

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 188**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10168189 .8**
96 Fecha de presentación: **21.01.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **2230299**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2010**

54 Título: **Nuevo ligando de citocina ZCYTOR17**

30 Prioridad:
18.01.2002 US 350325 P
25.04.2002 US 375323 P
19.12.2002 US 435315 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.03.2012

73 Titular/es:
ZYMOGENETICS, INC.
1201 EASTLAKE AVENUE EAST
SEATTLE, WASHINGTON 98102, US

72 Inventor/es:
Sprecher, Cindy A.;
Kuijper, Joseph L.;
Dasovich, Maria M.;
Grant, Francis J.;
Hammond, Angela K.;
Gross, Jane A.;
Dillon, Stacey R. y
Kuestner, Rolf

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 377 188 T3

DESCRIPCIÓN

Nuevo ligando de citocina ZCYTOR17

Antecedentes de la invención

5 La proliferación y diferenciación de células de organismos pluricelulares la controlan hormonas y factores de crecimiento polipeptídicos. Estas moléculas difundibles permiten que las células se comuniquen entre sí y actúen de forma coordinada para formar células, tejidos y órganos, y para reparar tejidos dañados. Los ejemplos de hormonas y factores de crecimiento incluyen las hormonas esteroideas (por ejemplo estrógenos, testosterona), las hormonas paratiroides, las hormonas estimuladoras del folículo, las interleucinas, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), la eritropoyetina (EPO) y la calcitonina.

10 Las hormonas y los factores de crecimiento influyen en el metabolismo celular por unión a receptores. Los receptores pueden ser proteínas de membrana integrales que se asocian a rutas de señalización dentro de la célula, tales como sistemas de segundo mensajero. Otras clases de receptores son moléculas solubles tales como los factores de transcripción.

15 Las citocinas generalmente estimulan la proliferación o diferenciación de células del linaje hematopoyético o participan en los mecanismos de respuesta inmune e inflamatoria del cuerpo. Son ejemplos de citocinas que afectan a la hematopoyesis eritropoyetina (EPO), que estimula el desarrollo de glóbulos rojos; trombopoyetina (TPO), que estimula el desarrollo de células en el linaje megacariocítico; y factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), que estimula el desarrollo de neutrófilos. Estas citocinas son útiles para restaurar los niveles normales de células sanguíneas en pacientes que padecen anemia, trombocitopenia y neutropenia o que reciban quimioterapia para un cáncer.

20 Las interleucinas son una familia de citocinas que median respuestas inmunológicas, incluyendo inflamación. Las interleucinas median diversas patologías inflamatorias. Son fundamentales para una respuesta inmune en los linfocitos T, que producen muchas citocinas e inmunidad adaptativa a los antígenos. Las citocinas producidas por los linfocitos T se han clasificado como de tipo 1 y de tipo 2 (Kelso, A. Immun. Cell Biol. 76:300-317, 1998). Las citocinas de tipo 1 incluyen IL-2, IFN- γ , LT- α y están implicadas en respuestas inflamatorias, inmunidad vírica, inmunidad de parásitos intracelulares y rechazo de aloinjertos. Las citocinas de tipo 2 incluyen IL4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y están implicadas en respuestas humorales, inmunidad a helmintos y respuestas alérgicas. Las citocinas compartidas entre el Tipo 1 y el Tipo 2 incluyen IL-3, GM-CSF y TNF- α . Hay algunos indicios que sugieren que las poblaciones de linfocitos T productores de Tipo 1 y de Tipo 2 preferentemente migran al interior de diferentes tipos de tejidos inflamados.

25 Los linfocitos T maduros pueden activarse, por ejemplo, por un antígeno u otro estímulo, para producir, por ejemplo, citocinas, moléculas de señalización bioquímicas o receptores que influyen adicionalmente sobre el destino de la población de linfocitos T.

35 Los linfocitos B pueden activarse a través de receptores presentes en su superficie celular incluyendo el receptor de linfocitos B y otras moléculas auxiliares para realizar funciones celulares auxiliares, tales como la producción de citocinas.

40 Los monocitos/macrófagos y linfocitos T pueden activarse por receptores en su superficie celular y desempeñar un papel fundamental en la respuesta inmune mediante la presentación del antígeno a linfocitos y también actúan como células auxiliares a los linfocitos mediante la secreción de numerosas citocinas.

45 Las células destructoras naturales (NK) tienen una célula progenitora común con los linfocitos T y los linfocitos B, y desempeñan un papel en la vigilancia inmune. Las células NK, que constituyen hasta el 15 % de los linfocitos sanguíneos, no expresan receptores de antígenos y por lo tanto no usan el reconocimiento del MHC como requisito para la unión a una célula diana. Las células NK están implicadas en el reconocimiento y destrucción de ciertas células tumorales y células infectadas por virus. *In vivo*, se cree que las células NK requieren activación, sin embargo, *in vitro*, se ha mostrado que las células NK destruyen algunos tipos de células tumorales sin activación.

50 DATABASE EMBL N° de Acceso AC048338 (16 de abril de 2000) proporciona 12 BAC RP211-512M8 de *Homo sapiens*. DATABASE EMBL N° de Acceso AK005939 (8 de febrero de 2001) proporciona ADNc de testículo de *Mus musculus* adulto, biblioteca enriquecida de longitud completa de RIKEN, clon: 1700013B14 producto: proteína hipotética, secuencia de inserción completa.

Las actividades *in vivo* demostradas de la familia de citocinas ilustran el enorme potencial clínico y la necesidad de otras citocinas, agonistas de citocinas y antagonistas de citocinas. Esta memoria descriptiva describe una nueva citocina que estimula células del linaje de células hematopoyéticas, así como composiciones y procedimientos relacionados.

55 La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una parte

de la SEC ID N°: 2, en el que dicha parte consiste en entre 30 y 100 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, y en el que dicha parte contiene aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: (a) restos de aminoácidos 54 a 59 de la SEC ID N°: 2; (b) restos de aminoácidos 129 a 134 de la SEC ID N°: 2; (c) restos de aminoácidos 53 a 58 de la SEC ID N°: 2; (d) restos de aminoácidos 35 a 40 de la SEC ID N°: 2; (e) restos de aminoácidos 33 a 38 de la SEC ID N°: 2; (f) restos de aminoácidos 114 a 119 de la SEC ID N°: 2; (g) restos de aminoácidos 101 a 105 de la SEC ID N°: 2; (h) restos de aminoácidos 126 a 131 de la SEC ID N°: 2; (i) restos de aminoácidos 113 a 118 de SEC ID N°: 2 y (j) restos de aminoácidos 158 a 162 de la SEC ID N°: 2. La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en los restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: (a) restos de aminoácidos 54 a 59 de la SEC ID N°: 2; (b) restos de aminoácidos 129 a 134 de la SEC ID N°: 2; (c) restos de aminoácidos 53 a 58 de la SEC ID N°: 2; (d) restos de aminoácidos 35 a 40 de la SEC ID N°: 2; (e) restos de aminoácidos 33 a 38 de la SEC ID N°: 2; (f) restos de aminoácidos 114 a 119 de la SEC ID N°: 2; (g) restos de aminoácidos 101 a 105 de la SEC ID N°: 2; (h) restos de aminoácidos 126 a 131 de la SEC ID N°: 2; (i) restos de aminoácidos 113 a 118 de SEC ID N°: 2 y (j) restos de aminoácidos 158 a 162 de SEC ID N°: 2.

La presente invención proporciona además un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en una parte de la SEC ID N°: 11, en el que dicha parte consiste en entre 30 y 100 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 11, y en el que dicha parte contiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) restos de aminoácidos 34 a 39 de la SEC ID N°: 11; (b) restos de aminoácidos 46 a 51 de la SEC ID N°: 11; (c) restos de aminoácidos 131 a 136 de la SEC ID N°: 11; (d) restos de aminoácidos 158 a 163 de la SEC ID N°: 11; y (e) restos de aminoácidos 157 a 162 de la SEC ID N°: 11. La presente invención proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en restos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste en: (a) restos de aminoácidos 34 a 39 de la SEC ID N°: 11; (b) restos de aminoácidos 46 a 51 de la SEC ID N°: 11; (c) restos de aminoácidos 131 a 136 de la SEC ID N°: 11; (d) restos de aminoácidos 158 a 163 de la SEC ID N°: 11; y (e) restos de aminoácidos 157 a 162 de la SEC ID N°: 11.

La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención como se ha definido anteriormente para su uso para reducir la inflamación inducida por un polipéptido, que comprende los restos de aminoácido 27 a 164 de la SEC ID N°: 2 o los restos de aminoácido 31 a 163 de la SEC ID N°: 11.

La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención como se ha definido anteriormente, para uso en el tratamiento de un mamífero aquejado de una enfermedad inflamatoria, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 27 a 164 de la SEC ID N°: 2 o los restos de aminoácido 31 a 163 de la SEC ID N°: 11.

La invención proporciona además un anticuerpo de la presente invención como se ha definido anteriormente para su uso en un procedimiento para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación, comprendiendo dicho procedimiento: (1) determinar el nivel de una molécula inflamatoria; (2) administrar dicho medicamento; (3) determinar un nivel posterior a la administración de la molécula inflamatoria; (4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (3), en el que una falta de aumento o una reducción en el nivel de la molécula inflamatoria indica supresión de una respuesta inflamatoria.

La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 27 a 164 de la SEC ID N°: 2 o un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 31 a 163 de la SEC ID N°: 11 en una muestra biológica, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, de la presente invención como se ha definido anteriormente, en el que el contacto se realiza en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la muestra biológica; y (b) detectar cualquiera del anticuerpo unido o fragmento de anticuerpo unido.

La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la inflamación en un paciente, que comprende: (a) incubar una muestra de tejido o muestra biológica de un paciente con un anticuerpo de la presente invención como se ha definido anteriormente en condiciones en las que el anticuerpo se une a su polipéptido complementario en el tejido o muestra biológica; (b) visualizar el anticuerpo unido al tejido o muestra biológica; y (c) comparar los niveles de anticuerpo unido al tejido o muestra biológica del paciente con un tejido o muestra biológica de control normal, en el que un aumento en el nivel de anticuerpo unido al tejido o la muestra biológica del paciente con respecto al tejido o muestra biológica de control normal indica inflamación en el paciente.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración de un alineamiento múltiple de zcytor171ig humano (SEC ID N°: 2) (zcytor17lig), zcytor17lig de ratón (SEC ID N°: 11) (mzcytor17lig), IL-3 de ratón (mIL-3) (SEC ID N°: 100) e IL-3 humana (hIL-3) (SEC ID N°: 102).

La Figura 2 es una ilustración de un alineamiento múltiple de zcytor17lig humano (SEC ID N°: 2) (zcytor17lig), y zcytor171ig de ratón (SEC ID N°: 11) (mzcytor17lig).

La Figura 3 es un gráfico de hidrofilia de Hopp/Woods de zcytor17lig humano (SEC ID N°: 2).

Descripción detallada de la invención

Antes de exponer la invención con detalle, puede ser útil para su comprensión definir los siguientes términos:

5 La expresión "marcador de afinidad" se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que puede unirse a un segundo polipéptido para permitir la purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para la unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, puede usarse cualquier péptido o proteína para la que se dispone de un anticuerpo u otro agente de unión específico como marcador de afinidad. Los marcadores de afinidad incluyen un tracto de polihistidina, proteína A (Nilsson y col., EMBO J. 4:1075, 1985; Nilsson y col., Methods Enzymol. 198:3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, 10 Gene67:31, 1988), marcador de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci.USA82:7952-4, 1985), sustancia P, péptido Flag™ (Hopp y col., Biotechnology 6:1204-10, 1988), péptido de unión a estreptavidina, u otro epítipo o dominio de unión antigénico. Véase, en general, Ford y col., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991. Se dispone de ADN que codifica marcadores de afinidad en proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

15 La expresión "variante alélica" se usa en el presente documento para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica se produce de forma natural mediante mutación, y puede dar como resultado un polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante alélica también se usa en el presente 20 documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

Las expresiones "amino-terminal" y "carboxi-terminal" se usan en el presente documento para indicar posiciones dentro de polipéptidos. Cuando lo permite el contexto, estas expresiones se usan con referencia a una secuencia o parte particular de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia situada en posición carboxi-terminal con respecto a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está 25 localizada próxima al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

La expresión "par complemento/anti-complemento" indica restos no idénticos que forman un par no asociado covalentemente, estable en condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par complemento/anti-complemento. Otros pares de complemento/anti-complemento 30 ejemplares incluyen pares de receptor/ligando, pares de anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótido con sentido/antisentido y similares. Cuando es deseable una disociación posterior del par de complemento/anti-complemento, el par de complemento/anticomplemento preferentemente tiene una afinidad de unión $<10^9 \text{ M}^{-1}$.

La expresión "complementos de una molécula de polinucleótido" indica una molécula de polinucleótido que tiene una secuencia de bases complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia. Por 35 ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria a 5' CCCGTGCAT 3'.

El término "contig" indica un polinucleótido que tiene un tramo contiguo de secuencia idéntica o complementaria a otro polinucleótido. Se dice que las secuencias contiguas se "solapan" en un tramo dado de la secuencia polinucleotídica en su totalidad o a lo largo de un tramo parcial del polinucleótido. Por ejemplo, son contigs 40 representativos de la secuencia polinucleotídica 5'-ATGCTTAGCTT-3', 5'-TAGCTTgagtct-3' y 3'-gtcgacTACCGA-5'.

