol. 10, Manson (ed.), páginas 149-162 (The Humana Press, Inc. 1992).
- [0265]** Los métodos para realizar inmunoensayos están bien establecidos. Véanse, por ejemplo, Cook y Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays", en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application*, Ritter y Ladyman (eds.), páginas 180-208, (Cambridge University Press, 1995), Perry, "The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology", en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch y Lennox (eds.), páginas 107-120 (Wiley-Liss, Inc. 1995) y Diamandis, *Immunoassay*

(Academic Press, Inc. 1996).

[0266] La presente memoria también contempla kits para realizar un ensayo de diagnóstico inmunológico de la expresión del gen *Zcytor14*. Dichos kits comprenden, como mínimo, un envase que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra el *Zcytor14*. Un kit también puede comprender un segundo envase que comprende uno o más reactivos capaces de indicar la presencia de un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo contra el *Zcytor14*. Ejemplos de dichos reactivos indicadores incluyen marcadores detectables tales como un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente, oro coloidal y similares. Un kit también puede comprender un medio para transmitir al usuario el hecho de que los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos contra el *Zcytor14* se utilizan para detectar la proteína del *Zcytor14*. Por ejemplo, las instrucciones escritas pueden indicar que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo incluido puede utilizarse para detectar el *Zcytor14*. El material escrito puede aplicarse directamente a un envase o puede proporcionarse en forma de prospecto del envase.

15 12. Usos terapéuticos de polipéptidos que tienen actividad de *Zcytor14*

[0267] La presente memoria incluye el uso de proteínas, polipéptidos y péptidos que tienen actividad del *Zcytor14* (tales como los polipéptidos del *Zcytor14* (por ejemplo, formas solubles del *Zcytor14*), análogos del *Zcytor14* (por ejemplo, anticuerpos antiidiotipo contra el *Zcytor14*) y proteínas de fusión del *Zcytor14*) a un sujeto que carece de la cantidad adecuada de este polipéptido. En contraposición, los antagonistas del *Zcytor14* (por ejemplo, anticuerpos contra el *Zcytor14*) pueden utilizarse para tratar a un sujeto que produce un exceso de *Zcytor14*.

[0268] A modo de ejemplo, el *Zcytor14* tiene una secuencia de aminoácidos que comparte similitud con el receptor de la interleuquina-17 humana. Los estudios indican que la interleuquina-17 cumple una función fundamental en la iniciación o el mantenimiento de una respuesta inflamatoria (véase, por ejemplo, Jovanovic et al., *J. Immunol.* 160:3513 (1998)). Además, hay evidencia de que la interleuquina-17 activa la producción de mediadores inflamatorios por parte de los sinoviocitos y de que la interleuquina-17 contribuye al patrón proinflamatorio característico de la artritis reumatoide (Chabaud et al., *J. Immunol.* 161:409 (1998); Chabaud et al., *Arthritis Rheum.* 42:963 (1999)). Por consiguiente, los polipéptidos que tengan actividad del *Zcytor14* (por ejemplo, polipéptidos del *Zcytor14*, fragmentos funcionales del *Zcytor14* incluyendo un receptor soluble del *Zcytor14*, anticuerpos antiidiotipo contra el *Zcytor14*, etc.) pueden utilizarse para tratar la inflamación y afecciones tales como la artritis reumatoide, que están asociadas con la inflamación.

[0269] En general, la dosis del *Zcytor14* (o el análogo o la proteína de fusión del *Zcytor14*) administrada variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la estatura, el sexo, el estado clínico general y el historial clínico previo del paciente. Habitualmente, es deseable proporcionar al receptor una dosis del polipéptido del *Zcytor14* que se encuentra en el intervalo desde aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque se puede administrar una dosis menor o mayor según lo dicten las circunstancias.

[0270] La administración de un polipéptido del *Zcytor14* a un sujeto puede realizarse por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, por perfusión a través de un catéter regional o por inyección intralesional directa. Al administrar proteínas terapéuticas por inyección, la administración puede realizarse por infusión continua, por bolo único o por múltiples bolos.

[0271] Otras vías de administración adicionales incluyen la vía oral, las membranas mucosas, la pulmonar y la transcutánea. La administración oral es adecuada para las microesferas de poliéster, las microesferas de zein, las microesferas de proteinoide, las microesferas de policianoacrilato y los sistemas basados en lípidos (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins", en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 255- 288 (Plenum Press 1997)). La factibilidad de una administración intranasal es ejemplificada por dicho modo de administración para la insulina (véase, por ejemplo, Hinchcliffe y Illum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:199 (1999)). Las partículas secas o líquidas que comprenden el *Zcytor14* pueden prepararse e inhalarse con la ayuda de dispersores de polvo seco, generadores de aerosol líquido o nebulizadores (por ejemplo, Pettit y Gombotz, *TIBTECH* 16:343 (1998); Patton et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:235 (1999)). Esta estrategia se ejemplifica mediante el sistema AERX para el manejo de la diabetes, que es un inhalador electrónico de mano que administra insulina aerosolizada a los pulmones. Los estudios han demostrado que se han administrado proteínas de hasta 48.000 kDa a través de la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonidos de baja frecuencia, lo cual ilustra la factibilidad de la administración transcutánea (Mitragotri et al., *Science* 269:850 (1995)). La administración transdérmica mediante electroporación proporciona otro medio para administrar una molécula con actividad de unión al *Zcytor14* (Potts et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:213 (1997)).

[0272] Una composición farmacéutica que comprende una proteína, un polipéptido o un péptido con actividad de unión al *Zcytor14* puede formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por los cuales se combinan las proteínas terapéuticas en una mezcla con un vehículo

farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un “vehículo farmacéuticamente aceptable” si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19a edición (Mack Publishing Company 1995).

10 **[0273]** A los fines del tratamiento, las moléculas que tengan actividad de unión al Zcytor14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. Se dice que una combinación de una proteína, un polipéptido o un péptido que tengan actividad de unión al Zcytor14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administra en una “cantidad terapéuticamente efectiva” si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia tiene como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente utilizado para tratar la inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia la respuesta inflamatoria.

15 **[0274]** Una composición farmacéutica que comprende el Zcytor14 (o un análogo o una proteína de fusión del Zcytor14) puede suministrarse en forma líquida, de aerosol o sólida. Las formas líquidas se ejemplifican por soluciones inyectables y suspensiones orales. Los ejemplos de formas sólidas incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. Esta última forma se ejemplifica por las bombas miniosmóticas y los implantes (Bremer et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, “Implants in Drug Delivery”, en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer et al., “Protein Delivery with Infusion Pumps”, en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey et al., “Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant”, en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)).

25 **[0275]** Los liposomas proporcionan un medio para administrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto por vía intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea o por administración oral, por inhalación o por administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean los compartimientos acuosos (véanse, en general, Bakker-Woudenberg et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Supl. 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46:618 (1993) y Ranade, “Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers”, en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas son similares en su composición a las membranas celulares y, como resultado, los liposomas pueden administrarse en forma segura y son biodegradables. Dependiendo del método de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, pueden variar en cuanto a su tamaño, y los diámetros varían entre 0,02 μm y más de 10 μm . Existe una variedad de agentes que pueden ser encapsulados en liposomas: los agentes hidrófobos se separan en las bicapas y los agentes hidrófilos se separan dentro de el espacio o espacios acuosos interiores (véanse, por ejemplo, Machy et al., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987) y Ostro et al., *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576 (1989)). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño de los liposomas, el número de bicapas, la composición lipídica, así como la carga y las características de superficie de los liposomas.

40 **[0276]** Los liposomas pueden adsorberse a prácticamente cualquier tipo de célula y a continuación liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma absorbido puede ser sometido a endocitosis por las células que son fagocíticas. La endocitosis va seguida de la degradación intralisosomal de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados (Scherphof et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). Después de la administración intravenosa, los liposomas pequeños (de 0,1 a 1,0 μm) habitualmente son captados por las células del sistema reticuloendotelial, ubicadas principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas mayores de 3,0 μm se depositan en el pulmón. Esta captación preferencial de los liposomas más pequeños por parte de las células del sistema reticuloendotelial ha sido utilizada para administrar agentes quimioterápicos a los macrófagos y a tumores hepáticos.

50 **[0277]** El sistema reticuloendotelial puede evitarse por varios métodos, incluyendo la saturación con grandes dosis de partículas de liposomas, o mediante la inactivación selectiva de los macrófagos por medios farmacológicos (Claassen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 802:428 (1984)). Además, se ha demostrado que la incorporación de fosfolípidos derivatizados con glucolípidos o polietilenglicol en las membranas de los liposomas tiene como resultado una captación significativamente reducida por parte del sistema reticuloendotelial (Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

60 **[0278]** Los liposomas también pueden prepararse para reconocer determinadas células u órganos variando la composición fosfolipídica o insertando receptores o ligandos en los liposomas. Por ejemplo, se han utilizado liposomas preparados con un alto contenido de un tensoactivo no iónico para dirigirlos al hígado (Hayakawa et al., patente japonesa 04-244.018; Kato et al., *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja, α -tocoferol y aceite de ricino hidrogenado etoxilado (HCO-60) en metanol,

concentrando la mezcla al vacío y a continuación reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha observado que una formulación liposomal de dipalmitoifosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) reconocen el hígado (Shimizu et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:881 (1997)).