La expresión "secuencia de nucleótidos degenerada" indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula de polinucleótido de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo resto 45 de aminoácido (es decir, cada uno de los tripletes GAU y GAC codifica Asp).

La expresión "vector de expresión" se usa para indicar una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés unido operativamente a segmentos adicionales que permiten su transcripción. Dichos segmentos adicionales incluyen secuencias promotoras y terminadoras, y también pueden 50 incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores de selección, un potenciador, una señal de poliadenilación, etc. Los vectores de expresión generalmente proceden de un ADN plasmídico vírico, o pueden contener elementos de ambos.

El término "aislado" cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido se ha retirado de su medio genético natural y por lo tanto carece de otras secuencias codificantes extrañas o indeseadas, y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas modificadas por ingeniería genética. Dichas 55 moléculas aisladas son las que se separan de su medio natural e incluyen clones de ADNc y genómicos. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención carecen de otros genes con los que están asociados normalmente, pero pueden incluir regiones no traducidas 5' y 3' naturales tales como promotores y terminadores. La

identificación de regiones asociadas será evidente para un experto en la materia (véase, por ejemplo Dynan y Tijan, Nature 316:774-78, 1985).

5 Un polipéptido o proteína “aislada” es un polipéptido o proteína que se encuentra en un estado distinto del que está en su medio nativo, tal como aparte de la sangre y un tejido animal. En una forma preferida, el polipéptido aislado carece sustancialmente de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal. Se prefiere proporcionar los polipéptidos en una forma altamente purificada, es decir, con una pureza mayor del 95 %, más preferentemente mayor del 99 %. Cuando se usa en este contexto, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas tales como dímeros o, como alternativa, formas glicosiladas o derivatizadas.

10 El término “neoplásico” cuando se refiere a células, indica una célula que experimenta una proliferación nueva y anómala, particularmente en un tejido en el que la proliferación está incontrolada y es progresiva, dando como resultado un neoplasma. Las células neoplásicas pueden ser malignas, es decir, invasivas y metastásicas o benignas.

15 La expresión “unido operativamente”, cuando se hace referencia a segmentos de ADN, indica que los segmentos se disponen de tal manera que funcionan de forma coordinada para los fines para los que están destinados, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y avanza a través del segmento codificante hasta el terminador.

El término “ortólogo” indica un polipéptido o proteína obtenida partir de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son los resultados de la especiación.

20 Los “parálogos” son proteínas distintas pero estructuralmente relacionadas fabricadas por un organismo. Se cree que los parálogos se producen por duplicación génica. Por ejemplo, la α -globina, β -globina y mioglobina son parálogos entre sí.

25 Un “polinucleótido” es un polímero mono o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse a partir de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviado como “pb”), nucleótidos (“nt”) o kilobases (“kb”). Cuando lo permite el contexto, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que son monocatenarios o bicatenarios. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias se usa para indicar la longitud total y se considerará equivalente a la expresión “pares de bases”. Los expertos en la materia reconocerán que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en longitud y que sus extremos pueden ser escalonados como resultado de la escisión enzimática; de esta manera, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido bicatenaria pueden no estar emparejados.

35 Un “polipéptido” es un polímero de restos de aminoácidos unidos con enlaces peptídicos, tanto si se ha producido de forma natural como si se ha producido de forma sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos se denominan comúnmente “péptidos”.

El término “promotor” se usa en el presente documento por su significado reconocido en la técnica para indicar una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que permiten la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Las secuencias promotoras comúnmente, pero no siempre, se encuentran en las regiones 5' no codificantes de los genes.

40 Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína por la célula en la que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en el presente documento en términos de sus estructuras del esqueleto de aminoácidos; los sustituyentes tales como grupos carbohidrato generalmente no se especifican, pero sin embargo pueden estar presentes.

45 El término “receptor” indica una proteína asociada a la célula que se une a una molécula bioactiva (es decir un ligando) y media el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura multi-peptídica que comprende un dominio de unión al ligando extracelular y un dominio efector intracelular que normalmente está implicado en la transducción de señales. La unión del ligando al receptor da como resultado un cambio conformacional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y la otra u otras moléculas presentes en la célula. Esta interacción, a su vez, conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los acontecimientos metabólicos que están asociados con las interacciones de receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana, pueden ser citosólicos o nucleares; monoméricos (por ejemplo, receptor de la hormona estimuladora del tiroides, 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).

La expresión "secuencia señal de secreción" indica una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido de secreción") que, como componente de un polipéptido de mayor tamaño, dirige el polipéptido de mayor tamaño a través de una ruta de secreción de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido de mayor tamaño comúnmente se escinde para retirar el péptido de secreción durante el tránsito a través de la ruta de secreción.

5 El término "variante de corte y empalme" se usa en el presente documento para indicar formas alternativas de ARN transcrito a partir de un gen. La variación de corte y empalme se produce naturalmente mediante el uso de sitios de corte y empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita, o menos comúnmente entre moléculas de ARN transcritas por separado, y puede dar como resultado varios ARNm transcritos a partir del mismo gen. Las variantes de corte y empalme pueden codificar polipéptidos que tienen

10 Los pesos moleculares y las longitudes de polímeros determinados por procedimientos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis en gel) deberán considerarse valores aproximados. Cuando dicho valor se expresa como "aproximadamente" X o "alrededor de" X, se entenderá que el valor indicado de X es exacto en $\pm 10\%$.

La presente memoria descriptiva describe el descubrimiento de una nueva secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene la estructura de una citocina de 4 haces helicoidales. Mediante procedimientos de clonación, y ensayos de proliferación descritos con detalle en el presente documento, se ha identificado una secuencia polinucleotídica que codifica un nuevo polipéptido ligando que es un ligando con alta especificidad por el receptor zcytor17 (SEC ID N°: 5) y al menos una subunidad adicional que comprende el receptor de OncostatinaM beta (OSMRbeta) (SEC ID N°: 7) y WSX-1 (SEC ID N°: 9). Este ligando polipeptídico, denominado zcytor17lig, se aisló a partir de una biblioteca de ADNc generada a partir de células de sangre periférica humana (hPBCs) activadas, que se seleccionaron por CD3. CD3 es un marcador de la superficie celular único para las células de origen linfóide, particularmente los linfocitos T.

En los ejemplos que se proporcionan a continuación, se usó una línea celular que es dependiente de la ruta asociada al receptor OSMRbeta y zcytor17 o dependiente de la ruta asociada al receptor OSMRbeta y WSX-1, y zcytor17 para la supervivencia y crecimiento en ausencia de otros factores de crecimiento, para seleccionar una fuente de ADNc que codifica el zcytor17lig. La línea celular dependiente de factor de crecimiento preferida que se usó para la transfección y expresión del receptor zcytor17 fue BaF3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot y col., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986). Sin embargo, son adecuadas para este fin otras líneas celulares dependientes de factores de crecimiento, tales como FDC-P1 (Hapel y col., Blood 64: 786-790, 1984), y MO7e (Kiss y col., Leukemia 7: 235-240, 1993).

La secuencia de aminoácidos para los receptores OSMR, WSX-1 y zcytor17 indicó que los receptores codificados pertenecían a la subfamilia de receptores de citocinas de Clase I que incluye, pero sin limitación, los receptores para IL-2, IL-4, IL-7, Lif, IL-12, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF y G-CSF (como revisión, véase Cosman, "The Hematopoietin Receptor Superfamily" en Cytokine 5(2): 95-106, 1993). El receptor zcytor17 se describe con detalle en la Solicitud de Patente PCT, comúnmente concedida, N° US01/20484 (publicación WIPO N° WO 02/00721), y WSX-1 se describe con detalle en la Patente de Estados Unidos N° 5.925.735. El análisis de la distribución tisular del ARNm del receptor zcytor17 reveló expresión en subseries de linfocitos T CD4+ y CD8+ activados, monocitos CD14+ y una expresión más débil en linfocitos B CD19+. Además, el ARNm estaba presente en líneas celulares monocíticas tanto en reposo como activadas THP-1 (ATCC N° TIB-202), U937 (ATCC N° CRL-1593.2) y HL60 (ATCC N° CCL-240).

La expresión de WSX-1 es más fuerte en timo, bazo, PBL y ganglio linfático, además de observarse una mayor expresión para linfocitos T activados. La distribución tisular de OSMRbeta se describe como muy amplia. La distribución tisular de estos tres receptores sugiere que una diana para el Zcytor17lig predicho son las células del linaje hematopoyético, en particular los linfocitos T, monocitos/macrófagos y células progenitoras linfoides y células linfoides. Otras citocinas de cuatro haces helicoidales conocidas que actúan sobre las células linfoides incluyen IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15. Como revisión de citocinas de cuatro haces helicoidales, véase, Nicola y col., Advances in Protein Chemistry 52:1-65, 1999 y Kelso, A., Immunol. Cell Biol. 76:300-317, 1998.

Medios acondicionados (CM) de células de sangre periférica humanas estimuladas por PMA/Ionomicina, seleccionadas para CD3+ soportaron el crecimiento de células BaF3 que expresaban el receptor zcytor17, receptor OSMRbeta y WSX-1 y por lo demás eran dependientes de IL-3. Los medios acondicionados de células que no estaban: 1) estimuladas por PMA/Ionomicina; o no estaban: 2) seleccionadas para CD3 (con o sin estimulación por PMA/Ionomicina) no soportaban el crecimiento de células BaF3 que expresaban zcytor17, y células que expresaban el receptor OSMRbeta y WSX-1 (BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta). Los experimentos de control demostraron que esta actividad proliferativa no era atribuible a otros factores de crecimiento conocidos, y que la capacidad de dicho medio acondicionado de estimular la proliferación de células que expresaban el receptor zcytor17/WSX-1/OSMRbeta podría neutralizarse por una forma soluble del receptor zcytor17.

55 Medios acondicionados de células seleccionadas para CD3+ activadas con PMA/Ionomicina también soportaban el crecimiento de células BaF3 que expresaban el receptor zcytor17 y el receptor OSMRbeta (zcytor17/OSMRbeta), mientras que las células BaF3 que expresaban solo el receptor zcytor17 y el receptor WSX-1 (zcytor17/WSX-1), o que contenían solo el receptor OSMRbeta, no se estimulaban por este medio acondicionado.

La proliferación de células BaF3 que expresaban el receptor zcytor17WSX-1/OSMRbeta expuestas a CM procedente de células de sangre periférica humanas estimuladas con PMA/Ionomicina, seleccionadas para CD3+ se identificaron por inspección visual de los cultivos y/o por ensayos de proliferación. En la técnica se conocen muchos ensayos de proliferación adecuados, e incluyen ensayos para la reducción de un colorante tal como AlamarBlue™ (azul alamar) (AccuMed International, Inc. Westlake, Ohio), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983); 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-3-carboximetoxifenil-2H-tetrazolio; hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio; y cloruro de cianoditolil-tetrazolio (que están disponibles en el mercado en Polysciences, Inc., Warrington, PA); ensayos de mitogénesis tales como la medición de la incorporación de ³H-timidina; ensayos de exclusión de colorante usando, por ejemplo, negro de naftaleno o azul de tripano; captación de colorante usando diacetil fluoresceína; y liberación de cromo. Véase, en general, Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3ª ed., Wiley-Liss, 1994, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Se preparó una biblioteca de ADNc a partir de células de sangre periférica humanas primarias estimuladas con PMA e ionomicina, seleccionadas para CD3+. La biblioteca de ADNc de células de sangre periféricas humanas estimuladas con PMA e ionomicina, seleccionadas para CD3+ se dividió en grupos que contenían múltiples moléculas de ADNc y se introdujo por transfección en una línea de células huésped, por ejemplo, células BHK 570 (Nº de acceso ATCC Nº 10314). Las células huésped transfectadas se cultivaron en un medio que no contenía factores de crecimiento exógenos (por ejemplo, 5 % de FBS) y se recogió medio acondicionado. Este medio acondicionado se ensayó con respecto a la capacidad de estimular la proliferación de células BaF3 transfectadas con los receptores zcytor17, WSX-1 y OSMRbeta. Se identificaron grupos de ADNc que producían medio acondicionado que estimulaban células BaF3/receptor zcytor17/WSX-1/OSMRbeta. Este ADNc plasmídico reunido se introdujo por electroporación en *E. coli*. Se aisló el ADNc a partir de colonias individuales y se usó para transfectar individualmente células BHK570. Se identificaron clones positivos por un resultado positivo en el ensayo de proliferación de BaF3/receptor zcytor17/WSX-1/OSMRbeta, y la actividad se confirmó por neutralización de la proliferación usando el receptor zcytor17 soluble.

Se aisló un clon positivo, y el análisis de la secuencia reveló que la secuencia polinucleotídica contenida dentro del ADN plasmídico era nueva. La secuencia señal de secreción comprende los restos de aminoácido 1 (Met) a 23 (Ala), y el polipéptido maduro comprende los restos de aminoácido 24 (Ser) a 164 (Thr) (como se muestra en la SEC ID Nº: 2). El análisis de secuenciación N-terminal adicional de zcytor17lig purificado a partir de células 293T mostró un extremo N en el resto 27 (Leu) como se muestra en la SEC ID Nº: 2, comprendiendo el polipéptido maduro los restos de aminoácidos 27 (Leu) a 164 (Thr) (como se muestra en la SEC ID Nº: 2).