- 5 **[0279]** Como alternativa, pueden unirse diversos ligandos de reconocimiento a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, carbohidratos, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas pueden modificarse con derivados de galactosil lípido de tipo ramificado para reconocer receptores de asialoglucoproteínas (galactosa), que se expresan exclusivamente en la superficie de las células hepáticas (Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287 (1997); Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)).
- 10 De manera similar, Wu et al., *Hepatology* 27:772 (1998), han demostrado que marcar liposomas con asialofetina condujo a una vida media acortada en plasma de los liposomas y potenció enormemente la captación de los liposomas marcados con asialofetina por parte de los hepatocitos. Por otra parte, la acumulación hepática de liposomas que comprende derivados de galactosil lípido de tipo ramificado puede inhibirse por la inyección previa de asialofetina (Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Los liposomas de albúmina sérica humana
- 15 poliacetonilada proporcionan otra estrategia para dirigir los liposomas hacia las células hepáticas (Kamps et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:11681 (1997)). Además, Geho et al., Patente de los EE. UU. N.º 4.603.044, describen un sistema de administración mediante vesículas liposomales dirigidas a hepatocitos, que tiene especificidad para los receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.
- 20 **[0280]** En una estrategia más general con respecto al reconocimiento de tejidos, las células diana son marcadas previamente con anticuerpos biotinilados específicos para un ligando expresado por la célula diana (Harasym et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)). Después de la eliminación plasmática del anticuerpo libre, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otra estrategia, los anticuerpos de reconocimiento se unen directamente a los liposomas (Harasym et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)).
- 25 **[0281]** Los polipéptidos que tienen actividad de unión al Zcytor14 pueden encapsularse dentro de los liposomas utilizando técnicas estándar de microencapsulación de proteínas (véanse, por ejemplo, Anderson et al., *Infect. Immun.* 31:1099 (1981), Anderson et al., *Cancer Res.* 50:1853 (1990) y Cohen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95 (1991), Alving et al. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies", en *Liposome*
- 30 *Technology*, 2.ª edición, vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef et al., *Meth. Enzymol.* 149:124 (1987)). Tal como se indicó antes, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener una serie de componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).
- 35 **[0282]** Las microesferas de polímeros degradables han sido diseñadas para mantener altos niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables tales como el poli(láctido-co-glucólido) (PLG), polianhidridos, poli(ortoésteres), polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en los cuales las proteínas están atrapadas en el polímero (Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery", en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC
- 40 Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery", en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus et al., *Science* 281:1161 (1998); Putney y Burke, *Nature Biotechnology* 16:153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548 (1998)). Las nanoesferas recubiertas de polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para la administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:167
- 45 (1997)).
- [0283]** La presente memoria también contempla los polipéptidos modificados químicamente que tienen actividad de unión al Zcytor14 y antagonistas del Zcytor14, en los cuales un polipéptido está unido a un polímero, tal como se describió más arriba.
- 50 **[0284]** Los expertos en la materia pueden idear otras formas de dosificación, tal como se ha mostrado, por ejemplo, en Ansel y Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5ª edición (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª edición (Mack Publishing Company 1995) y Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).
- 55 **[0285]** A modo de ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse como un kit que comprende un envase que comprende un polipéptido con un dominio extracelular del Zcytor14 o un antagonista del Zcytor14 (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un polipéptido del Zcytor14). Los polipéptidos terapéuticos pueden proporcionarse en forma de una solución inyectable para una dosis única o para múltiples
- 60 dosis, o como un polvo estéril que será reconstituido antes de la inyección. Como alternativa, dicho kit puede incluir un dispersante de polvo seco, un generador de aerosol líquido o un nebulizador para la administración de un polipéptido terapéutico. Dicho kit puede además comprender información escrita sobre las indicaciones y el uso de la composición farmacéutica. Además, dicha información puede incluir una declaración de que la composición del

Zcytor14 está contraindicada para pacientes con hipersensibilidad al Zcytor14 conocida.

13. Usos terapéuticos de secuencias de nucleótidos de Zcytor14

- 5 **[0286]** La presente memoria incluye el uso de secuencias de nucleótidos del Zcytor14 para proporcionar Zcytor14 a un sujeto que tenga necesidad de recibir dicho tratamiento. Además, se puede proporcionar un vector de expresión terapéutico que inhibe la expresión del gen *Zcytor14*, tal como, una molécula no codificante, una ribozima o una molécula con una secuencia guía externa.
- 10 **[0287]** Existen numerosas estrategias para introducir un gen *Zcytor14* en un sujeto, incluyendo el uso de células huésped recombinantes que expresan el Zcytor14, la administración de un ácido nucleico desnudo que codifica el Zcytor14, el uso de un vehículo lipídico catiónico con una molécula de ácido nucleico que codifica el Zcytor14 y el uso de virus que expresan el Zcytor14, tal como, retrovirus recombinantes, virus adenoasociados recombinantes, adenovirus recombinantes y virus del herpes simplex recombinantes (véanse, por ejemplo, Mulligan, Science 260:926 (1993), Rosenberg et al., Science 242:1575 (1988), LaSalle et al., Science 259:988 (1993), Wolff et al., Science 247:1465 (1990), Breakfield y Deluca, The New Biologist 3:203 (1991)). En una estrategia ex vivo, por ejemplo, se aíslan células de un sujeto, se las transfecta con un vector que expresa el gen *Zcytor14* y se las trasplanta al sujeto.
- 15 **[0288]** A fin de llevar a cabo la expresión de un gen *Zcytor14*, se construye un vector de expresión en el cual se une operativamente una secuencia de nucleótidos que codifica un gen *Zcytor14* a un promotor central y, de manera opcional, un elemento regulador, para controlar la transcripción génica. Los requisitos generales de un vector de expresión se han descrito más arriba.
- 25 **[0289]** Como alternativa, se puede administrar un gen *Zcytor14* utilizando vectores virales recombinantes, incluyendo, por ejemplo, vectores adenovirales (por ejemplo, Kass-Eisler et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:11498 (1993), Kolls et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:215 (1994), Li et al., Hum. Gene Ther. 4:403 (1993), Vincent et al., Nat. Genet. 5:130 (1993) y Zabner et al., Cell 75:207 (1993)), vectores virales asociados a adenovirus (Flotte et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:10613 (1993)), alfavirus tales como el Virus Semliki Forest y el Virus Sindbis (Hertz y Huang, J. Vir. 66:857 (1992), Raju y Huang, J. Vir. 65:2501 (1991) y Xiong et al., Science 243:1188 (1989)), vectores del virus herpes (por ejemplo, Patentes de los EE. UU. N.º 4.769.331, 4.859.587, 5.288.641 y 5.328.688), vectores del parvovirus (Koering et al., Hum. Gene Therap. 5:457 (1994)), vectores de poxvirus (Ozaki et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 193:653 (1993), Panicali y Paoletti, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 79:4927 (1982)), poxvirus, tales como el virus de la viruela del canario o el virus vaccinia (Fisher-Hoch et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:317 (1989) y Flexner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86 (1989)) y retrovirus (por ejemplo, Baba et al., J. Neurosurg 79:729 (1993), Ram et al., Cancer Res. 53:83 (1993), Takamiya et al., J. Neurosci. Res 33:493 (1992), Vile y Hart, Cancer Res. 53:962 (1993), Vile y Hart, Cancer Res. 53:3860 (1993) y Anderson et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.399.346). Dentro de diversas realizaciones, ya sea el propio vector viral o una partícula viral que contiene el vector viral pueden utilizarse en los métodos y las composiciones descritos a continuación.
- 30 **[0290]** Como ejemplo de un sistema, el adenovirus, un virus con ADN de doble cadena, es un vector de transferencia génica que ha sido bien caracterizado para la administración de una molécula de ácido nucleico heterólogo (para consultar una revisión, véanse Becker et al., Meth. Cell Biol. 43:161 (1994); Douglas y Curiel, Science & Medicine 4:44 (1997)). El sistema de los adenovirus ofrece varias ventajas que incluyen: (i) la capacidad de acomodar insertos de ADN relativamente grandes, (ii) la capacidad de ser cultivado hasta alcanzar títulos altos, (iii) la capacidad de infectar una amplia gama de tipos de células de mamíferos y (iv) la capacidad de ser utilizado con muchos promotores diferentes, incluyendo los promotores omnipresentes, los específicos para tejidos y regulables. Además, los adenovirus pueden ser administrados por inyección intravenosa, porque los virus son estables en el torrente sanguíneo.
- 35 **[0291]** Usando vectores de adenovirus donde se ha eliminado partes del genoma del adenovirus, se incorporan insertos en el ADN viral por unión directa o por recombinación homóloga con un plásmido cotransfectado. En un sistema de ejemplo, se elimina el gen E1 esencial del vector viral, y el virus no se replicará a menos que el gen E1 sea provisto por la célula huésped. Cuando se administra por vía intravenosa a animales intactos, el adenovirus se dirige principalmente al hígado. Aunque el sistema de administración adenoviral con delección del gen E1 no puede replicarse en las células huésped, el tejido del huésped expresará y procesará una proteína heteróloga codificada. Las células huésped también secretarán la proteína heteróloga si el gen correspondiente incluye una secuencia señal de secreción. Las proteínas secretadas entrarán en la circulación desde el tejido que expresa el gen heterólogo (por ejemplo, el hígado muy vascularizado).
- 40 **[0292]** Además, los vectores adenovirales que contienen diversas eliminaciones de genes virales pueden utilizarse para reducir o eliminar las respuestas inmunitarias al vector. Dichos adenovirus tienen una delección en E1 y, además, contienen delecciones de E2A o E4 (Lusky et al., J. Virol. 72:2022 (1998); Raper et al., Human Gene