En general, se predice que las citocinas tienen una estructura de cuatro hélices alfa, siendo las hélices A, C y D las más importantes en las interacciones de ligando-receptor, y son miembros muy conservados de la familia. Haciendo referencia a la secuencia de aminoácidos de zcytor17lig humano mostrada en la SEC ID Nº: 2, en el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de zcytor17lig humano, IL-3 humana y citocinas humanas se predice que la hélice A de zcytor17lig se define por los restos de aminoácido 38-52; la hélice B por los restos de aminoácido 83-98; la hélice C por los restos de aminoácido 104-117; y la hélice D por los restos de aminoácido 137-152; como se muestra en la SEC ID Nº: 2. El análisis estructural sugiere que el bucle A/B es largo, el bucle B/C es corto y el bucle C/D es largo. Esta estructura de bucle da como resultado una organización helicoidal arriba-arriba-abajo-abajo. Basándose en la estructura de 4 haces de hélices, los restos de cisteína dentro de zcytor17lig que están conservados corresponden a los restos de aminoácido 72, 133 y 147 de la SEC ID Nº: 2; y 74, 137 y 151 de la SEC ID Nº: 11 descritas en el presente documento. La colocación constante de la cisteína es una confirmación adicional de la estructura de cuatro haces helicoidales. También está muy conservado en el zcytor17lig el resto de Glu como se muestra en la SEC ID Nº: 2 en el resto 43.

Además, la secuencia de aminoácidos predicha de zcytor17lig murino muestra un 31 % de identidad con la proteína humana predicha sobre la longitud entera de las secuencias (SEC ID Nº: 2 y SEC ID Nº: 11). Basándose en la comparación entre secuencias de restos conservados de zcytor17lig humano y murino, se encontraron restos conservados en las regiones predichas que codificaban alfa hélices C y D. Los polinucleótidos correspondientes que codificaban las regiones, dominios, motivos, restos y secuencias del polipéptido zcytor17lig humano descritas en el presente documento son como se muestran en la SEC ID Nº: 1.

Aunque la hélice D está relativamente conservada entre zcytor17lig humano y murino, la hélice C es la más conservada. Aunque las dos especies tienen aminoácidos ácidos predominantes en esta región, las diferencias pueden responder de la especificidad de especie en la interacción entre zcytor17lig y su receptor, zcytor17 que comprende receptores monoméricos, heterodiméricos (por ejemplo, zcytor17/OSMRbeta, WSX-1/OSMRbeta, zcytor17/WSX-1) o multiméricos (por ejemplo, zcytor17/OSMRbeta/WSX-1). El bucle A/B y la hélice B de zcytor17lig están conservados marginalmente, y la hélice C a través de bucle C/D en la hélice D es la más conservada entre especies; la conservación a lo largo de esta región sugiere que es funcionalmente significativa. Las hélices D de zcytor17lig humano y murino también están conservadas. Los antagonistas del receptor zcytor17 pueden diseñarse mediante mutaciones dentro de la hélice D de zcytor17lig. Estas pueden incluir truncamiento de la proteína a partir del resto Thr156 (SEC ID Nº: 2) o conservación de restos que confieren unión del ligando al receptor, pero disminuyen la actividad de señalización.

Las citocinas de cuatro haces helicoidales también se agrupan por la longitud de sus hélices componentes. Las citocinas en forma de "hélice larga" generalmente consisten en hélices de entre 24-30 restos, e incluyen IL-6, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibidor de leucemia (LIF) y hormona de crecimiento humana (hGH). Las citocinas en forma de "hélices cortas" generalmente consisten en hélices de entre 18-21 restos e incluyen IL-2, IL-4 y GM-CSF. Se cree que zcytoz17lig es un nuevo miembro del grupo de citocinas en forma de hélices cortas. Los estudios que usaron CNTF e IL-6 demostraron que una hélice de CNTF puede intercambiarse por la hélice equivalente en IL-6, confiriendo propiedades de unión a CTNF a la quimera. De esta manera, parece ser que los dominios funcionales de las citocinas de cuatro hélices se determinan basándose en la homología estructural, independientemente de la identidad de secuencia, y pueden mantener la integridad funcional en una quimera (Kallen y col., J. Biol. Chem. 274:11859-11867, 1999). Por lo tanto, los dominios helicoidales de zcytor17lig serán útiles para preparar moléculas de fusión quiméricas, particularmente con otras citocinas en forma de hélices cortas, para determinar y modular la especificidad de unión al receptor. Son de un interés particular las proteínas de fusión modificadas por ingeniería genética con hélice A y/o hélice D, y las proteínas de fusión que combinan dominios helicoidales y de bucle de otras citocinas de forma corta tales como IL-2, IL-4, IL-15, Lif, I-12, IL-3 y GM-CSF.

La secuencia polinucleotídica de la IL-2 humana se muestra en la SEC ID N°: 161 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 162. La secuencia señal de secreción comprende los restos de aminoácido 1 (Met) a 20 (Ser) de la SEC ID N°: 162. Los nucleótidos 48 a 107 de la SEC ID N°: 161. El polipéptido maduro comprende los restos de aminoácido 21 (Ala) a 156 (Thr) de la SEC ID N°: 162; nucleótidos 108 a 515 de la SEC ID N°: 161. La hélice A de la IL-2 humana comprende los restos de aminoácido 27 (Thr) a 48 (Leu) de la SEC ID N°: 162; nucleótidos 126 a 191 de la SEC ID N°: 161. La hélice B de la IL-2 humana comprende la hélice B1 y la hélice B2. La hélice B1 de la IL-2 humana comprende los restos de aminoácido 73 (Ala) a 80 (Gln) de la SEC ID N°: 162; nucleótidos 264 a 287 de la SEC ID N°: 161. La hélice B2 de la IL-2 humana comprende los restos de aminoácido 83 (Glu) a 92 (Val) de la SEC ID N°: 162, nucleótidos 294 a 323 de la SEC ID N°: 161. De esta manera, la hélice B (que comprende las hélices B1 y B2) de la IL-2 se representa por la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 168 (secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 167) en la que los restos de aminoácido 9 y 10 pueden ser cualquier aminoácido. La SEC ID N°: 168 es idéntica a los aminoácidos 73 (Ala) a 92 (Val) de la SEC ID N°: 162, en la que los aminoácidos 81 y 82 son cualquier aminoácido. En una forma preferida, la hélice B de IL-2 comprende los aminoácidos 73 (Ala) a 92 (Val) de la SEC ID N°: 162; nucleótidos 264 a 323 de la SEC ID N°: 161. La hélice C de la IL-2 humana comprende los restos de aminoácido 102 (His) a 116 (Val) de la SEC ID N°: 162; nucleótidos 351 a 395 de la SEC ID N°: 161. La hélice D de la IL-2 humana comprende los restos de aminoácido 134 (Thr) a 149 (Gln) de la SEC ID N°: 162; nucleótidos 447 a 494 de la SEC ID N°: 161.

La secuencia polinucleotídica de la IL-4 humana se muestra en la SEC ID N°: 163 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 164. La secuencia señal de secreción comprende los restos de aminoácido 1 (Met) a 24 (Gly) de la SEC ID N°: 164; nucleótidos 64 a 135 de la SEC ID N°: 163. El polipéptido maduro comprende los restos de aminoácido 25 (His) a 153 (Ser) de la SEC ID N°: 164; nucleótidos 136 a 522 de la SEC ID N°: 163. La hélice A de la IL-4 humana comprende los restos de aminoácido 30 (Thr) a 42 (Thr) de la SEC ID N°: 164; nucleótidos 151 a 189 de la SEC ID N°: 163. La hélice B de la IL-4 humana comprende los restos de aminoácidos 65 (Glu) a 83 (His) de la SEC ID N°: 164; nucleótidos 256 a 312 de la SEC ID N°: 163. La hélice C de la IL-4 humana comprende los restos de aminoácido 94 (Ala) a 118 (Ala) de la SEC ID N°: 164; nucleótidos 343 a 417 de la SEC ID N°: 163. La hélice D de la IL-4 humana comprende los restos de aminoácido 133 (Leu) a 151 (Cys) de la SEC ID N°: 164; nucleótidos 460 a 516 de la SEC ID N°: 163.

La secuencia polinucleotídica para el GM-CSF humano se muestra en la SEC ID N°: 165 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 166. La secuencia señal de secreción comprende los restos de aminoácido 1 (Met) a 17 (Ser) de la SEC ID N°: 166; nucleótidos 9 a 59 de la SEC ID N°: 165. El polipéptido maduro comprende los restos de aminoácido 18 (Ala) a 144 (Glu) de la SEC ID N°: 166; nucleótidos 60 a 440 de la SEC ID N°: 165. La hélice A de GM-CSF humano comprende los restos de aminoácido 30 (Trp) a 44 (Asn) de la SEC ID N°: 166; nucleótidos 96 a 140 de la SEC ID N°: 165. La hélice B del GM-CSF humano comprende los restos de aminoácido 72 (Leu) a 81 (Gln) de la SEC ID N°: 166; nucleótidos 222 a 251 de la SEC ID N°: 165. La hélice C del GM-CSF humano comprende los restos de aminoácido 85 (Gly) a 103 (Gln) de la SEC ID N°: 166; nucleótidos 261 a 317 de la SEC ID N°: 165. La hélice D del GM-CSF humano comprende los restos de aminoácido 120 (Phe) a 131 (Leu) de la SEC ID N°: 166; nucleótidos 366 a 401 de la SEC ID N°: 165.

Los restos de aminoácido que comprende las hélices A, B, C y D, para zcytor17lig, IL-3, IL-2, IL-4 y GM-CSF humanos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	Hélice A	Hélice B	Hélice C	Hélice D	
zcytor17lig	38-52	83-98	104-117	137-152	de la SEC ID N°: 2
IL-3	35-45	73-86	91-103	123-141	de la SEC ID N°: 102
IL-2	27-48	73-92	102-116	134-149	de la SEC ID N°: 162; o hélice B como se describe en la SEC ID N°: 168
IL-4 GM-CSF	30-42 30-44	65-83 72-81	94-118 133-51 85-103	120-131	de la SEC ID N°: 164 de la SEC ID N°: 166

La presente memoria descriptiva describe moléculas de polinucleótido, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican los polipéptidos zcytor17lig desvelados en el presente documento. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que, en vista de la degeneración del código genético, es posible una variación de secuencia considerable entre estas moléculas de polinucleótido. La SEC ID N°: 3 es una secuencia de ADN degenerado que incluía todos los ADN que codifican el polipéptido zcytor17lig, y fragmentos del mismo, de la SEC ID N°: 2. Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia degenerada de la SEC ID N°: 3 también proporciona todas las secuencias de ARN que codifican la SEC ID N°: 2 sustituyendo T por U. De esta manera, la presente invención contempla polinucleótidos que codifican el polipéptido zcytor17lig que comprenden desde el nucleótido 1 ó 70 al nucleótido 492 de la SEC ID N°: 3, y sus equivalentes de ARN. La Tabla 2 expone los códigos de una letra usados dentro de la SEC ID N°: 3 para indicar posiciones de nucleótidos degeneradas. Las "resoluciones" son los nucleótidos indicados por una letra del código. "Complemento" indica el código para el nucleótido o nucleótidos complementarios. Por ejemplo, el código Y indica C o T, y su complemento R indica A o G, siendo A complementario a T, y siendo G complementario a C.

Tabla 2

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

Los codones degenerados usados en la SEC ID N°: 3, que incluyen todos los codones posibles para un aminoácido dado, se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3

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	ACN
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	TACTAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter	.	TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
Cualquiera	X		NNN

Un experto en la materia apreciará que se introduce algo de ambigüedad en la determinación de un codón degenerado, representante de todos los codones posibles que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para serina (WSN), en algunas circunstancias, puede codificar arginina (AGR), y el codón degenerado para arginina (MGN), en algunas circunstancias, puede codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre codones que codifican fenilalanina y leucina. De esta manera, algunos polinucleótidos incluidos por la secuencia degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, pero un experto en la materia puede identificar fácilmente dichas secuencias variantes por referencia a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2. Las secuencias variantes pueden ensayarse fácilmente con respecto a la funcionalidad como se describe en el presente documento.

Un experto en la materia también apreciará que una especie diferente puede presentar “un uso de codones preferente”. En general, véase, Grantham, y col., Nuc. Acids Res. 8:1893-912, 1980; Haas, y col. Curr. Biol. 6:315-24, 1996; Wain-Hobson, y col., Gene 13:355-64, 1981; Grosjean and Fiers, Gene 18:199-209, 1982; Holm, Nuc. Acids Res. 14:3075-87, 1986; Ikemura, J. Mol. Biol. 158:573-97, 1982. Como se usa en el presente documento, la expresión “uso de codones preferente” o “codones preferentes” es una expresión de la técnica que se refiere a los codones de traducción de proteínas que se usan con más frecuencia en las células de una cierta especie, siendo preferidos de esta manera uno o unos pocos representantes de los posibles codones que codifican cada aminoácido (Véase la Tabla 3). Por ejemplo, el aminoácido Treonina (Thr) puede codificarse por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en las células de mamífero el ACC es el codón usado más comúnmente; en otras especies, por ejemplo, células de insecto, levadura, virus o bacterias, pueden ser preferentes otros codones de Thr diferentes. En los polinucleótidos de la presente invención pueden introducirse codones preferentes para una especie particular por diversos procedimientos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codones preferentes en el ADN recombinante, por ejemplo, puede aumentar la producción de la proteína al hacer la traducción de proteínas más eficaz dentro de un tipo celular o especie particular. Por lo tanto, la secuencia de codones degenerados desvelada en la SEC ID N°: 3 sirve como molde para optimizar la expresión de polinucleótidos en diversos tipos celulares y especies usadas comúnmente en la técnica y desveladas en el presente documento. Las secuencias que contienen codones preferentes pueden ensayarse y optimizarse con respecto a la expresión en diversas especies, y ensayarse con respecto a la funcionalidad como se desvela en el presente documento.