- Therapy 9:671 (1998)). También se ha descrito que la delección de E2b reduce las respuestas inmunitarias (Amalfitano et al., J. Virol. 72:926 (1998)). Al eliminar la totalidad del genoma del adenovirus, se pueden incorporar insertos muy grandes de ADN heterólogo. La generación de los llamados adenovirus "sin entrañas" o "gutless", en los cuales se ha realizado la delección de todos los genes virales, resulta particularmente ventajosa para la inserción de insertos grandes de ADN heterólogo (para consultar una revisión, véase Yeh. y Perricaudet, FASEB J. 11:615 (1997)).
- [0293]** Pueden obtenerse lotes de virus recombinantes de título elevado capaces de expresar un gen terapéutico a partir de células de mamíferos infectadas, mediante métodos estándar. Por ejemplo, puede prepararse el virus del herpes simplex recombinante en células Vero, según lo descrito por Brandt et al., J. Gen. Virol. 72:2043 (1991), Herold et al., J. Gen. Virol. 75:1211 (1994), Visalli y Brandt, Virology 185:419 (1991), Grau et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30:2474 (1989), Brandt et al., J. Virol. Meth. 36:209 (1992) y por Brown y MacLean (eds.), HSV Virus Protocols (Humana Press 1997).
- [0294]** Como alternativa, puede introducirse un vector de expresión que comprende un gen *Zcytor14* en las células de un sujeto por lipofección in vivo usando liposomas. Pueden utilizarse lípidos catiónicos sintéticos para preparar los liposomas para la transfección in vivo de un gen que codifica un marcador (Felgner et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:7413 (1987); Mackey et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:8027 (1988)). El uso de la lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos in vivo tiene determinadas ventajas prácticas. Los liposomas pueden usarse para dirigir la transfección a tipos de células específicos, lo cual resulta particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el tejido del páncreas, del hígado, del riñón y del cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas a los fines de reconocimiento. Los péptidos dirigidos (por ejemplo, las hormonas o los neurotransmisores), las proteínas, tales como, los anticuerpos, o las moléculas no peptídicas pueden acoplarse químicamente a los liposomas.
- [0295]** La electroporación es otro modo de administración alternativo. Por ejemplo, Aihara y Miyazaki, Nature Biotechnology 16:867 (1998), han demostrado el uso de la electroporación in vivo para la transferencia génica al músculo.
- [0296]** En una estrategia alternativa a la terapia génica, un gen terapéutico puede codificar un ARN no codificante del *Zcytor14* que inhibe la expresión del *Zcytor14*. Las secuencias adecuadas para las moléculas no codificantes pueden derivarse de las secuencias de nucleótidos del *Zcytor14* descritas en la presente invención.
- [0297]** Como alternativa, puede construirse un vector de expresión en el cual un elemento regulador está unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una ribozima. Las ribozimas pueden diseñarse para expresar actividad de endonucleasa que está dirigida a una determinada secuencia diana en una molécula de ARNm (véanse, por ejemplo, Draper y Macejak, Patente de los EE. UU. N.º 5.496.698, McSwiggen, Patente de los EE. UU. N.º 5.525.468, Chowrira y McSwiggen, Patente de los EE. UU. N.º 5.631.359 y Robertson y Goldberg, Patente de los EE. UU. N.º 5.225.337). En el contexto de la presente invención, las ribozimas incluyen secuencias de nucleótidos que se unen al ARNm del *Zcytor14*.
- [0298]** En otra estrategia, pueden construirse vectores de expresión en los cuales un elemento regulador dirige la producción de transcritos de ARN capaces de promover la separación mediada por la ARNasa P de moléculas de ARNm que codifican un gen *Zcytor14*. Según esta estrategia, puede construirse una secuencia guía externa para dirigir la ribozima endógena, ARNasa P, a una especie específica de ARNm intracelular, que es posteriormente separada por la ribozima celular (véanse, por ejemplo, Altman et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.168.053, Yuan et al., Science 263:1269 (1994), Pace et al., publicación internacional N.º WO 96/18733, George et al., publicación internacional N.º WO 96/21731 y Werner et al., publicación internacional N.º WO 97/33991). Preferentemente, la secuencia guía externa comprende una secuencia de diez a quince nucleótidos complementaria al ARNm del *Zcytor14*, y una secuencia de nucleótidos 3'-NCCA donde N es preferentemente una purina. Los transcritos de la secuencia guía externa se unen a la especie de ARNm a la cual están dirigidos mediante la formación de pares de bases entre el ARNm y las secuencias guía externas complementarias y, induciendo así la separación del ARNm por la ARNasa P en el nucleótido ubicado en el lado 5' de la región que tiene las bases apareadas.
- [0299]** En general, la dosificación de una composición que comprende un vector terapéutico que tiene una secuencia de nucleótidos del *Zcytor14*, tal como un virus recombinante, variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la estatura, el sexo, el estado clínico general y el historial clínico del paciente. Las vías de administración adecuadas de los vectores terapéuticos incluyen las siguientes: inyección intravenosa, inyección intraarterial, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, inyección intratumoral e inyección en una cavidad que contiene un tumor. A modo de ejemplo, Horton et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 96:1553 (1999), demostraron que una inyección intramuscular de ADN plasmídico que codifica interferón- α produce potentes efectos antitumorales en tumores primarios y metastásicos en un modelo murino.

[0300] Puede formularse una composición que comprende vectores virales, vectores no virales o una combinación de vectores virales y vectores no virales de la presente invención, según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por las cuales los vectores o virus se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se indicó antes, se dice que una composición, tal como una solución salina tamponada con fosfato, es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un sujeto receptor. Otros vehículos adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19a ed. (Mack Publishing Co. 1995) y Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 7a ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)).

[0301] Con fines terapéuticos, se administran un vector de expresión de un gen terapéutico, o un virus recombinante que comprende dicho vector, y un vehículo farmacéuticamente aceptable a un sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva. Se dice que una combinación de un vector de expresión (o virus) y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administra en una "cantidad terapéuticamente efectiva" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da lugar a un cambio detectable en la fisiología de un sujeto receptor. Por ejemplo, un agente utilizado para tratar la inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia la respuesta inflamatoria.

[0302] Cuando el sujeto tratado con un vector de expresión de un gen terapéutico o un virus recombinante es un ser humano, entonces el tratamiento es, preferentemente, una terapia génica con células somáticas. Es decir, el tratamiento preferido de un ser humano con un vector de expresión de un gen terapéutico o un virus recombinante no comprende introducir en células una molécula de ácido nucleico que pueda formar parte de una línea germinal humana y pueda transmitirse a generaciones sucesivas (es decir, terapia génica con línea germinal humana).

25 14. Producción de ratones transgénicos

[0303] Se pueden desarrollar por manipulación genética ratones transgénicos que sobreexpresan el gen *Zcytor14* en todos los tejidos o bajo el control de un elemento regulador específico para un tejido o preferido para un tejido. Estos sobreproductores de *Zcytor14* pueden usarse para caracterizar el fenotipo que resulta de la sobreexpresión, y los animales transgénicos pueden servir como modelos de enfermedades humanas causadas por un exceso de *Zcytor14*. Los ratones transgénicos que sobreexpresan el *Zcytor14* también proporcionan biorreactores modelos para la producción del *Zcytor14*; tales como, *Zcytor14* soluble, en la leche o la sangre de animales de mayor tamaño. Los métodos para producir ratones transgénicos son bien conocidos por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Jacob, "Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice", en *Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice*, Jacob (ed.), páginas 111-124 (Academic Press, Ltd. 1994), Monastorsky y Robl (eds.), *Strategies in Transgenic Animal Science* (ASM Press 1995) y Abbud y Nilson, "Recombinant Protein Expression in Transgenic Mice", en *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*, Fernández y Hoeffler (eds.), páginas 367-397 (Academic Press, Inc. 1999)).