Como se ha indicado previamente, los polinucleótidos aislados descritos en el presente documento incluyen ADN y ARN. Los procedimientos para preparar ADN y ARN son bien conocidos en la técnica. En general, el ARN se aísla a

partir de un tejido o célula que produce grandes cantidades de ARN de zcytor17lig. Dichos tejidos y células se identifican por transferencia de Northern (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201, 1980), o por selección en medio acondicionado de diversos tipos celulares con respecto a la actividad sobre las células o tejido diana. Una vez que se ha identificado la actividad o la célula o tejido que produce el ARN, puede prepararse ARN total usando extracción con isotiocianato de guanidinio seguido de aislamiento por centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin y col., Biochemistry 18:52-94, 1979). Se prepara ARN poli(A)⁺ a partir del ARN total usando el procedimiento de Aviv y Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:1408-12, 1972). Se prepara ADN complementario (ADNc) a partir de ARN poli(A)⁺ usando procedimientos conocidos. Como alternativa, puede aislarse ADN genómico. Después se identifican y se aíslan polinucleótidos que codifican polipéptidos zcytor17lig, por ejemplo, por hibridación o PCR.

Un clon de longitud completa que codifica zcytor17lig puede obtenerse por procedimientos de clonación convencionales. Se prefieren los clones de ADN complementarios (ADNc), aunque para algunas aplicaciones (por ejemplo, expresión en animales transgénicos) puede ser preferible usar un clon genómico, o modificar un clon de ADNc para incluir al menos un intrón genómico. Los procedimientos para preparar el ADNc y los clones genómicos son bien conocidos y están dentro del nivel de experiencia en la técnica, e incluyen el uso de la secuencia desvelada en el presente documento, o partes de la misma, para sondar o cebar una biblioteca. Las bibliotecas de expresión pueden sondarse con anticuerpos contra fragmentos de zcytor17lig, receptores solubles que comprenden zcytor17 u otras moléculas de unión específicas.

Las secuencias polinucleotídicas de zcytor17lig desveladas en el presente documento también pueden usarse como sondas o cebadores para clonar regiones 5' no codificantes de un gen de zcytor17lig. En vista de la expresión específica de tejido observada para zcytor17lig, es de esperar que esta región génica proporcione una expresión específica de células hematopoyéticas y de células linfoides. De esta manera, podrían usarse elementos promotores de un gen de zcytor17lig para dirigir la expresión específica de tejido de genes heterólogos, por ejemplo, en animales transgénicos o pacientes tratados con terapia génica. La clonación de secuencias flanqueantes 5' también facilita la producción de proteínas zcytor17lig por "activación génica" como se desvela en la Patente de Estados Unidos Nº 5.641.670. En resumen, la expresión de un gen de zcytor17lig endógeno en una célula se altera introduciendo en el locus de zcytor17lig una construcción de ADN que comprende al menos una secuencia de dirección, una secuencia reguladora, un exón y un sitio donador de corte y empalme no emparejado. La secuencia de dirección es una secuencia no codificante 5' de zcytor17lig que permite la recombinación homóloga de la construcción con el locus de zcytor17lig endógeno, con lo que las secuencias dentro de la construcción se unen operativamente con la secuencia codificante de zcytor17lig endógena. De esta manera, un promotor de zcytor17lig endógeno puede remplazarse o suplementarse con otras secuencias reguladoras para proporcionar una expresión mejorada, específica de tejido o regulada de otra manera.

La presente memoria descriptiva describe polipéptidos y polinucleótidos homólogos de otras especies (ortólogos). Estas especies incluyen, pero sin limitación, especies de mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y otros vertebrados e invertebrados. Son de un interés particular los polipéptidos zcytor17lig de otras especies de mamífero, incluyendo, por ejemplo, polipéptidos murinos, porcinos, ovinos, bovinos, caninos, felinos, equinos y polipéptidos de otros primates. Los ortólogos de zcytor17lig humano pueden clonarse usando información y composiciones proporcionadas por la presente invención en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, un ADNc puede clonarse usando ARNm obtenido a partir de un tejido o tipo celular que expresa zcytor17lig como se desvela en el presente documento. Las fuentes adecuadas de ARNm pueden identificarse por sondeo de transferencia de Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias desveladas en el presente documento. Después se prepara una biblioteca a partir del ARNm de un tejido o línea celular positiva. Después puede aislarse un ADNc que codifica zcytor17lig por diversos procedimientos, tales como por sondeo con un ADNc humano completo o parcial o con una o más series de sondas degeneradas basadas en las secuencias desveladas. Un ADNc también puede clonarse usando la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (Mullis, Patente de Estados Unidos Nº 4.683.202), usando cebadores diseñados a partir de la secuencia de zcytor17lig humano representativa desvelada en el presente documento. Dentro de un procedimiento adicional, la biblioteca de ADNc puede usarse para transformar o transfectar células huésped, y la expresión del ADNc de interés puede detectarse con un anticuerpo contra el polipéptido zcytor17lig, estudios de unión o ensayos de actividad. También pueden aplicarse técnicas similares al aislamiento de clones genómicos.

La secuencia polinucleotídica para el ortólogo de ratón de zcytor17lig se ha identificado y se muestra en la SEC ID Nº: 10 y en la SEC ID Nº: 90, y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la SEC ID Nº: 11 y en la SEC ID Nº: 91. La secuencia polinucleotídica degenerada que codifica el polipéptido de la SEC ID Nº: 11 se muestra en la SEC ID Nº: 12. Para la secuencia de aminoácidos de la citocina de ratón zcytor17lig se predice que la hélice A se define por los restos de aminoácidos 38-52; la hélice B por los restos de aminoácido 85-98; la hélice C por los restos de aminoácido 104-118; y la hélice D por los restos de aminoácido 141-157; como se muestra en la SEC ID Nº: 11 y en la SEC ID Nº: 91. Hay una identidad del 31 % entre las secuencias de ratón y humana a lo largo de toda la longitud de las secuencias de aminoácidos (SEC ID Nº: 2 y SEC ID Nº: 11) de zcytor17lig. La secuencia madura para el zcytor17lig de ratón supuestamente empieza en Met₁, como se muestra en la SEC ID Nº: 11, que corresponde a Met₁, como se muestra en la SEC ID Nº: 2, en la secuencia humana. El análisis de tejidos reveló que la expresión de zcytor17lig se encuentra en testículo, cerebro, células CD90+, células de próstata, glándulas salivares y piel. Un análisis de secuenciación N-terminal adicional de zcytor17lig purificado a partir de células 293T

mostró un extremo N en el resto 31 (Ala) como se muestra en la SEC ID N°: 11 y la SEC ID N°: 91, estando compuesto el polipéptido maduro de los restos de aminoácido 31 (Ala) a 163 (Cys) (como se muestra en la SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 91).

5 Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia desvelada en la SEC ID N°: 1 representa un solo alelo de zcytor17lig humano y que es de esperar que se produzcan variación alélica y el corte y empalme alternativo. Pueden clonarse variantes alélicas de esta secuencia por sondeo de ADNc o bibliotecas genómicas de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos convencionales. Las variantes alélicas de la secuencia de ADN mostrada en la SEC ID N°: 1, incluyendo las que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos, están dentro del alcance de la presente invención, como también lo están las proteínas que son variantes alélicas de la SEC ID N°: 2. En el presente documento se describen ADNc generados a partir de ARNm de corte y empalme alternativo, que conservan las propiedades del polipéptido zcytor17lig, como también se describen polipéptidos codificados por dichos ADNc y ARNm. Las variantes alélicas y variantes de corte y empalme de estas secuencias pueden clonarse por sondeo de ADNc o bibliotecas genómicas de diferentes individuos o tejidos de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

15 La presente memoria descriptiva describe reactivos que encuentran utilidad en aplicaciones de diagnóstico. Por ejemplo, el gen de zcytor17lig, una sonda que comprende ADN o ARN de zcytor17lig o una subsecuencia de los mismos, puede usarse para determinar si el gen de zcytor17lig está presente en un cromosoma humano, tal como el cromosoma 12, o si se ha producido una mutación génica. zcytor17lig se localiza en la región 12q24.31 del cromosoma 12 (Ejemplo 13). Las aberraciones cromosómicas detectables en el locus del gen de zcytor17lig incluyen, pero sin limitación, aneuploidia, cambios en el número de copias del gen, pérdida de heterocigosidad (LOH), translocaciones, inserciones, deleciones, cambios de sitios de restricción y redistribuciones. Dichas aberraciones pueden detectarse usando polinucleótidos de la presente invención empleando técnicas de genética molecular, tales como el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), análisis de repeticiones en tándem cortas (STR) empleando técnicas de PCR y otras técnicas de análisis de asociación genética conocidas en este campo (Sambrook y col., *ibid.*; Ausubel y col., *ibid.*; Marian, Chest 108:255-65, 1995).

20 El conocimiento preciso de la posición de un gen puede ser útil para varios fines, que incluyen: 1) la determinación de si una secuencia forma parte de un contig existente y la obtención de secuencias genéticas circundantes adicionales en diversas formas, tales como YAC, BAC o clones de ADNc; 2) la disposición de un posible gen candidato para una enfermedad hereditaria que muestra asociación con la misma región cromosómica; y 3) referencia cruzada a organismos modelo, tales como ratón, que pueden ayudar a determinar la función que podría tener un gen particular.

35 Un experto en la materia reconocería que la región 12q24 frecuentemente está implicada en redistribuciones genómicas generales, incluyendo translocaciones, deleciones, inversiones y duplicaciones que están asociadas con diversos cánceres. La Base de Datos Mitelman de Aberraciones Cromosómicas en Cáncer, en el Proyecto de Anatomía Genómica del Cáncer, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, Md situada en Internet indica 199 casos de cánceres con redistribuciones genómicas en las que está implicado 12q24. De estas, la mayoría son parte de cariotipos complejos con otras redistribuciones; sin embargo, en algunos casos, la redistribución que implica 12q24 es la única alteración genómica. Dada la expresión del receptor para zcytor17lig en células de linajes linfocítico y mielocítico, es particularmente significativo indicar que hay al menos 4 casos de leucemia mielocítica presentados en la bibliografía en los que la translocación (2 casos: Yamagata y col, Cancer Genet Cytogenet 97:90-93, 1997; Dunphy y Batanian, Cancer Genet Cytogenet 114:51-57, 1999) o la duplicación (2 casos: Bonomi y col, Cancer Genet Cytogenet 108:75-78, 1999) son la única alteración genómica. Esto sugiere que un gen o genes que residen dentro de 12q24 podrían estar implicados directamente en la transformación maligna de las células de estos pacientes. Una sobreexpresión inapropiada de zcytor17lig podría contribuir a la transformación maligna promoviendo la proliferación aberrante de células que llevan el receptor, mediante mecanismos autocrinos o paracrinos. De esta forma, la inhibición de la actividad de zcytor17lig podría inhibir el crecimiento de dichas células. Como alternativa, una redistribución genómica que da como resultado la inactivación del gen de zcytor17lig puede promover la transformación maligna y/o metástasis al eliminar funciones inmunorreguladoras de zcytor17lig. De hecho, se ha localizado un gen que suprime la metástasis del cáncer de próstata en 12q24-qter (Ichikawa y col, Asian J Androl 2:167-171, 2000). Si zcytor17lig es el gen dentro de esta región responsable de la supresión de la metástasis, entonces el propio zcytor17lig puede tener valor terapéutico en el tratamiento del cáncer.

55 Un diagnóstico podría ayudar a los médicos a determinar el tipo de enfermedad y la terapia asociada apropiada, o asistencia en el asesoramiento genético. Como tales, los anticuerpos anti-zcytor17lig, polinucleótidos y polipéptidos de la invención pueden usarse para la detección del polipéptido zcytor17lig, ARNm o anticuerpos anti-zcytor17lig, sirviendo de esta manera como marcadores y pueden usarse directamente para detectar enfermedades genéticas o cánceres, como se describe en el presente documento, usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. Además, pueden usarse sondas del polinucleótido zcytor17lig para detectar anomalías o genotipos asociados con deleciones y translocaciones del cromosoma 12q24.3 asociadas con enfermedades humanas, u otras translocaciones implicadas con la progresión maligna de tumores u otras mutaciones de 12q24.3, que es de esperar que estén implicadas en redistribuciones cromosómicas de malignidad; o en otros cánceres. De forma similar, pueden usarse sondas del polinucleótido zcytor17lig para detectar anomalías o genotipos asociados con la trisomía del cromosoma 12 y pérdidas cromosómicas asociadas con enfermedades humanas o abortos

espontáneos. De esta manera, pueden usarse sondas del polipéptido zcytor17lig para detectar anomalías o genotipos asociados con estos defectos.

Un experto en la materia reconocería que las sondas del polinucleótido zcytor17lig son particularmente útiles para el diagnóstico de anomalías cromosómicas generales asociadas con pérdida de heterogeneidad (LOH), aumento de cromosomas (por ejemplo trisomía), translocación, amplificación de ADN y similares. Se sabe que las translocaciones dentro del locus cromosómico 12q24.3 en el que está localizado el gen de zcytor17lig están asociadas con enfermedades humanas. Por ejemplo, las deleciones y translocaciones de 12q24, duplicaciones y trisomías están asociadas con cánceres como se ha analizado anteriormente. De esta manera, como el gen de zcytor17lig se localiza en esta región crítica, pueden usarse sondas del polinucleótido de zcytor17lig de la presente invención para detectar anomalías o genotipos asociados con la translocación, deleción y trisomía de 12q24, y similares, descritas anteriormente.