[0304] Por ejemplo, un método para producir un ratón transgénico que exprese un gen *Zcytor14* puede comenzar con machos adultos fértiles (sementales) (B6C3f1, de 2 a 8 meses de edad (Taconic Farms, Germantown, NY)), machos vasectomizados (castrados) (B6D2f1, de 2 a 8 meses, (Taconic Farms)), hembras fértiles prepúberes (donantes) (B6C3f1, de 4 a 5 semanas, (Taconic Farms)) y hembras adultas fértiles (receptoras) (B6D2f1, de 2 a 4 meses, (Taconic Farms)). Las donantes se aclimatan durante una semana y a continuación son inyectadas con aproximadamente 8 UI/ratón de gonadotropina sérica de yegua preñada (Sigma Chemical Company; St. Louis, MO) I.P. y, entre 46 y 47 horas más tarde, con 8 UI/ratón de gonadotropina coriónica humana (hCG (Sigma)) I.P. para inducir la superovulación. Las donantes son apareadas con los sementales con posterioridad a las inyecciones de hormonas. En general, la ovulación se produce dentro de las 13 horas posteriores a la inyección de hCG. La copulación se confirma por la presencia de un tapón vaginal a la mañana siguiente del apareamiento.

[0305] Los óvulos fertilizados se recogen bajo microscopio quirúrgico. Se recogen los oviductos y los óvulos se depositan en portaobjetos para análisis de orina que contienen hialuronidasa (Sigma). Se lavan los óvulos una vez en hialuronidasa y dos veces en medio de Whitten W640 (descrito, por ejemplo, por Menino y O'Claray, *Biol. Reprod.* 77:159 (1986) y Dienhart y Downs, *Zygote* 4:129 (1996)) que ha sido incubado con 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, a 37°C. A continuación, se almacenan los óvulos en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ hasta la microinyección.

[0306] Se linealizan entre diez y veinte microgramos de ADN plasmídico que contiene una secuencia codificante del *Zcytor14*, se purifica en gel, y se resuspende en Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 0,25 mM (pH 8,0), a una concentración final de entre 5 y 10 nanogramos por microlitro para microinyección. Por ejemplo, las secuencias codificantes del *Zcytor14* pueden codificar un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos 21 a 452 de la SEC. ID. N.º 2.

[0307] Se microinyecta el ADN plasmídico en los óvulos recogidos contenidos en una gota de medio W640 cubierta con aceite mineral equilibrado con CO₂ tibio. A continuación, se extrae el ADN en una aguja para inyección (retirada de un tubo capilar de vidrio de borosilicato de 0,75 mm de D.I. y 1 mm de D.E.) y se inyecta en los óvulos individuales. Se penetra cada óvulo con la aguja para inyección, llegando a uno o ambos de los pronúcleos haploides.

[0308] Se inyectan picolitros de ADN en los pronúcleos, y se extrae la aguja para inyección sin entrar en contacto con los nucleolos. Se repite el procedimiento hasta que todos los óvulos hayan sido inyectados. Los óvulos correctamente microinyectados se transfieren a una placa de cultivo de tejido orgánico con medio W640 previamente gasificado para su almacenamiento durante la noche en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂.

[0309] Al día siguiente, los embriones de dos células se transfieren a las receptoras pseudopreñadas. Las receptoras se identifican por la presencia de los tapones copulatorio, después de haber copulado con los castrados vasectomizados. Las receptoras son anestesiadas y rasuradas en el flanco dorsal izquierdo y se transfieren a un microscopio quirúrgico. Se les realiza una pequeña incisión en la piel, atravesando la pared muscular, en el centro del área abdominal limitada por la caja torácica, la silla y la pata trasera, a media distancia entre la rodilla y el bazo. Se exteriorizan los órganos reproductores sobre un pequeño paño quirúrgico. Se estira la almohadilla adiposa sobre el paño quirúrgico y se sujeta una pinza para vasos pequeña (Roboz, Rockville, MD) a la almohadilla adiposa, que se deja colgando sobre el dorso del ratón, para impedir que los órganos se deslicen nuevamente hacia adentro.

[0310] Con una pipeta fina de transferencia que contenía aceite mineral seguido de burbujas aire alternando con W640, se transfieren al recipiente entre 12 y 17 embriones sanos de dos células de la inyección del día anterior. Se localiza la ampolla hinchada y se sostiene el oviducto entre la ampolla y la bolsa, para realizar un pequeño corte en el oviducto con una aguja de 28 g cerca de la bolsa, con cuidado para no desgarrar la ampolla ni la bolsa.

[0311] Se transfiere la pipeta al corte en el oviducto y se introducen los embriones soplando, permitiendo que la primera burbuja de aire escape de la pipeta. Se introduce suavemente la almohadilla adiposa en el peritoneo y se deja que los órganos reproductores se deslicen hacia adentro. Se cierra la pared peritoneal con un punto de sutura y se cierra la piel con un clip para heridas. Los ratones se recuperan en un calentador para portaobjetos a 37°C durante cuatro horas, como mínimo.

[0312] Las receptoras son devueltas a sus jaulas en pares y se deja que transcurran entre 19 y 21 días de gestación. Después del nacimiento, se deja que transcurran entre 19 y 21 días de periodo posparto antes del destete. Se determina el sexo de las crías y se las coloca en jaulas separadas por sexos y se les corta una muestra para biopsia de 0,5 cm de la cola (que se utiliza para genotipificación) con unas tijeras limpias.

[0313] Se prepara el ADN genómico a partir de los trozos de cola usando, por ejemplo, un kit DNEASY de QIAGEN, según las instrucciones del fabricante. Se analiza el ADN genómico por PCR usando cebadores diseñados para amplificar un gen *Zcytor14* o un gen marcador seleccionable que se introdujo en el mismo plásmido. Una vez que se confirma que los animales son transgénicos, se retrocruzan en una cepa endogámica colocando una hembra transgénica con un macho de tipo salvaje, o un macho transgénico con una o dos hembras de tipo salvaje. A medida que las crías nacen y son destetadas, se las separa por sexos y se les corta la cola para genotipificación.

[0314] Para verificar la expresión de un transgen en un animal vivo, se realiza una hepatectomía parcial. Se realiza la preparación quirúrgica del abdomen superior, directamente por debajo del proceso xifoides. Con una técnica estéril, se realiza una pequeña incisión de 1,5 a 2 cm debajo del esternón y se exterioriza el lóbulo lateral izquierdo del hígado. Se realiza una ligadura con seda 4-0 alrededor del lóbulo inferior para sujetarlo fuera de la cavidad corporal. Se utiliza una pinza atraumática para sujetar la ligadura mientras se coloca un segundo bucle de Dexon absorbible (American Cyanamid; Wayne, N.J.) en posición proximal a la primera ligadura. Se realiza un corte en posición distal a la ligadura de Dexon y se colocan aproximadamente 100 mg del tejido hepático extirpado en una placa de Petri esterilizada. Se transfiere el corte de hígado extirpado a un tubo de polipropileno con fondo redondo de 14 ml y se congela rápidamente en nitrógeno líquido y a continuación se almacena sobre hielo seco. Se cierra el sitio quirúrgico con suturas y clips para heridas y se coloca la jaula del animal en una placa de calentamiento a 37°C durante 24 horas después de la operación. Se controla al animal diariamente durante el posoperatorio y se retiran los clips para heridas aproximadamente entre 7 y 10 días después de la intervención. Se examina el nivel de expresión del ARNm del *Zcytor14* para cada ratón transgénico con un ensayo de hibridación de solución de ARN o mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

[0315] Además de producir ratones transgénicos que sobreexpresen el *Zcytor14*, resulta útil diseñar transgénicos con una expresión del gen anormalmente baja o sin expresión del gen. Dichos ratones transgénicos proporcionan modelos útiles de enfermedades asociadas con la falta del *Zcytor14*. Como se analizó más arriba, la expresión del gen *Zcytor14* puede inhibirse con genes no codificantes, genes de ribozima o genes de secuencia de guía externa. Para producir ratones transgénicos con subexpresión del gen *Zcytor14*, dichas secuencias inhibitorias se dirigen al

ARNm del *Zcytor14*. Los métodos para producir ratones transgénicos que tengan una expresión anormalmente baja de un gen en particular son conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Wu et al., "Gene Underexpression in Cultured Cells and Animals by Antisense DNA and RNA Strategies", en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 205-224 (CRC Press 1997)).

5

[0316] Una estrategia alternativa a la producción de ratones transgénicos que tengan muy poca o ninguna expresión del gen *Zcytor14* es generar ratones que tengan, como mínimo, un alelo normal del *Zcytor14* reemplazado por un gen *Zcytor14* no funcional. Un método para diseñar un gen *Zcytor14* no funcional consiste en insertar otro gen, tal como un gen marcador seleccionable, dentro de una molécula de ácido nucleico que codifica el *Zcytor14*. Los métodos estándar para producir los denominados ratones genomanipulados o "knockout" son conocidos por los técnicos en la materia (véanse, por ejemplo, Jacob, "Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice", en *Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice*, Jacob (ed.), páginas 111-124 (Academic Press, Ltd. 1994), y Wu et al., "New Strategies for Gene Knockout", en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 339-365 (CRC Press 1997)).

10

[0317] La presente invención, descrita de manera general, se comprenderá más fácilmente haciendo referencia al siguiente ejemplo, que se proporciona a título ilustrativo y no tiene por objeto constituir una limitación de la presente invención.

15

EJEMPLO 1

Expresión del gen *Zcytor14*

[0318] Se realizaron análisis northern con Transferencias de Tejidos Múltiples Humanos (Human Multiple Tissue Blots, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). Se generaron dos sondas a partir de productos de PCR purificados en gel. La primera sonda se elaboró usando ZC21798 (5' CGG CGT GGT GGT CTT GCT CTT 3'; SEC. ID. N.º 8) y ZC21808 (5' TCC CGT CCC CCG CCC CAG GTC 3'; SEC. ID. N.º 9) como cebadores. La sonda se marcó radiactivamente con el kit de marcaje Multiprime de Amersham (Arlington Heights, IL) según el protocolo del fabricante. Se purificó la sonda con una columna de empuje NucTrap (Stratagene, La Jolla, CA). Se usó una solución ExpressHyb(Clontech) para las soluciones de prehibridación e hibridación para las transferencias northern blot. La hibridación se realizó durante la noche a 65°C. Después de la hibridación se lavaron los "blots" durante 30 minutos cada uno en soluciones que contenían SDS al 0,1% y SSC de la siguiente manera: dos veces en 2xSSC a temperatura ambiente, tres veces en 0,1x SSC a 50°C, una vez en 0,1x SSC a 55°C y una vez en 0,1x SSC a 65°C. Los resultados demostraron que el gen *Zcytor14* se expresa fuertemente en los tejidos de la tiroides, la glándula suprarrenal, la próstata y el hígado, y se expresa en menor medida en los tejidos del corazón, el intestino delgado, el estómago y la tráquea. En cambio, existe escasa o nula expresión en el cerebro, la placenta, el pulmón, el músculo esquelético, el riñón, el páncreas, el bazo, el timo, los testículos, el ovario, el colon, los leucocitos de la sangre periférica, la médula espinal, los ganglios linfáticos y la médula ósea.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

[0319]

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> receptor de citoquina humana

45 <130> 99-50

<160> 12

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2255

50 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (154)...(2229)

55

aactaccag cacagcccc tccgccccct ctggaggctg aagagggatt ccagcccctg	60
ccaccacag acacgggctg actggggtgt ctgccccct tggggggggg cagcacaggg	120
cctcaggcct gggtgccacc tggcacctag aag atg cct gtg ccc tgg ttc ttg	174
Met Pro Val Pro Trp Phe Leu	
1 5	
ctg tcc ttg gca ctg ggc cga agc cca gtg gtc ctt tct ctg gag agg	222
Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro Val Val Leu Ser Leu Glu Arg	
10 15 20	
ctt gtg ggg cct cag gac gct acc cac tgc tct ccg ggc ctc tcc tgc	270
Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His Cys Ser Pro Gly Leu Ser Cys	
25 30 35	
cgc ctc tgg gac agt gac ata ctc tgc ctg cct ggg gac atc gtg cct	318
Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys Leu Pro Gly Asp Ile Val Pro	
40 45 50 55	
gct ccg ggc ccc gtg ctg gcg cct acg cac ctg cag aca gag ctg gtg	366
Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr His Leu Gln Thr Glu Leu Val	

			60				65				70					
ctg	agg	tgc	cag	aag	gag	acc	gac	tgt	gac	ctc	tgt	ctg	cgt	gtg	gct	414
Leu	Arg	Cys	Gln	Lys	Glu	Thr	Asp	Cys	Asp	Leu	Cys	Leu	Arg	Val	Ala	
			75				80				85					
gtc	cac	ttg	gcc	gtg	cat	ggg	cac	tgg	gaa	gag	cct	gaa	gat	gag	gaa	462
Val	His	Leu	Ala	Val	His	Gly	His	Trp	Glu	Glu	Pro	Glu	Asp	Glu	Glu	
			90				95				100					
aag	ttt	gga	gga	gca	gct	gac	tca	ggg	gtg	gag	gag	cct	agg	aat	gcc	510
Lys	Phe	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Ser	Gly	Val	Glu	Glu	Pro	Arg	Asn	Ala	
			105				110				115					
tct	ctc	cag	gcc	caa	gtc	gtg	ctc	tcc	ttc	cag	gcc	tac	cct	act	gcc	558
Ser	Leu	Gln	Ala	Gln	Val	Val	Leu	Ser	Phe	Gln	Ala	Tyr	Pro	Thr	Ala	
			120				125				130				135	
cgc	tgc	gtc	ctg	ctg	gag	gtg	caa	gtg	cct	gct	gcc	ctt	gtg	cag	ttt	606
Arg	Cys	Val	Leu	Leu	Glu	Val	Gln	Val	Pro	Ala	Ala	Leu	Val	Gln	Phe	
			140				145				150					
ggt	cag	tct	gtg	ggc	tct	gtg	gta	tat	gac	tgc	ttc	gag	gct	gcc	cta	654
Gly	Gln	Ser	Val	Gly	Ser	Val	Val	Tyr	Asp	Cys	Phe	Glu	Ala	Ala	Leu	
			155				160				165					
ggg	agt	gag	gta	cga	atc	tgg	tcc	tat	act	cag	ccc	agg	tac	gag	aag	702
Gly	Ser	Glu	Val	Arg	Ile	Trp	Ser	Tyr	Thr	Gln	Pro	Arg	Tyr	Glu	Lys	
			170				175				180					
gaa	ctc	aac	cac	aca	cag	cag	ctg	cct	gcc	ctg	ccc	tgg	ctc	aac	gtg	750
Glu	Leu	Asn	His	Thr	Gln	Gln	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Trp	Leu	Asn	Val	
			185				190				195					
tca	gca	gat	ggt	gac	aac	gtg	cat	ctg	gtt	ctg	aat	gtc	tct	gag	gag	798
Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Asn	Val	His	Leu	Val	Leu	Asn	Val	Ser	Glu	Glu	
			200				205				210				215	
cag	cac	ttc	ggc	ctc	tcc	ctg	tac	tgg	aat	cag	gtc	cag	ggc	ccc	cca	846
Gln	His	Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Tyr	Trp	Asn	Gln	Val	Gln	Gly	Pro	Pro	
			220				225				230					
aaa	ccc	cgg	tgg	cac	aaa	aac	ctg	act	gga	ccg	cag	atc	att	acc	ttg	894

Lys	Pro	Arg	Trp	His	Lys	Asn	Leu	Thr	Gly	Pro	Gln	Ile	Ile	Thr	Leu		
			235					240					245				
aac	cac	aca	gac	ctg	gtt	ccc	tgc	ctc	tgt	att	cag	gtg	tgg	cct	ctg		942
Asn	His	Thr	Asp	Leu	Val	Pro	Cys	Leu	Cys	Ile	Gln	Val	Trp	Pro	Leu		
		250					255					260					
gaa	cct	gac	tcc	gtt	agg	acg	aac	atc	tgc	ccc	ttc	agg	gag	gac	ccc		990
Glu	Pro	Asp	Ser	Val	Arg	Thr	Asn	Ile	Cys	Pro	Phe	Arg	Glu	Asp	Pro		
	265					270					275						
cgc	gca	cac	cag	aac	ctc	tgg	caa	gcc	gcc	cga	ctg	cga	ctg	ctg	acc		1038
Arg	Ala	His	Gln	Asn	Leu	Trp	Gln	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg	Leu	Leu	Thr		
280					285					290					295		
ctg	cag	agc	tgg	ctg	ctg	gac	gca	ccg	tgc	tcg	ctg	ccc	gca	gaa	gcg		1086
Leu	Gln	Ser	Trp	Leu	Leu	Asp	Ala	Pro	Cys	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	Ala		
			300						305					310			
gca	ctg	tgc	tgg	cgg	gct	ccg	ggc	ggg	gac	ccc	tgc	cag	cca	ctg	gtc		1134
Ala	Leu	Cys	Trp	Arg	Ala	Pro	Gly	Gly	Asp	Pro	Cys	Gln	Pro	Leu	Val		
			315					320					325				
cca	ccg	ctt	tcc	tgg	gag	aac	gtc	act	gtg	gac	aag	ggt	ctc	gag	ttc		1182
Pro	Pro	Leu	Ser	Trp	Glu	Asn	Val	Thr	Val	Asp	Lys	Val	Leu	Glu	Phe		
		330					335					340					
cca	ttg	ctg	aaa	ggc	cac	cct	aac	ctc	tgt	ggt	cag	gtg	aac	agc	tcg		1230
Pro	Leu	Leu	Lys	Gly	His	Pro	Asn	Leu	Cys	Val	Gln	Val	Asn	Ser	Ser		
	345					350					355						
gag	aag	ctg	cag	ctg	cag	gag	tgc	ttg	tgg	gct	gac	tcc	ctg	ggg	cct		1278
Glu	Lys	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Cys	Leu	Trp	Ala	Asp	Ser	Leu	Gly	Pro		
360					365				370					375			
ctc	aaa	gac	gat	gtg	cta	ctg	ttg	gag	aca	cga	ggc	ccc	cag	gac	aac		1326
Leu	Lys	Asp	Asp	Val	Leu	Leu	Leu	Glu	Thr	Arg	Gly	Pro	Gln	Asp	Asn		
				380					385					390			
aga	tcc	ctc	tgt	gcc	ttg	gaa	ccc	agt	ggc	tgt	act	tca	cta	ccc	agc		1374
Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Leu	Glu	Pro	Ser	Gly	Cys	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser		
			395				400						405				