Como se ha analizado anteriormente, los defectos en el propio gen de zcytor17lig pueden dar como resultado una patología humana hereditaria. Las moléculas de la presente invención, tales como los polipéptidos, antagonistas, agonistas, polinucleótidos y anticuerpos de la presente invención ayudarían en la detección, diagnóstico, prevención y tratamiento asociado con un defecto genético de zcytor17lig. Además, pueden usarse sondas del polinucleótido de zcytor17lig para detectar diferencias alélicas entre individuos enfermos o no enfermos en el locus cromosómico de zcytor17lig. Como tales, las secuencias de zcytor17lig pueden usarse como diagnóstico en la creación de perfiles de ADN forenses.

En general, en la técnica se conocen los procedimientos de diagnóstico usados en análisis de asociación genética, para detectar una anomalía o aberración genética en un paciente. Las sondas analíticas generalmente tendrán al menos 20 nt de longitud, aunque pueden usarse sondas algo más cortas (por ejemplo, 14-17 nt). Los cebadores de PCR tienen al menos 5 nt de longitud, preferentemente 15 o más, más preferentemente 20-30 nt. Para el análisis general de los genes, o del ADN cromosómico, una sonda de polinucleótido de zcytor17lig puede comprender un exón entero o más. Los exones se determinan fácilmente por un experto en la materia comparando las secuencias de zcytor17lig (SEC ID N°: 1) con el ADN genómico de zcytor17lig de ratón (SEC ID N°: 76). En general, los procedimientos de diagnóstico usados en análisis de asociación genética, para detectar una anomalía o aberración genética en un paciente, se conocen en la técnica. La mayoría de los procedimientos de diagnóstico comprenden las etapas de (a) obtener una muestra genética de un paciente potencialmente enfermo, paciente enfermo o posible portador no enfermo de un alelo de enfermedad recesivo; (b) producir un primer producto de reacción incubando la muestra genética con una sonda de polinucleótido de zcytor17lig en la que el polinucleótido hibridará con la secuencia del polinucleótido complementario, tal como en un análisis de RLFP o incubando la muestra genética con cebadores con sentido y antisentido en una reacción PCR en condiciones de reacción PCR apropiada; (iii) visualizar el primer producto de reacción por electroforesis en gel y/u otros procedimientos conocidos tales como visualización del primer producto de reacción con una sonda de polinucleótido zcytor17lig en el que el polinucleótido hibridará con la secuencia del polinucleótido complementario de la primera reacción; y (iv) comparar el primer producto de reacción visualizado con un segundo producto de reacción de control de una muestra genética procedente del paciente de tipo silvestre, o un individuo normal o de control. Una diferencia entre el primer producto de reacción y el producto de reacción de control indica una anomalía genética en el paciente enfermo o potencialmente enfermo, o la presencia de un fenotipo portador heterocigoto recesivo de un paciente no enfermo, o la presencia de un defecto genético en un tumor de un paciente enfermo, o la presencia de una anomalía genética en un feto o embrión antes de la implantación. Por ejemplo, una diferencia en el patrón de fragmentos de restricción, longitud de productos de PCR, longitud de secuencias repetitivas en el locus genético de zcytor17lig y similares, indican una anomalía genética, aberración genética o diferencia alélicas en comparación con el control de tipo silvestre normal. Los controles pueden proceder de miembros de la familia no afectados, o individuos no relacionados, dependiendo del ensayo y la disponibilidad de muestras. Las muestras genéticas para su uso dentro de la presente invención incluyen ADN genómico, ARNm y ADNc aislado a partir de cualquier tejido u otra muestra biológica de un paciente, que incluye, pero sin limitación, sangre, saliva, semen, células embrionarias, líquido amniótico y similares. La sonda o cebador polinucleotídico puede ser ARN o ADN, y comprenderá una parte de la SEC ID N° 1, el complemento de la SEC ID N°: 1 o un equivalente de ARN de la misma. Dichos procedimientos para mostrar análisis de asociación genética a fenotipos de enfermedades humanas son bien conocidas en la técnica. Como referencia a procedimientos basados en PCR en diagnóstico véase, en general, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), White (ed.), *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (Humana Press, Inc. 1993), Cotter (ed.), *Molecular Diagnosis of Cancer* (Humana Press, Inc. 1996), Hanausek y Walaszek (eds.), *Tumor Marker Protocols* (Humana Press, Inc. 1998), Lo (ed.), *Clinical Applications of PCR* (Humana Press, Inc. 1998), y Meltzer (ed.), *PCR en Bioanalysis* (Humana Press, Inc. 1998).

Las mutaciones asociadas con el locus de zcytor17lig pueden detectarse usando moléculas de ácido nucleico empleando procedimientos convencionales para análisis de mutación directa, tales como análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, análisis de repeticiones en tándem cortas empleando técnicas de PCR, análisis de sistemas de mutación de refractarios para amplificación, detección de polimorfismos de conformación de una sola cadena, procedimientos de escisión por RNasa, electroforesis en gel en gradiente de desnaturalización, análisis de desacoplamiento ayudado por fluorescencia y otras técnicas de análisis genéticos conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), Marian, *Chest* 108: 255 (1995), Coleman y Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Human Press, Inc. 1996), Elles (ed.)

5 Molecular Diagnosis of Genetic Diseases (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), Laboratory Protocols for Mutation Detection (Oxford University Press 1996), Birren y col. (eds.), Genome Analysis, Vol. 2: Detecting Genes (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998), Dracopoli y col. (eds.), Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons 1998), y Richards y Ward, "Molecular Diagnostic Testing," en Principles of Molecular Medicine, páginas 83-88 (Humana Press, Inc. 1998). El análisis directo de un gen de *zcytor17lig* para una mutación puede realizarse usando el ADN genómico de un sujeto. Los procedimientos para amplificar ADN genómico, obtenido por ejemplo a partir de linfocitos de sangre periférica, son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Dracopoli y col. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, en las páginas 7.1.6 a 7.1.7 (John Wiley & Sons 1998)).

10 Las posiciones de los intrones en el gen de *zcytor17lig* de ratón se determinaron identificando clones genómicos, seguido de análisis de las uniones intrón/exón. El ADN genómico de ratón se muestra en la SEC ID N°: 76. Haciendo referencia a la SEC ID N°: 76, son evidentes tres exones codificantes separados por intrones: el primer exón codificante está entre los números de ácido nucleico 1104-1119 de la SEC ID N°: 76, el segundo exón entre los números de ácido nucleico 1300-1451 de la SEC ID N°: 76, y el tercer exón entre los números de ácido nucleico 2411-2998 de la SEC ID N°: 76.

15 Dentro de realizaciones de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican *zcytor17lig* aislado pueden hibridar en condiciones rigurosas con moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, con moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de los nucleótidos 28 a 519 de la SEC ID N°: 1, o con moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos complementaria a la SEC ID N°: 1. En general, se seleccionan condiciones rigurosas de aproximadamente 5 °C por debajo del punto de fusión térmico T_m para la secuencia específica a una concentración iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (a una concentración iónica y pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda con la que se empareja perfectamente.

20 Un par de moléculas de ácido nucleico, tales como ADN-ADN, ARN-ARN y ADN-ARN, pueden hibridar si las secuencias de nucleótidos tienen algún grado de complementariedad. Los híbridos pueden tolerar pares de bases desacoplados en la doble hélice, pero la estabilidad del híbrido se ve influenciada por el grado de desacoplamiento. La T_m del híbrido desacoplado se reduce en 1 °C por cada 1-1,5 % de desacoplamiento de pares de bases. La variación de la rigurosidad de las condiciones de hibridación permite el control del grado de desacoplamiento que estará presente en el híbrido. El grado de rigurosidad aumenta según aumenta la temperatura de hibridación y se reduce la fuerza iónica del tampón de hibridación.

25 Está perfectamente dentro de las capacidades de un experto en la materia adaptar estas condiciones para uso con un híbrido polinucleotídico particular. La T_m para una secuencia diana específica es la temperatura (en condiciones definidas) a la que el 50 % de la secuencia diana hibridará con una secuencia de sonda con la que se empareja perfectamente. Estas condiciones que influyen en la T_m incluyen el tamaño y el contenido de pares de bases de la sonda polinucleotídica, la fuerza iónica de la solución de hibridación, y la presencia de agentes desestabilizadores en la solución de hibridación. En la técnica se conocen numerosas ecuaciones para calcular la T_m y son específicas para híbridos de ADN, ARN y ADN-ARN y secuencias de sondas polinucleotídicas de longitud variable (véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel y col., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger y Kimmel (eds.), Guide to Molecular Cloning Techniques, (Academic Press, Inc. 1987); y Wetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227 (1990)). Los software de análisis de secuencia tales como OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) y *Primer Premier 4.0* (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), así como sitios de Internet son herramientas disponibles para analizar una secuencia dada y calcular la T_m basándose en criterios definidos del usuario. Dichos programas también pueden analizar una secuencia dada en condiciones definidas e identificar secuencias de sondas adecuadas. Normalmente, la hibridación de secuencias polinucleotídicas más largas, >50 pares de bases, se realiza a temperaturas de aproximadamente 20-25 °C por debajo de la T_m calculada. Para sondas más pequeñas, <50 pares de bases, la hibridación normalmente se realiza a la T_m o 5-10 °C por debajo de la T_m calculada. Esto permite una velocidad máxima de hibridación para híbridos de ADN-ADN y ADN-ARN.

30 Después de la hibridación, las moléculas de ácido nucleico pueden lavarse para retirar moléculas de ácido nucleico no hibridadas en condiciones rigurosas, o en condiciones muy rigurosas. Las condiciones de lavado rigurosas típicas incluyen lavado en una solución de SSC 0,5x – 2x con dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1 % a 55-65 °C. Es decir, las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido *zcytor17lig* variante hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 (o su complemento) en condiciones de lavado rigurosas, en las que la rigurosidad de lavado es equivalente a SSC 0,5x – 2x con SDS al 0,1 % a 55-65 °C, incluyendo SSC 0,5x con SDS al 0,1 % a 55 °C, o SSC 2x con SDS al 0,1 % a 65 °C. Un experto en la materia puede idear fácilmente condiciones equivalentes, por ejemplo, sustituyendo SSC por SSPE en la solución de lavado.

35 Condiciones de lavado altamente rigurosas típicas incluyen lavado en una solución de SSC 0,1x – 0,2x con dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1 % a 50-65 °C. En otras palabras, las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido *zcytor17lig* variante hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 (o su complemento) en condiciones de lavado altamente rigurosas, en las que la rigurosidad del lavado es equivalente a SSC 0,1x – 2x con SDS al 0,1 % a 55-65 °C, incluyendo SSC 0,1x con SDS al 0,1 % a 50

°C, o SSC 0,2x con SDS al 0,1 % a 65 °C.

La presente memoria descriptiva polipéptidos zcytor17lig aislados que tienen una identidad de secuencia sustancialmente similar a los polipéptidos de la SEC ID N°: 2, o sus ortólogos. La expresión “identidad de secuencia sustancialmente similar” se usa en el presente documento para indicar polipéptidos que comprenden al menos un 70 %
5
%, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o más de un 99 % de identidad de secuencia con las secuencias mostradas en la SEC ID N°: 2, o sus ortólogos. La presente invención también incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %
10
%, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o más de un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de restos de aminoácido 1 a 162 o 33 a 162 de la SEC ID N°: 2. La presente memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos. A continuación se describen procedimientos para determinar el porcentaje de identidad.

La presente memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico de zcytor17lig variantes que pueden identificarse usando dos criterios: una determinación de la similitud entre el polipéptido codificado con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, y/o un ensayo de hibridación, como se ha descrito anteriormente. Dichas variantes de zcytor17lig incluyen moléculas de ácido nucleico: (1) que hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 (o su complemento) en condiciones de lavado rigurosas, en las que la rigurosidad de lavado es equivalente a SSC 0,5x – 2x con SDS al 0,1 % a 55-65 °C; o (2) que codifican un polipéptido que tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %
15
%, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o más de un 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2. Como alternativa, pueden caracterizarse variantes de zcytor17lig como moléculas de ácido nucleico: (1) que hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 (o su complemento) en condiciones de lavado rigurosas, en las que la rigurosidad de lavado es equivalente a SSC 0,1x – 0,2x SSC con SDS al 0,1 % a 50-65 °C; y (2) que codifican un polipéptido que tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o más de un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.
20
25

El porcentaje de identidad de secuencias se determina por procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul y col., 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 las puntuaciones de alineamiento usando una penalización de apertura de hueco de 10, una penalización de extensión de hueco de 1, y la matriz de puntuación “BLOSUM62” de Henikoff y Henikoff (*ibíd.*) como se muestra en la Tabla 4 (los aminoácidos se indican por los códigos de una letra convencionales).
30

$$\frac{\text{Número total de emparejamientos idénticos}}{[\text{longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias}]} \times 100$$

35

Tabla 4

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

5 Los expertos en la materia apreciarán que hay muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un procedimiento de alineamiento de proteína adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento y la secuencia de aminoácidos de una supuesta variante de zcytor17lig. El algoritmo FASTA se describe por Pearson y Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), y por Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990).