aaa gcc tcc acg agg gca gct cgc ctt gga gag tac tta cta caa gac	1422
Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp	
410 415 420	
ctg cag tca ggc cag tgt ctg cag cta tgg gac gat gac ttg gga gcg	1470
Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala	
425 430 435	
cta tgg gcc tgc ccc atg gac aaa tac atc cac aag cgc tgg gcc ctc	1518
Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile His Lys Arg Trp Ala Leu	
440 445 450 455	
gtg tgg ctg gcc tgc cta ctc ttt gcc gct gcg ctt tcc ctc atc ctc	1566
Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu	
460 465 470	
ctt ctc aaa aag gat cac gcg aaa gcg gcc gcc agg ggc cgc gcg gct	1614
Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Ala Ala Ala Arg Gly Arg Ala Ala	
475 480 485	
ctg ctc ctc tac tca gcc gat gac tcg ggt ttc gag cgc ctg gtg ggc	1662
Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg Leu Val Gly	
490 495 500	
gcc ctg gcg tcg gcc ctg tgc cag ctg ccg ctg cgc gtg gcc gta gac	1710
Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg Val Ala Val Asp	
505 510 515	
ctg tgg agc cgt cgt gaa ctg agc gcg cag ggg ccc gtg gct tgg ttt	1758
Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val Ala Trp Phe	
520 525 530 535	
cac gcg cag cgg cgc cag acc ctg cag gag ggc ggc gtg gtg gtc ttg	1806
His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val Val Val Leu	
540 545 550	
ctc ttc tct ccc ggt gcg gtg gcg ctg tgc agc gag tgg cta cag gat	1854
Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu Trp Leu Gln Asp	
555 560 565	
ggg gtg tcc ggg ccc ggg gcg cac ggc ccg cac gac gcc ttc cgc gcc	1902
Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp Ala Phe Arg Ala	

570	575	580	
tcg ctc agc tgc gtg ctg ccc gac ttc ttg cag ggc cgg gcg ccc ggc			1950
Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly Arg Ala Pro Gly			
585	590	595	
agc tac gtg ggg gcc tgc ttc gac agg ctg ctc cac ccg gac gcc gta			1998
Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His Pro Asp Ala Val			
600	605	610	615
ccc gcc ctt ttc cgc acc gtg ccc gtc ttc aca ctg ccc tcc caa ctg			2046
Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu Pro Ser Gln Leu			
620	625	630	
cca gac ttc ctg ggg gcc ctg cag cag cct cgc gcc ccg cgt tcc ggg			2094
Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala Pro Arg Ser Gly			
635	640	645	
cgg ctc caa gag aga gcg gag caa gtg tcc cgg gcc ctt cag cca gcc			2142
Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala Leu Gln Pro Ala			
650	655	660	
ctg gat agc tac ttc cat ccc ccg ggg act ccc gcg ccg gga cgc ggg			2190
Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala Pro Gly Arg Gly			
665	670	675	
gtg gga cca ggg gcg gga cct ggg gcg ggg gac ggg act taaataaagg			2239
Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly Thr			
680	685	690	
cagacgctgt ttttct			2255

<400> 1
 <210> 2
 <211> 692
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 2

	Met	Pro	Val	Pro	Trp	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu	Gly	Arg	Ser	Pro
10	1				5					10						15
	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Glu	Arg	Leu	Val	Gly	Pro	Gln	Asp	Ala	Thr	His
15	.			20					25					30		

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

Trp Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu
 370 375 380
 Thr Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser
 385 390 395 400
 Gly Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu
 405 410 415
 Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu
 420 425 430
 Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr
 435 440 445
 Ile His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala
 450 455 460
 Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Ala
 465 470 475 480
 Ala Ala Arg Gly Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser
 485 490 495
 Gly Phe Glu Arg Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu
 500 505 510
 Pro Leu Arg Val Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala
 515 520 525
 Gln Gly Pro Val Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln
 530 535 540
 Glu Gly Gly Val Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu
 545 550 555 560
 Cys Ser Glu Trp Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly
 565 570 575
 Pro His Asp Ala Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe
 580 585 590
 Leu Gln Gly Arg Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg
 595 600 605
 Leu Leu His Pro Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val
 610 615 620
 Phe Thr Leu Pro Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln
 625 630 635 640
 Pro Arg Ala Pro Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val
 645 650 655
 Ser Arg Ala Leu Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly
 660 665 670
 Thr Pro Ala Pro Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala
 675 680 685

 Gly Asp Gly Thr
 690

- <210> 3
- <211> 2076
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Esta secuencia degenerada codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2.
- <221> variación
- <222> (1)...(2076)
- 10 <223> N es cualquier nucleótido
- <221> misc_feature
- <222> (1)...(2076)
- <223> n = A.T.C o G
- <400> 3

atgccngtnc	cntggttyt	nytnwsnytn	gcnytnngnm	gnwsnccngt	ngtnytnwsn	60
ytngarmgny	tngtngncc	ncargaygcn	acncaytgyw	scccnggnyt	nwsntgymgn	120
ytntgggayw	sngayathyt	ntggytnccn	ggngayathg	tcccngcnc	nggncngtn	180
ytngcncna	cncayytnc	racngarytn	gtnytnmgnt	gycaraarga	racngaytgy	240
gayytntgyy	tnmgngtngc	ngtncayyt	gcngtncayg	gncaytggga	rgarccngar	300
gaygargara	arttyggngg	ngcngcngay	wsngngtng	argarccnmg	naaygcnwsn	360
ytncargcnc	argtngtnyt	nwsnttycar	gcntayccna	cngcnmgntg	ygtnytnyt	420
gargtncarg	tcccngcngc	nytngtncar	ttyggncarw	sngtnggnws	ngtngtntay	480
gaytgyttyg	argcngcnyt	nggnwsngar	gtmgnatht	ggwsntayac	ncarccnmgn	540
taygaraarg	arytnaayca	yacncarcar	ytcccngcny	tcccntggyt	naaygtnwsn	600
gcngayggng	ayaaygtnc	yytngtnyt	aaaygtnwsng	argarcarca	ytyggnytn	660
wsnytntayt	ggaaycargt	ncarggnccn	ccnaarccnm	gntggcayaa	raayytnacn	720
ggccncara	thathacnyt	naaycayacn	gayytngtnc	cntggytntg	yathcargtn	780
tggccnytng	arccngayws	ngtnmgnacn	aayathtgyc	cnttymgnga	rgayccnmgn	840
gcncaycara	ayytntggca	rgcngcnmgn	ytmgnytny	tnacnytnc	rwsntggytn	900
ytngaygcnc	cntgywsnyt	nccngcngar	gcngcnytnt	gytggmgngc	nccngnggn	960
gayccntgyc	arccnytngt	nccnccnyt	wsntgggara	aygtnacngt	ngayaargtn	1020
ytngarttyc	cnytnytnaa	rggncayccn	aayytntgyg	tncargtnaa	ywsnwsngar	1080
aarytncary	tncargartg	yytntgggn	gaywsnytng	gnccnytnaa	rgaygaygt	1140
ytntytytng	aracnmggg	nccncargay	aaaymgnwsny	tntgygcnyt	ngarccnwsn	1200
ggntgyacnw	snytncnws	naargcnwsn	acnmngcng	cnmgnytngg	ngartayyt	1260
ytncargayy	tncarwsngg	ncartggytn	carytntggg	aygaygayt	nggngcnyt	1320
tgggcntgyc	cnatggayaa	rtayathcay	aarmgntggg	cnytngtntg	gytngcntgy	1380
ytntynttyg	cngcngcnyt	nwsnytntath	ytntyntna	araargayca	ygcnaargcn	1440

```

gcngcnmgng gnmngcngc nytnytnytn taywsngcng aygaywsngg nttygarmgn      1500
ytngtnggng cnytnngcws ngcnytnytn carytnccny tnmngngtngc ngtnngayytn      1560
tggwsnmgnm gngarytnws ngcncarggn ccngtngcnc ggtycaygc ncarmgnmgn      1620
caracnytnc argarggngg ngtnngtngtn ytnytnnttyw snccnggngc ngtnngcnytn      1680
tgywsngart ggytnarga yggngtnwsn ggncnggng cncayggnc ncaygaygc      1740
tymngncnw snytnwsntg ygtnytnccn gayttyytn arggnmgngc nccnggnwsn      1800
taygtnggng cntgyttyga ymgnytnytn cayccngayg cngtnccngc nytnttymgn      1860
acngtnccng tnttyacny nccnwsncar ytncngayt tyytnggngc nytncarcar      1920
ccnmngcnc cnmgngwsng nmgnytnear garmngcng arcargtnws nmngngcnytn      1980
carccngcny tngaywsnta ytycayccn ccnggnacnc cngcncngg nmngngngtn      2040
ggncnggng cnggnccng ngcngngay ggnacn      2076

```

<210> 4
 <211> 1753
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <220>
 <221> CDS
 <222> (2)...(1726)
 <400> 4

```

g gag gag cct agg aat gcc tct ctc cag gcc caa gtc gtg ctc tcc ttc      49
Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser Phe
  1             5             10             15

cag gcc tac cct act gcc cgc tgc gtc ctg ctg gag gtg caa gtg cct      97
Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val Pro
             20             25             30

gct gcc ctt gtg cag ttt ggt cag tct gtg ggc tct gtg gta tat gac      145
Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr Asp
             35             40             45

tgc ttc gag gct gcc cta ggg agt gag gta cga atc tgg tcc tat act      193
Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr Thr
             50             55             60

cag ccc agg tac gag aag gaa ctc aac cac aca cag cag ctg cct gcc      241
Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro Ala
             65             70             75             80

ctg ccc tgg ctc aac gtg tca gca gat ggt gac aac gtg cat ctg gtt      289

```


ggc ccc cag gac aac aga tcc ctc tgt gcc ttg gaa ccc agt ggc tgt Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser Gly Cys 260 265 270	817
act tca cta ccc agc aaa gcc tcc acg agg gca gct cgc ctt gga gag Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly Glu 275 280 285	865
tac tta cta caa gac ctg cag tca ggc cag tgt ctg cag cta tgg gac Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp Asp 290 295 300	913
gat gac ttg gga gcg cta tgg gcc tgc ccc atg gac aaa tac atc cac Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile His 305 310 315 320	961
aag cgc tgg gcc ctc gtg tgg ctg gcc tgc cta ctc ttt gcc gct gcg Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala Ala 325 330 335	1009
ctt tcc ctc atc ctc ctt ctc aaa aag gat cac gcg aaa ggg tgg ctg Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly Trp Leu 340 345 350	1057
agg ctc ttg aaa cag gac gtc cgc tcg ggg gcg gcc gcc agg ggc cgc Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg Gly Arg 355 360 365	1105
gcg gct ctg ctc ctc tac tca gcc gat gac tcg ggt ttc gag cgc ctg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg Leu 370 375 380	1153
gtg ggc gcc ctg gcg tcg gcc ctg tgc cag ctg ccg ctg cgc gtg gcc Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg Val Ala 385 390 395 400	1201
gta gac ctg tgg agc cgt cgt gaa ctg agc gcg cag ggg ccc gtg gct Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val Ala 405 410 415	1249
tgg ttt cac gcg cag cgg cgc cag acc ctg cag gag ggc ggc gtg gtg Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val Val	1297

	420		425		430														
gtc	ttg	ctc	ttc	tct	ccc	ggt	gcg	gtg	gcg	ctg	tgc	agc	gag	tgg	cta				1345
Val	Leu	Leu	Phe	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Ala	Leu	Cys	Ser	Glu	Trp	Leu				
	435						440					445							
cag	gat	ggg	gtg	tcc	ggg	ccc	ggg	gcg	cac	ggc	ccg	cac	gac	gcc	ttc				1393
Gln	Asp	Gly	Val	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	His	Gly	Pro	His	Asp	Ala	Phe				
	450					455					460								
cgc	gcc	tcg	ctc	agc	tgc	gtg	ctg	ccc	gac	ttc	ttg	cag	ggc	cgg	gcg				1441
Arg	Ala	Ser	Leu	Ser	Cys	Val	Leu	Pro	Asp	Phe	Leu	Gln	Gly	Arg	Ala				
	465				470					475					480				
ccc	ggc	agc	tac	gtg	ggg	gcc	tgc	ttc	gac	agg	ctg	ctc	cac	ccg	gac				1489
Pro	Gly	Ser	Tyr	Val	Gly	Ala	Cys	Phe	Asp	Arg	Leu	Leu	His	Pro	Asp				
			485					490						495					
gcc	gta	ccc	gcc	ctt	ttc	cgc	acc	gtg	ccc	gtc	ttc	aca	ctg	ccc	tcc				1537
Ala	Val	Pro	Ala	Leu	Phe	Arg	Thr	Val	Pro	Val	Phe	Thr	Leu	Pro	Ser				
			500					505					510						
caa	ctg	cca	gac	ttc	ctg	ggg	gcc	ctg	cag	cag	cct	cgc	gcc	ccg	cgt				1585
Gln	Leu	Pro	Asp	Phe	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Gln	Pro	Arg	Ala	Pro	Arg				
	515						520					525							
tcc	ggg	cgg	ctc	caa	gag	aga	gcg	gag	caa	gtg	tcc	cgg	gcc	ctt	cag				1633
Ser	Gly	Arg	Leu	Gln	Glu	Arg	Ala	Glu	Gln	Val	Ser	Arg	Ala	Leu	Gln				
	530					535				540									
cca	gcc	ctg	gat	agc	tac	ttc	cat	ccc	ccg	ggg	act	ccc	gcg	ccg	gga				1681
Pro	Ala	Leu	Asp	Ser	Tyr	Phe	His	Pro	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Pro	Gly				
	545				550					555					560				
cgc	ggg	gtg	gga	cca	ggg	gcg	gga	cct	ggg	gcg	ggg	gac	ggg	act					1726
Arg	Gly	Val	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr					
				565				570						575					
taaataaagg	cagacgctgt	ttttcta																	1753

<210>
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 5

Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser Phe
 1 5 10 15
 Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val Pro
 20 25 30
 Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr Asp
 35 40 45
 Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr Thr
 50 55 60
 Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro Ala
 65 70 75 80
 Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu Val
 85 90 95
 Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp Asn
 100 105 110
 Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr Gly
 115 120 125
 Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu Cys
 130 135 140
 Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile Cys
 145 150 155 160
 Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala Ala
 165 170 175
 Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro Cys
 180 185 190
 Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly Asp
 195 200 205
 Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr Val
 210 215 220
 Asp Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu Trp Ala
 225 230 235 240
 Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu Thr Arg
 245 250 255
 Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser Gly Cys
 260 265 270
 Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly Glu
 275 280 285
 Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp Asp
 290 295 300
 Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile His
 305 310 315 320

Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala Ala
 325 330 335
 Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly Trp Leu
 340 345 350
 Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg Gly Arg
 355 360 365
 Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg Leu
 370 375 380
 Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg Val Ala
 385 390 395 400
 Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val Ala
 405 410 415
 Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val Val
 420 425 430
 Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu Trp Leu
 435 440 445
 Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp Ala Phe
 450 455 460
 Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly Arg Ala
 465 470 475 480
 Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His Pro Asp
 485 490 495
 Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu Pro Ser
 500 505 510
 Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala Pro Arg
 515 520 525
 Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala Leu Gln
 530 535 540
 Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala Pro Gly
 545 550 555 560
 Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly Thr
 565 570 575

<210> 6
 <211> 1725
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Esta secuencia degenerada codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:5.
 <221> variación
 <222> (1)...(1725)
 <223> N es cualquier nucleótido.

10 <221> misc_feature
 <222> (1)...(1725)
 <223> n = A.T.C o G
 <400> 6

15	gargarccnm gnaaygcnws nytnccargcn cargtngtny tnwsnttyca rgcntayccn	60
	acngcnmgnt gygtnytnyt ngargtncar gtncngcng cnytngtnc rtyyggncar	120
	wsngtnggnw sngtngtnta ygaytygty gargcngcny tnggnwsnga rgtnmgnath	180
20	tggwsntaya cncarccnmg ntaygaraar garytnaayc ayacncarca rytncngcn	240
	ytncntggy tnaaygtnws ngcngaygn gayaaygtnc ayytngtnyt naaygtnwsn	300
	gargarcarc aytyggnyt nwsnytnay tggaycarg tncarggnc nccnaarccn	360
25	mgntggcaya araayytnac nggncncar athathacny tnaaycayac ngayytngt	420
	ccntgyytn gyathcargt ntggccnytn garccngayw sngtnmgnac naayathtgy	480
	ccnttymng argayccnmg ngcncaycar aaytntggc argcngcnmg nytnmgytn	540
30	ytnacnytn arwsntggyt nytnngaygn ccntgywsny tncngcnga rgcngcnytn	600
	tgytggmng cncngngng ngayccntgy carccnytn tncncnytn nwsntgggar	660
	aaygtnacng tngaygtnaa ywsnwsngar aarytncary tncargartg yytntgggn	720
35	gaywsnytn gnccnytnaa rgaygaygn ytnytnytn aracnmngg nccncargay	780
	aaymgnwsny tntgygnytn ngarccnwsn ggntgyacnw snytnccnws naargcnwsn	840
	acnmngcng cnmgytnng ngartaytn ytnccargay tncarwsngg ncartgyytn	900
	carytntggg aygayggyt nggngcnytn tgggcntgyc cnatggayaa rtayathcay	960
40	aarmgntggg cnytngtntg gytnccntgy ytnytnntyg cngcngcnytn nwsnytnath	1020
	ytnytnytna araargayca ygcnaarggn tggynmngny tnytnaarca rgaygtmgn	1080
	wsngngcng cngcnmngg nmngcngcn ytnytnytn aywsngcnga ygaywsnggn	1140
45	ttygarmngny tngtngngc nytnccnwsn gcnytnntgyc arytnccnytn nmngtngcn	1200
	gtngayytn ggwsnmngm ngarytnwsn gcncarggnc cngtngcntg gttycaygn	1260
	carmngmnc aracnytnca rgargnggn gtngtngtny tnytnntyws nccngngcn	1320
50	gtngcnytn gywsngartg gytnccargay ggngtnwsng gncngngnc ncayggncn	1380
	caygaycnt tymngcnws nytnwsntgy gtntncngc aytyytnca rgnmngcn	1440
	ccngnwsnt aygtngngc ntgytygay mgytnytn ayccngaygc ngtncngcn	1500
	ynttymgna cngtncngt nttyacnytn ccnwsncary tncngaytt yytngngcn	1560
55	ytnccarcarc cnmngcnc nmgnwsnggn mgytnccarg armngcnga rcargtnwsn	1620
	mngcnytn arccngcnytn ngaywsntay tycayccnc cngnacnc ngcncnggn	1680
	mngngngtng gnccngngc nggncnggn gcngngayg gnacn	1725