10 En resumen, FASTA primero caracteriza la similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia problema (por ejemplo, SEC ID N°: 2) y una secuencia de ensayo que tiene la mayor densidad de identidades (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup = 2), sin considerar sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácidos conservativas. Las diez regiones con la mayor densidad de identidades después se reevalúan comparando la similitud de todos los aminoácidos emparejados usando una matriz de sustitución de aminoácidos, y los extremos de las regiones "se recortan" para incluir solo los restos que contribuyen a la máxima puntuación. Si hay varias regiones con puntuaciones mayores que el valor "límite" (calculado por una fórmula predeterminada basándose en la longitud de la secuencia y el valor de ktup), entonces las regiones iniciales recortadas se examinan para determinar si las regiones pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con huecos. Finalmente, las máximas regiones de puntuación de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando 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 inserciones y delecciones de aminoácidos. Son parámetros preferidos para el análisis FASTA: ktup=1, penalización de apertura de hueco=10, penalización de extensión de hueco=1 y matriz de sustitución=BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA por modificación del archivo de puntuación de matriz ("SMATRIX"), como se explica en el Apéndice 2 de Pearson, Meth.

Enzymol. 183: 63 (1990).

FASTA también puede usarse para determinar la identidad de secuencia de moléculas de ácido nucleico usando una relación como se ha desvelado anteriormente. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor de ktup puede variar entre uno y seis, preferentemente de tres a seis, más preferentemente tres, con otros parámetros establecidos por defecto.

Los polipéptidos zcytor17lig variantes o polipéptidos con una identidad de secuencia sustancialmente similar se caracterizan por tener una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios preferentemente son de una naturaleza minoritaria, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativas (como las mostradas en la Tabla 5 presentada a continuación) y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegamiento o actividad del polipéptido; deleciones pequeñas, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y extensiones amino- o carboxi-terminales, tales como un resto de metionina amino-terminal, un péptido de engarce pequeño de hasta aproximadamente 20-25 restos o una señal de afinidad. La presente memoria descriptiva describe polipéptidos de aproximadamente 108 a 216 restos de aminoácido que comprenden una secuencia que es idéntica en al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o más de un 99 % a la región correspondiente de la SEC ID N°: 2. Los polipéptidos que comprenden marcadores de afinidad pueden comprender además un sitio de escisión proteolítica entre el polipéptido zcytor17lig y el marcador de afinidad. Estos sitios preferidos incluyen sitios de escisión de trombina y sitios de escisión del factor Xa.

Tabla 5

Sustituciones de aminoácidos conservativas

Básico:	arginina lisina histidina
Ácido:	ácido glutámico ácido aspártico
Polar:	glutamina asparagina
Hidrófobo:	leucina isoleucina valina
Aromático:	fenilalanina triptófano tirosina
Pequeño:	glicina alanina serina treonina metionina

Puede realizarse la determinación de restos de aminoácido que comprenden regiones o dominios que son críticos para mantener la integridad estructural. Dentro de estas regiones, se pueden determinar restos específicos que serán más o menos tolerantes de cambios y mantener la estructura terciaria global de la molécula. Los procedimientos para analizar estructuras de secuencia incluyen, pero sin limitación, alineamiento de múltiples secuencias con alta identidad de aminoácidos o nucleótidos, tendencias de estructuras secundarias, patrones binarios, empaquetamiento complementario e interacciones polares escondidas (Barton, Current Opin. Struct. Biol. 5:372-376, 1995 y Cordes y col., Current Opin. Struct. Biol. 6: 3-10, 1996). En general, cuando se diseñan modificaciones para moléculas o se identifican fragmentos específicos la determinación de la estructura irá acompañada de la evaluación de la actividad de las moléculas modificadas.

Se realizan cambios en la secuencia de aminoácidos de polipéptidos zcytor17lig para minimizar la ruptura de la estructura de orden superior esencial para la actividad biológica. Por ejemplo, cuando el polipéptido zcytor17lig comprende una o más hélices, se realizarán cambios en los restos de aminoácido para no alterar la geometría de hélices y otros componentes de la molécula, cuando los cambios en la conformación reducen alguna función crítica, por ejemplo, unión de la molécula a sus patrones de unión, por ejemplo, hélices A y D, restos 43 (Glu), 44 (Glu) y 136 (Phe) de la SEC ID N°: 2. Los efectos de los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden predecirse, por ejemplo, mediante la creación de modelos informáticos como se ha analizado anteriormente o puede determinarse por análisis de la estructura cristalina (véase, por ejemplo, Laphorn y col., Nat. Struct. Biol. 2:266-268, 1995). Otras técnicas que son bien conocidas en este campo comparan el plegamiento de una proteína variante con una molécula convencional (por ejemplo, la proteína nativa). Por ejemplo, puede realizarse la comparación del patrón de cisteínas en una variante y en moléculas convencionales. La espectrometría de masas y la modificación química usando reducción y alquilación proporcionan procedimientos para determinar restos de cisteína que están asociados con puentes disulfuro o están libres de dichas asociaciones (Bean y col., Anal. Biochem. 201: 216-226, 1992; Gray, Protein Sci. 2: 1732-1748, 1993; y Patterson y col., Anal. Chem. 66: 3727-3732, 1994). Generalmente se cree que si

una molécula modificada no tiene el mismo patrón de cisteínas que la molécula convencional resultaría afectado el plegamiento. Otro procedimiento bien conocido y aceptado para medir el plegamiento es el dicroísmo circular (CD). La medición y comparación de los espectros de CD generados por una molécula modificada y una molécula convencional es rutinaria (Johnson, *Proteins*, 7: 205-214, 1990). La cristalografía es otro procedimiento bien conocido para analizar el plegamiento y la estructura. La resonancia magnética nuclear (RMN), el mapeo de péptidos digestivo y el mapeo de epítopos también son procedimientos conocidos para analizar el plegamiento y la similitudes estructurales entre proteínas y polipéptidos (Schaanan y col., *Science* 257: 961-964, 1992).

Puede generarse un perfil de hidrofilia de Hopp/Woods de la secuencia de la proteína zcytor17lig como se muestra en la SEC ID N°: 2 (Hopp y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3824-3828, 1981; Hopp, J. *Immun. Meth.* 88: 1-18, 1986 y Triquier y col., *Protein Engineering* 11: 153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana de seis restos deslizante. Se ignoraron los restos de G, S y T escondidos y los restos de H, Y y W expuestos.

Por ejemplo, en zcytor17lig humano, las regiones hidrófilas incluyen los restos de aminoácido 54-59 de la SEC ID N°: 2, los restos de aminoácido 129-134 de la SEC ID N°: 2, los restos de aminoácido 53-58 de la SEC ID N°: 2, los restos de aminoácido 35-40 de la SEC ID N°: 2 y los restos de aminoácido 33-38 de la SEC ID N°: 2. Por ejemplo, en zcytor17lig de ratón, las regiones hidrófilas incluyen los restos de aminoácido 34-39 de la SEC ID N°: 11, los restos de aminoácido 46-51 de la SEC ID N°: 11, los restos de aminoácido 131-136 de la SEC ID N°: 11, los restos de aminoácido 158-163 de la SEC ID N°: 11 y los restos de aminoácido 157-162 de la SEC ID N°: 11.

Los expertos en la materia reconocerán que la hidrofilia o hidrofobia se tendrá en cuenta cuando se diseñen modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido zcytor17lig, de forma que no se altere el perfil biológico y estructural global. Son de un interés particular para el reemplazo restos hidrófobos seleccionados del grupo que consiste en Val, Ley e Ile o del grupo que consiste en Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp. Por ejemplo, los restos tolerantes de sustitución podrían incluir Val, Ley e Ile o el grupo que consiste en Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp como se muestra en la SEC ID N°: 2. Los restos de cisteína conservados en las posiciones dentro de la SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 11 serán relativamente intolerantes de sustitución.

Las identidades de aminoácidos esenciales también pueden deducirse a partir del análisis de similitud de secuencia entre IL-3, Lif, IL12, IL-15, IL-2, IL-4 y GM-CSF con zcytor17lig. Usando procedimientos tales como el análisis "FASTA" descrito previamente, se identifican regiones de alta similitud dentro de una familia de proteínas y se usan para analizar la secuencia de aminoácidos de regiones conservadas. Un enfoque alternativo para identificar un polinucleótido variante de zcytor17lig basándose en la estructura es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un gen variante de zcytor17lig potencial puede hibridar con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, como se ha analizado anteriormente.

Otros procedimientos para identificar aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención son procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de exploración de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081 (1989), Bass y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 4498 (1991), Coombs y Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering," en *Proteins: Analysis and Design*, Angeletti (ed.), páginas 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)). En la última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada resto de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se ensayan con respecto a la actividad biológica o bioquímica como se analiza más adelante para identificar restos de aminoácido que sean críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton y col., *J. Biol. Chem.* 271: 4699 (1996).

La presente memoria descriptiva describe fragmentos funcionales de polipéptidos zcytor17lig y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales. Un zcytor17lig "funcional" o fragmento del mismo como se define en el presente documento se caracteriza por su actividad proliferativa o de diferenciación, por su capacidad de inducir o inhibir funciones celulares especializadas o por su capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-zcytor17lig o anticuerpo del receptor zcytor17, WSX-1 u OSMRbeta o heterodímeros (por ejemplo, zcytor17/WSX-1 o zcytor17/OSMRbeta) o multímeros (por ejemplo, zcytor17/WSX-1/OSMRbeta) de estos receptores (solubles o inmovilizados). Como se ha descrito previamente en el presente documento, zcytor17lig se caracteriza por una estructura de cuatro haces helicoidales que comprende hélice A (restos de aminoácido 38-52), hélice B (restos de aminoácido 83-98), hélice C (restos de aminoácido 104-117) y hélice D (restos de aminoácido 137-152), como se muestra en la SEC ID N°: 2. De esta manera, la presente memoria descriptiva describe proteínas de fusión que incluyen: (a) moléculas de polipéptido que comprenden una o más de las hélices descritas anteriormente; y (b) fragmentos funcionales que comprenden una o más de estas hélices. La otra parte polipeptídica de la proteína de fusión puede aportarse por otra citocina de cuatro haces helicoidales tales como IL-15, IL-2, IL-4 y GM-CSF, o por un péptido señal de secreción no relacionado y/o no nativo que facilita la secreción de la proteína de fusión.

De esta manera, la presente memoria descriptiva describe proteínas de fusión que comprenden al menos cuatro polipéptidos, en las que el orden de polipéptidos desde el extremo N al extremo C es: un primer polipéptido comprende aminoácidos seleccionados de un grupo que consiste en: (a) restos de aminoácido 27-48 de la hélice A de IL-2 de la SEC ID N°: 162; (b) restos de aminoácido 35-45 de la hélice A de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (c) restos de aminoácido 30-42 de la hélice A de IL-4 de la SEC ID N°: 164; (d) restos de aminoácido 30-44 de la hélice A de GM-CSF de la SEC ID N°: 166; y (e) restos de aminoácido 38-52 de la SEC ID N°: 2; un primer espaciador de 6-27

aminoácidos; y un segundo polipéptido que comprende restos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste en: (a) restos de aminoácido de la hélice B de IL-2 de la SEC ID N°: 168; (b) restos de aminoácido 65-83 de la hélice B de IL-4 de la SEC ID N°: 164; (c) restos de aminoácido 73-86 de la hélice B de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos de aminoácido 72-81 de la hélice B de GM-CSF de la SEC ID N°: 166; y (e) restos de aminoácido 83-98 de la SEC ID N°: 2; un segundo espaciador de 5-11 restos de aminoácido; un tercer polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste en: (a) restos 102-116 de la hélice C de IL-2 de la SEC ID N°: 162; (b) restos 94-118 de la hélice de IL-4 de la SEC ID N°: 164; (c) restos 91-103 de la hélice de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos 85-103 de la hélice C de GM-CSF de la SEC ID N°: 166; y (e) restos de aminoácido 104-117 de la SEC ID N°: 2; un tercer espaciador de 3-29 restos de aminoácido; y un cuarto polipéptido que comprende restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: (a) restos de aminoácido 134-149 de la hélice D de IL-2 de la SEC ID N°: 162; (b) restos de aminoácido 123-141 de la hélice D de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (c) restos de aminoácido 133-151 de la hélice D de IL-4 de la SEC ID N°: 164; (d) restos de aminoácido 120-131 de la hélice D de GM-CSF de la SEC ID N°: 166; y (e) restos de aminoácidos 137-152 de la SEC ID N°: 2, en las que al menos uno de los cuatro polipéptidos procede de zcytor17lig. En otras realizaciones los péptidos espaciadores se seleccionarán de los bucles A/B, B/C y C/D de zcytor17lig, e IL-3, como se muestra en la Tabla 1.

Pueden realizarse análisis de delección rutinarios de moléculas de ácido nucleico para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido zcytor17lig. Como ilustración, pueden digerirse moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 o fragmentos de la misma, con la nucleasa *Baß1* para obtener una serie de delecciones anidadas. Estos fragmentos de ADN después se insertan en vectores de expresión en el marco de lectura apropiada, y los polipéptidos expresados se aíslan y se ensayan con respecto a la actividad de zcytor17lig, o con respecto a la capacidad de unirse a anticuerpos anti-zcytor17lig o el receptor zcytor17. Una alternativa a la digestión con exonucleasas es el uso de mutagénesis dirigida a oligonucleótido para introducir delecciones o codones de terminación para la producción específica de un fragmento de zcytor17lig deseado. Como alternativa, pueden sintetizarse fragmentos particulares de un gen de zcytor17lig usando la reacción en cadena de la polimerasa.