60 <210> 7
 <211> 16
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido enlazador.
 <400> 7

5

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

10 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 8

cgcggtggtg gtcttgctct t 21

20 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

25 <223> Cebador PCR
 <400> 9
 tcccgctccc cgccccaggt c 21

<210> 10
 <211> 688
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteína Zcytor14 quimérica.
 <400> 10

35

Met Pro Val Pro Trp Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro

40 1 5 10 15

Val Val Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His

45 20 25 30

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

 Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu Thr
 355 360 365

Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser Gly
 370 375 380
 Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly
 385 390 395 400
 Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp
 405 410 415
 Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile
 420 425 430
 His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala
 435 440 445
 Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly Trp
 450 455 460
 Leu Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg Gly
 465 470 475 480
 Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg
 485 490 495
 Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg Val
 500 505 510
 Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val
 515 520 525
 Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val
 530 535 540
 Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu Trp
 545 550 555 560
 Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp Ala
 565 570 575
 Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly Arg
 580 585 590
 Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His Pro
 595 600 605
 Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu Pro
 610 615 620
 Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala Pro
 625 630 635 640
 Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala Leu
 645 650 655
 Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala Pro
 660 665 670
 Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly Thr
 675 680 685

<210> 11
 <211> 705
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Proteína Zcytor14 quimérica.
 <400> 11

Met	Pro	Val	Pro	Trp	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu	Gly	Arg	Ser	Pro
1				5					10					15	
Val	Val	Leu	Ser	Leu	Glu	Arg	Leu	Val	Gly	Pro	Gln	Asp	Ala	Thr	His
			20					25					30		
Cys	Ser	Pro	Gly	Leu	Ser	Cys	Arg	Leu	Trp	Asp	Ser	Asp	Ile	Leu	Cys
		35					40					45			
Leu	Pro	Gly	Asp	Ile	Val	Pro	Ala	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Ala	Pro	Thr
	50					55					60				
His	Leu	Gln	Thr	Glu	Leu	Val	Leu	Arg	Cys	Gln	Lys	Glu	Thr	Asp	Cys
65					70					75				80	
Asp	Leu	Cys	Leu	Arg	Val	Ala	Val	His	Leu	Ala	Val	His	Gly	His	Trp
				85					90					95	
Glu	Glu	Pro	Glu	Asp	Glu	Glu	Lys	Phe	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Ser	Gly
			100					105					110		
Val	Glu	Glu	Pro	Arg	Asn	Ala	Ser	Leu	Gln	Ala	Gln	Val	Val	Leu	Ser
		115					120					125			
Phe	Gln	Ala	Tyr	Pro	Thr	Ala	Arg	Cys	Val	Leu	Leu	Glu	Val	Gln	Val
	130					135					140				
Pro	Ala	Ala	Leu	Val	Gln	Phe	Gly	Gln	Ser	Val	Gly	Ser	Val	Val	Tyr
145					150					155					160
Asp	Cys	Phe	Glu	Ala	Ala	Leu	Gly	Ser	Glu	Val	Arg	Ile	Trp	Ser	Tyr
				165					170					175	
Thr	Gln	Pro	Arg	Tyr	Glu	Lys	Glu	Leu	Asn	His	Thr	Gln	Gln	Leu	Pro
			180					185						190	
Ala	Leu	Pro	Trp	Leu	Asn	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Asn	Val	His	Leu
		195					200					205			
Val	Leu	Asn	Val	Ser	Glu	Glu	Gln	His	Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Tyr	Trp
	210					215					220				
Asn	Gln	Val	Gln	Gly	Pro	Pro	Lys	Pro	Arg	Trp	His	Lys	Asn	Leu	Thr
225					230					235				240	
Gly	Pro	Gln	Ile	Ile	Thr	Leu	Asn	His	Thr	Asp	Leu	Val	Pro	Cys	Leu
				245					250					255	
Cys	Ile	Gln	Val	Trp	Pro	Leu	Glu	Pro	Asp	Ser	Val	Arg	Thr	Asn	Ile
			260					265					270		
Cys	Pro	Phe	Arg	Glu	Asp	Pro	Arg	Ala	His	Gln	Asn	Leu	Trp	Gln	Ala
		275					280					285			

Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro
 290 295 300
 Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly
 305 310 315 320
 Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr
 325 330 335
 Val Asp Lys Val Leu Glu Phe Pro Leu Lys Gly His Pro Asn Leu
 340 345 350
 Cys Val Gln Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu
 355 360 365
 Trp Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu
 370 375 380
 Thr Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser
 385 390 395 400
 Gly Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu
 405 410 415
 Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu
 420 425 430
 Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr
 435 440 445
 Ile His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala
 450 455 460
 Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly
 465 470 475 480
 Trp Leu Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg
 485 490 495
 Gly Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu
 500 505 510
 Arg Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg
 515 520 525
 Val Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro
 530 535 540
 Val Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly
 545 550 555 560
 Val Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu
 565 570 575
 Trp Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp
 580 585 590
 Ala Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly
 595 600 605
 Arg Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His
 610 615 620

5 Pro Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu
 625 630 635 640
 Pro Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala
 645 650 655
 10 Pro Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala
 660 665 670
 Leu Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala
 675 680 685
 15 Pro Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly
 690 695 700
 20 Thr
 705

25 <210> 12
 <211> 675
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Proteína Zcytor14 quimérica.
 <400> 12

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

Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr
 165 170 175
 Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro
 180 185 190
 Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu
 195 200 205
 Val Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp
 210 215 220
 Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr
 225 230 235 240
 Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu
 245 250 255
 Cys Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile
 260 265 270
 Cys Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala
 275 280 285
 Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro
 290 295 300
 Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly
 305 310 315 320
 Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr
 325 330 335
 Val Asp Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Gln Cys Leu Trp
 340 345 350
 Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu Thr
 355 360 365
 Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser Gly
 370 375 380
 Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly
 385 390 395 400
 Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp
 405 410 415
 Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile
 420 425 430
 His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala
 435 440 445
 Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Ala Ala
 450 455 460
 Ala Arg Gly Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly
 465 470 475 480
 Phe Glu Arg Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro
 485 490 495

Leu Arg Val Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln
 500 505 510
 Gly Pro Val Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu
 515 520 525
 Gly Gly Val Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys
 530 535 540
 Ser Glu Trp Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro
 545 550 555 560
 His Asp Ala Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu
 565 570 575
 Gln Gly Arg Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu
 580 585 590
 Leu His Pro Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe
 595 600 605
 Thr Leu Pro Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro
 610 615 620
 Arg Ala Pro Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser
 625 630 635 640
 Arg Ala Leu Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr
 645 650 655
 Pro Ala Pro Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly
 660 665 670
 Asp Gly Thr
 675

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido Zcytor14 soluble para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la inflamación; en el que dicho polipéptido soluble comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica como
5 mínimo un 70% con los residuos de aminoácidos 21-452 de la SEC ID NO:2.
2. Uso según la reivindicación 1, para el tratamiento de la artritis reumatoide.
3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el polipéptido soluble comprende una secuencia de aminoácidos que
10 es idéntica como mínimo un 80% o idéntica como mínimo un 90% con los residuos de aminoácidos 21-452 de la SEC ID NO: 2.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polipéptido soluble comprende los residuos de aminoácidos 21 a 452 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:2.
15
5. Uso según la reivindicación 4, en el que el polipéptido soluble consiste en los residuos de aminoácidos 21 a 452 de la SEC ID NO:2.
6. Uso según la reivindicación 4, en el que dicho polipéptido soluble comprende además una fracción de
20 inmunoglobulina.