Los procedimientos convencionales para identificar dominios funcionales son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se han resumido estudios sobre el truncamiento en cualquiera o los dos extremos de interferones por Horisberger y Di Marco *Pharmac. Ther.* 66: 507 (1995). Además, se describen técnicas convencionales para el análisis funcional de proteínas por, por ejemplo, Treuter y col., *Molec. Gen. Genet.* 240: 113 (1993); Content y col., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon," en *Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIRTNO Meeting on Interferon Systems*, Cantell (ed.), páginas 65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, "the EGF Receptor," en *Control of Animal Cell Proliferation 1*, Boynton y col., (eds.) páginas 169-199 (Academic Press 1985); Coumailleau y col., *J. Biol. Chem.* 270: 29270 (1995); Fukunaga y col., *J. Biol. Chem.* 270: 25291 (1995); Yamaguchi y col., *Biochem. Pharmacol.* 50:1295 (1995); y Meisel y col., *Plant Molec. Biol.* 30: 1 (1996).

Pueden realizarse múltiples sustituciones de aminoácidos y ensayarse usando procedimientos conocidos de mutagénesis y exploración, tales como los desvelados 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 desvelan procedimientos para la aleatorización simultánea de dos o más posiciones en un polipéptido, la selección del polipéptido funcional y después la secuenciación de polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros procedimientos que pueden usarse incluyen presentación en fagos (por ejemplo, Lowman y col., *Biochem.* 30: 10832 (1991), Ladner y col., Patente de Estados Unidos N° 5.223.409, Huse, publicación internacional N° WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a regiones (Derbyshire y col., *Gene* 46: 145 (1986) y Ner y col., *DNA* 7: 127, (1988)).

También pueden generarse variantes de las secuencias polipeptídicas y de nucleótidos de zcytor17lig desveladas mediante barajado de ADN como se desvela por Stemmer, *Nature* 370: 389 (1994), Stemmer, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 10747 (1994) y publicación internacional N° WO 97/20078. En resumen, se generan moléculas de ADN variantes por recombinación homóloga *in vitro* por fragmentación aleatoria de un ADN parental seguido de reensamblaje usando PCR, dando como resultado mutaciones puntuales introducidas aleatoriamente. Esta técnica puede modificarse usando una familia de moléculas de ADN parentales, tales como variantes alélicas o moléculas de ADN de diferentes especies, para introducir variabilidad adicional al procedimiento. La selección o exploración de la actividad deseada, seguida de iteraciones de mutagénesis y ensayos adicionales proporciona una rápido "desprendimiento" de las secuencias por selección de mutaciones deseables mientras que se selecciona simultáneamente contra los cambios perjudiciales.

Los procedimientos de mutagénesis desvelados en el presente documento pueden combinarse con procedimientos de exploración automáticos de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos clonados, mutagenizados en células huésped. Pueden recuperarse moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos biológicamente activos, o polipéptidos que se unen con anticuerpos anti-zcytor17lig o el receptor zcytor17 soluble, o WSX-1 soluble u OSMR soluble o heterodímeros o multímeros de estos receptores solubles como se describe en el presente documento, a partir de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando un equipo moderno. Estos procedimientos permiten la rápida determinación de la importancia de restos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

Además, las proteínas descritas en el presente documento (o fragmentos polipeptídicos de las mismas) pueden unirse a otras moléculas bioactivas, particularmente otras citocinas, para proporcionar moléculas multifuncionales. Por ejemplo, una o más hélices de zcytor17lig pueden unirse a otras citocinas para aumentar sus propiedades biológicas o eficacia de producción.

- 5 La presente memoria descriptiva describe una serie de nuevas moléculas híbridas en las que un segmento que comprende una o más de las hélices de zcytor17lig se fusiona a otro polipéptido. La fusión preferiblemente se realiza por corte y empalme a nivel del ADN para permitir la expresión de moléculas quiméricas en sistemas de producción recombinantes. Las moléculas resultantes después se ensayan con respecto a propiedades tales como una mejor solubilidad, mejor estabilidad, semivida de eliminación prolongada, mejor expresión y niveles de secreción y farmacodinámica. Dichas moléculas híbridas pueden comprender además otros restos de aminoácido (por ejemplo, un engarce polipeptídico) entre las proteínas o polipéptidos componentes.

10 Los aminoácidos no naturales incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxi-prolina, *trans*-4-hidroxi-prolina, N-metilglicina, *alo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipecólico, ácido tiazolidina carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *terc*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. En la técnica se conocen varios procedimientos para incorporar restos de aminoácido no naturales en las proteínas. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro* en el que se suprimen mutaciones sin sentido usando ARNt supresores aminoacilados químicamente. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar el ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido normalmente se realiza en un sistema sin célula que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas y otros reactivos disponibles en el mercado. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson y col., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2722 (1991), Ellman y col.; *Methods Enzymol.* 202:301 (1991), Chung y col., *Science* 259:806 (1993) y Chung y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90: 10145 (1993).

15 En un segundo procedimiento, la traducción se realiza en oocitos de *Xenopus* por microinyección del ARNm mutado y ARNt supresores aminoacilados químicamente (Turcatti y col., *J. Biol. Chem.* 271: 19991 (1996)). Dentro de un tercer procedimiento, se cultivan células *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que se va a reemplazar (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 en la proteína en lugar de su homólogo natural. Véase, Koide y col., *Biocheman.* 33: 7470 (1994). Los restos de aminoácido naturales pueden convertirse en especies no naturales por modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida para expandir adicionalmente la serie de sustituciones (Wynn y Richards, *Protein Sci.* 2: 395 (1993). Puede ser ventajoso estabilizar zcytor17lig para prolongar la semivida de la molécula, particularmente para prolongar la persistencia metabólica en un estado activo. Para conseguir una semivida prolongada, las moléculas de zcytor17lig pueden modificarse químicamente usando procedimientos descritos en el presente documento. La PEGilación es un procedimiento usado comúnmente que se ha demostrado que aumenta la semivida en plasma, aumenta la solubilidad y reduce la antigenicidad e inmunogenicidad (Nucci y col., *Advanced Drug Delivery Reviews* 6: 133-155, 1991 y Lu y col., *Int. J. Peptide Protein Res.* 43: 127-138, 1994).

20 Los restos de aminoácido de zcytor17lig pueden sustituirse por un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no se codifican por el código genético, aminoácidos de origen no natural y aminoácidos no naturales.

25 La presente memoria descriptiva describe fragmentos polipeptídicos o péptidos que comprenden una parte que lleva el epítipo de un polipéptido zcytor17lig descrito en el presente documento. Dichos fragmentos o péptidos pueden comprender un "epítipo inmunogénico", que forma parte de una proteína que induce una respuesta de anticuerpos cuando se usa la proteína entera como inmunógeno. Los péptidos que llevan epítopos inmunogénicos pueden identificarse usando procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, Geysen y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81: 3998 (1983)).

30 Por el contrario, los fragmentos polipeptídicos o péptidos pueden comprender un "epítipo antigénico", que es una región de una molécula de proteína a la que se puede unir específicamente un anticuerpo. Ciertos epítopos consisten en un tramo lineal o contiguo de aminoácidos, y la antigenicidad de dicho epítipo no se altera por agentes desnaturizantes. En la técnica se sabe que pueden usarse péptidos sintéticos relativamente cortos que pueden imitar a los epítopos de una proteína para estimular la producción de anticuerpos contra la proteína (véase, por ejemplo, Sutcliffe y col., *Science* 219: 660 (1983)). Por consiguiente, los péptidos y polipéptidos que llevan epítopos antigénicos descritos en el presente documento son útiles para inducir anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos neutralizadores) que se unen con los polipéptidos descritos en el presente documento. Pueden usarse perfiles de hidrofilia de Hopp/Woods para determinar regiones que tienen el mayor potencial antigénico (Hopp y col., 1981, *ibíd.* y Hopp, 1986, *ibíd.*). Por ejemplo, en zcytor17lig humano, las regiones hidrófilas incluyen los restos de aminoácido 54-59 de la SEC ID N°: 2, los restos de aminoácido 129-134 de la SEC ID N°: 2, los restos de aminoácido 53-58 de la SEC ID N°: 2, los restos de aminoácido 35-40 de la SEC ID N°: 2 y los restos de aminoácido 33-38 de la SEC ID N°: 2. Por ejemplo, en zcytor17lig de ratón, las regiones hidrófilas incluyen los restos de aminoácido 34-39 de la SEC ID N°: 11, los restos de aminoácido 46-51 de la SEC ID N°: 11, los restos de aminoácido 131-136 de la SEC ID N°: 11, los restos de aminoácido 158-163 de la SEC ID N°: 11 y los restos de aminoácido 157-162 de la SEC ID N°: 11.

Los péptidos y polipéptidos que llevan el epítipo antigénico preferentemente contienen al menos cuatro a diez aminoácidos, al menos de diez a catorce aminoácidos, o de aproximadamente catorce a aproximadamente treinta aminoácidos de la SEC ID N°: 2 o la SEC ID N°: 11. Dichos péptidos y polipéptidos que llevan el epítipo pueden producirse por fragmentación de un polipéptido zcytor17lig, o por síntesis química de péptidos, como se describe en el presente documento. Además, pueden seleccionarse epítipos por presentación en fagos de bibliotecas de péptidos aleatorias (véase, por ejemplo, Lane y Stephen, *Curren. Opin. Immunol.* 5: 268 (1993); y Cortese y col., *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 616 (1996)). Se describen procedimientos convencionales para identificar epítipos y producir anticuerpos a partir de péptidos pequeños que comprenden un epítipo, 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 y col. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, páginas 9.3.1 - 9.3.5 y páginas 9.4.1 - 9.4.11 (John Wiley & Sons 1997).

Independientemente de la secuencia de nucleótidos particular de un polinucleótido de zcytor17lig variante, el polinucleótido codifica un polipéptido que se caracteriza por su actividad proliferativa o de diferenciación, su capacidad de inducir o inhibir funciones celulares especializadas o por la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-zcytor17lig o receptor zcytor18. Más específicamente, los polinucleótidos de zcytor17lig variantes codificarán polipéptidos que presentan al menos un 50 %, y preferentemente al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o más de un 99 % de la actividad del polipéptido como se muestra en la SEC ID N°: 2.

Para cualquier polipéptido zcytor17lig, incluyendo variantes y proteínas de fusión, un experto en la materia puede generar fácilmente una secuencia polinucleotídica completamente degenerada que codifique esa variante usando la información expuesta en las Tablas 1 y 2 anteriores.

La presente memoria descriptiva describe diversas fusiones de polipéptidos distintas (y proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones de polipéptidos). Por ejemplo, un polipéptido zcytor17lig puede prepararse como una fusión con una proteína de dimerización como se desvela en las Patentes de Estados Unidos N° 5.155.027 y 5.567.583. Las proteínas de dimerización preferidas a este respecto incluyen dominios de región constante de inmunoglobulina. Las fusiones de inmunoglobulina-polipéptido zcytor17lig pueden expresarse en células modificadas por ingeniería genética (para producir diversos análogos multiméricos de zcytor17lig). Pueden fusionarse dominios auxiliares a polipéptidos zcytor17lig para dirigirlos a células, tejidos o macromoléculas específicas. Por ejemplo, un polipéptido o proteína zcytor17lig podría dirigirse a un tipo celular predeterminado por fusión de un polipéptido zcytor17lig a un ligando que se une específicamente a un receptor en la superficie de esa célula diana). De esta forma, pueden fijarse como dianas, polipéptidos y proteínas para fines de diagnóstico o terapéuticos. Un polipéptido zcytor17lig puede fusionarse a dos o más restos, tales como un marcador de afinidad para la purificación y un dominio de dirección. Las fusiones de polipéptidos también pueden comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase, Tuan y col., *Connective Tissue Research* 34: 1-9, 1996.

Usando los procedimientos analizados en el presente documento, un experto en la materia puede identificar y/o preparar diversos polipéptidos que tienen identidad de secuencia sustancialmente similar con los restos 1-64 ó 24-164 de la SEC ID N°: 2, o fragmentos funcionales y fusiones de los mismos, tales como las hélices A-D (restos 38-152 de la SEC ID N°: 2) en las que dichos polipéptidos o fragmentos o fusiones conservan las propiedades de la proteína de tipo silvestre tal como la capacidad de estimular la proliferación, diferenciación, inducir la función celular especializada o unirse al receptor zcytor17lig o anticuerpos contra zcytor17lig.

Los polipéptidos zcytor17lig descritos en el presente documento, incluyendo polipéptidos de longitud completa, fragmentos funcionales y polipéptidos de fusión pueden producirse en células huésped modificadas por ingeniería genética de acuerdo con técnicas convencionales. Las células huésped adecuadas son los tipos celulares que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y cultivarse, e incluyen bacterias, células fúngicas y células eucariotas superiores cultivadas. Se prefieren células eucariotas, particularmente células cultivadas de organismos pluricelulares. Se describen técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir ADN exógeno en diversas células huésped por Sambrook y col, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y Ausubel y col., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Inc., NY, 1987.

En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido zcytor17lig puede unirse operativamente a otros elementos genéticos necesarios para su expresión, que incluyen generalmente un promotor y terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá comúnmente uno o más marcadores de selección y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la materia reconocerán que dentro de ciertos sistemas pueden proporcionarse marcadores de selección en vectores separados, y puede proporcionarse la replicación del ADN exógeno por integración en el genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores de selección, vectores y otros elementos es una materia de diseño rutinario dentro de la experiencia en la técnica. Muchos de estos elementos se describen en la bibliografía y están disponibles a través de proveedores comerciales.

Para dirigir un polipéptido de zcytor17lig a la ruta de secreción de una célula huésped, se proporciona una secuencia señal de secreción (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector de expresión. La secuencia señal de secreción puede ser la de zcytor17lig o puede proceder de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA) o sintetizarse *de novo*. La secuencia señal de secreción está unida operativamente a la secuencia de ADN de zcytor17lig, es decir, las dos secuencias están unidas en el marco de lectura correcta y colocadas para dirigir el polipéptido recién sintetizado a la ruta de secreción de la célula huésped. Las secuencias señal de secreción comúnmente se colocan en posición 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal de secreción pueden colocarse en otros sitios en la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch y col., Patente de Estados Unidos N° 5.037.743; Holland y col., Patente de Estados Unidos N° 5.143.830).

Como alternativa, la secuencia señal de secreción contenida en los polipéptidos descritos en el presente documento se usa para dirigir otros polipéptidos a la ruta de secreción. La presente invención proporciona dichos polipéptidos de fusión. Puede fabricarse un polipéptido de fusión señal en el que una secuencia señal de secreción derivada del resto de aminoácido 1-23 de la SEC ID N°: 2 o restos 1-23 de la SEC ID N°: 11 se une operativamente a una secuencia de ADN que codifica otro polipéptido usando procedimientos conocidos en la técnica y desvelados en el presente documento. La secuencia señal de secreción contenida en los polipéptidos de fusión de la presente invención preferentemente se fusiona en el extremo amino terminal con un péptido adicional para dirigir el péptido adicional a la ruta 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 secretada. Dichas fusiones pueden usarse *in vivo* o *in vitro* para dirigir péptidos a la ruta de secreción.

Son huéspedes adecuados células de mamífero cultivadas. Los procedimientos para introducir ADN exógeno en células huésped de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato cálcico (Wigler y col., Cell 14: 725, 1978; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981; Graham y Van der Eb, Virology 52: 456, 1973), electroporación (Neumann y col., EMBO J. 1: 841-5, 1982), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel y col., *ibíd.*) y transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson y col., Focus 15: 73, 1993; Ciccarone y col., Focus 15: 80, 1993), y vectores víricos (Miller y Rosman, Bio-Techniques 7: 980-90, 1989; Wang y Finer, Nature Med. 2: 714-6, 1996). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas se desvela, por ejemplo, por Levinson y col., Patente de Estados Unidos N° 4.713.339; Hagen y col., Patente de Estados Unidos N° 4.784.950; Palmiter y col., Patente de Estados Unidos N° 4.579.821; y Ringold, Patente de Estados Unidos N° 4.656.134. Las células cultivadas de mamífero adecuadas incluyen las COS-1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC N° CRL 1651), BHK (ATCC N° CRL 1632), BHK 570 (ATCC No. CRL 10314), 293 (ATCC N° CRL 1573; Graham y col., J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977) y líneas de células de ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1; ATCC N° CCL 61). En la técnica se conocen líneas celulares adecuadas adicionales y están disponibles en depósitos públicos tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA. En general, se prefieren promotores de la transcripción fuerte, tales como promotores de SV-40 o citomegalovirus. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los de los genes de metalotioneína (Patentes de Estados Unidos N° 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor tardío principal de adenovirus.

Generalmente se usa selección con fármacos para seleccionar células de mamífero cultivadas en las que se ha insertado un ADN extraño. Dichas células comúnmente se denominan "transfectantes". Las células que se han cultivado en presencia del agente selectivo y pueden pasar el gen de interés a su descendencia se denominan "transfectantes estables". Un marcador de selección preferido es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección se realiza en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similar. También pueden usarse sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un procedimiento denominado "amplificación". La amplificación se realiza cultivando transfectantes en presencia de un bajo nivel del agente de selección y después aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar las células que producen altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador de selección amplificable preferido es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia a metotrexato. También pueden usarse otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a higromicina, resistencia a multifármaco, puromicina acetiltransferasa). Pueden usarse marcadores alternativos que introducen un fenotipo alterado, tal como proteína fluorescente verde, o proteínas de la superficie celular tales como CD4, CD8, MHC de Clase I, fosfatasa alcalina placentaria para separar las células transfectadas de las células no transfectadas por medios tales como clasificación por FACS o tecnología de separación con perlas magnéticas.

También pueden usarse como huéspedes otras células eucariotas superiores, incluyendo células vegetales, células de insectos y células aviares. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como vector para expresar genes en células vegetales se ha revisado por Sinkar y col., J. Biosci. (Bangalore) 11: 47-58, 1987. Guarino y col., Patente de Estados Unidos N° 5.162.222 y publicación WIPO N° WO 94/06463 desvelan la transformación de células de insectos y la producción de polipéptidos extraños en su interior. Las células de insectos pueden infectarse con baculovirus recombinante, comúnmente derivado del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (Ac-NPV). Véase, King, L.A. y Possee, R.D., The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Londres, Chapman & Hall; O'Reilly, D.R. y col.; Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Nueva York, Oxford University Press., 1994; y, Richardson, C. D., Ed., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995. El segundo procedimiento para obtener baculovirus recombinante usa un sistema basado en

transposones descrito por Luckow (Luckow, V.A. y col., J Virol 67: 4566-79, 1993). Este sistema se vende en el kit Bac-to-Bac (Life Technologies, Rockville, MD). Este sistema usa un vector de transferencia, pFastBac1™ (Life Technologies) que contiene un transposón Tn7 para mover el ADN que codifica el polipéptido zcytor17lig al interior del genoma de un baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande denominado "bácmido". El vector de transferencia pFastBac1™ usa el promotor de la polihedrina AcNPV para dirigir la expresión del gen de interés, en este caso zcytor17lig. Sin embargo, pFastBac1™ puede modificarse en un grado considerable. El promotor de la polihedrina puede retirarse y sustituirse por el promotor de la proteína básica de baculovirus (también conocido como promotor *Pcor*, p6.9 o MP) que se expresa antes en la infección de baculovirus, y ha mostrado ser ventajoso para expresar proteínas secretadas. Véase, Hill-Perkins, M.S. y Possee, R.D., J. Gen. Virol. 71: 971-6, 1990; Bonning, B.C. y col., J. Gen. Virol. 75:1 551-6, 1994; y, Chazenbalk, G.D., y Rapoport, B., J. Biol. Chem, 270:1 543-9, 1995. En dichas construcciones de vectores de transferencia, puede usarse una versión corta o larga del promotor de la proteína básica. Además, pueden construirse vectores de transferencia que reemplazan la secuencia señal de secreción de zcytor17lig nativo con secuencias señal de secreción procedentes de proteínas de insectos. Por ejemplo, puede usarse una secuencia señal de secreción de Ecdisteroide Glucosiltransferasa (EGT), Melitina de abeja melífera (Invitrogen, Carlsbad, CA), o gp67 de baculovirus (PharMingen, San Diego, CA) en construcciones para reemplazar la secuencia señal de secreción de zcytor17lig nativa. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en fase con ADN que codifica un marcador de epítipo en el extremo C o N del polipéptido zcytor17lig expresado, por ejemplo, un marcador de epítipo Glu-Glu (Grussenmeyer, T. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952-4, 1985). Usando técnicas conocidas en este campo, un vector de transferencia que contiene zcytor17lig se usa para transformar *E. Coli* y se exploran los bácmidos que contienen un gen lacZ interrumpido que indica un baculovirus recombinante. El ADN de bácmido que contiene el genoma de baculovirus recombinante se aísla, usando técnicas comunes, y se usa para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, por ejemplo, células Sf9. Posteriormente se producen virus recombinantes que expresan zcytor17lig. Se preparan reservas de virus recombinante por procedimientos usados comúnmente en la técnica.

El virus recombinante se usa para infectar células huésped, normalmente una línea celular derivada del cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*. Véase, en general, Glick y Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D.C., 1994. Otra línea celular adecuada es la línea celular High FiveO™ (Invitrogen) derivada de *Trichoplusia ni* (Patente de Estados Unidos N° 5.300.435).

También pueden usarse células fúngicas, incluyendo células de levadura. Las especies de levadura con un interés particular a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Se desvelan procedimientos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de las mismas, por ejemplo por Kawasaki, Patente de Estados Unidos N° 4.599.311; Kawasaki y col., Patente de Estados Unidos N° 4.931.373; Brake, Patente de Estados Unidos N° 4.870.008; Welch y col., Patente de Estados Unidos N° 5.037.743; y Murmy y col., Patente de Estados Unidos N° 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por el fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente resistencia a fármacos o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema de vector preferido para uso en (por ejemplo, leucina). Un sistema de vector preferido para uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema de vector *POT1* desvelado por Kawasaki y col. (Patente de Estados Unidos N° 4.931.373), que permite seleccionar las células transformadas por crecimiento en medio que contiene glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para su uso en levadura incluyen los de genes de enzimas glicolíticas (véase, por ejemplo, Kawasaki, Patente de Estados Unidos N° 4.599.311; Kingsman y col., Patente de Estados Unidos N° 4.615.974; y Bitter, Patente de Estados Unidos N° 4.977.092) y genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse también las Patentes de Estados Unidos N° 4.990.446; 5.063.154; 5.139.936 y 4.661.454. 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 guillermoidii* y *Candida maltosa*. Véase, por ejemplo, Gleeson y col., J. Gen. Microbiol. 132: 3459-65, 1986 y Gregg, Patente de Estados Unidos N° 4.882.279. Pueden usarse células de *Aspergillus* de acuerdo con los procedimientos de McKnight y col., Patente de Estados Unidos N° 4.935.349. Se desvelan procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum* por Sumino y col., Patente de Estados Unidos N° 5.162.228. Se desvelan procedimientos para transformar *Neurospora* por Lambowitz, Patente de Estados Unidos N° 4.486.533.

El uso de *Pichia methanolica* como huésped para la producción de proteínas recombinantes se desvela en las Publicaciones WIPO N° WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 y WO 98/02565. Las moléculas de ADN para su uso en la transformación de *P. methanolica* comúnmente se prepararán como plásmidos circulares, bicatenarios, que preferentemente se linealizan antes de la transformación. Para la producción de polipéptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y terminador en el plásmido sean los un gen de *P. methanolica*, tal como un gen de uso de alcohol de *P. methanolica* (*AUG1* o *AUG2*). Otros promotores útiles incluyen los de la dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD), y catalasa (CAT). Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma del huésped, se prefiere tener el segmento de expresión entero del plásmido flanqueado en los dos extremos por secuencias de ADN del huésped. Un marcador de selección preferido para su uso en *Pichia methanolica* es un gen *ADE2* de *P. methanolica*, que codifica la fosforribosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), que permite que las células huésped *ade2* crezcan en ausencia de adenina. Para los procedimientos industriales a gran escala en los que es deseable minimizar el uso de metanol, se prefiere usar células huésped de proteínas secretadas, se prefieren células huésped deficientes en genes de proteasas vacuolares (*PEP4* y *PRB1*). Se usa electroporación

para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un polipéptido de interés en células de *P. methanolica*. Se prefiere transformar las células de *P. methanolica* por electroporación usando un campo eléctrico de pulsos, que se reduce exponencialmente que tiene una intensidad de campo de 2,5 a 4,5 kV/cm, preferentemente de aproximadamente 3,75 kV/cm y una constante de tiempo (Ω) de 1 a 40 milisegundos, más preferentemente de aproximadamente 20 milisegundos.

También son células huésped útiles, células huésped procariotas, incluyendo cepas de la bacteria *Escherichia coli*, *Bacillus* y otros géneros. En este campo son bien conocidas técnicas para transformar estos huéspedes y expresar secuencias de ADN extrañas clonadas en su interior (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *ibid.*). Cuando se expresa un polipéptido zcytor17lig en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede quedar retenido en el citoplasma, normalmente como gránulos insolubles, o puede dirigirse al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se lisan, y los gránulos se recuperan y desnaturalizan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado después puede plegarse y dimerizarse diluyendo el desnaturalizante, tal como por diálisis frente a una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguido de diálisis frente a una solución salina tamponada. En el último caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional rompiendo las células (por ejemplo, por sonicación o choque osmótico) para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína, evitando de esta manera la necesidad de desnaturalización y plegamiento.

Las células huésped transformadas o transfectadas se cultivan de acuerdo con procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes necesarios para el crecimiento de las células huésped elegidas. En la técnica se conoce diversos medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos, y generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios también pueden contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, cuando sea necesario. El medio de crecimiento generalmente seleccionará las células que contienen el ADN añadido exógenamente, por ejemplo, por selección con fármacos o deficiencia en un nutriente esencial que se complementa por el marcador de selección que lleva el vector de expresión o se ha co-transfectado en la célula huésped. Las células de *P. methanolica* se cultivan en un medio que comprende fuentes de carbono adecuadas, nitrógeno y nutrientes de oligoelementos a una temperatura de aproximadamente 25 °C a 35 °C. Los cultivos líquidos se proporcionan con suficiente aireación por medios convencionales, tales como agitación de pequeños matraces o rociado de fermentadores. Un medio de cultivo preferido para *P. methanolica* es YEPD (2 % de D-glucosa, 2 % de Bacto™ Peptona (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1 % de extracto de levadura Bacto™ (Difco Laboratories), 0,004 % de adenina y 0,006 % de L-leucina).

Se prefiere purificar polipéptidos hasta una pureza ≥ 80 %, más preferentemente hasta una pureza ≥ 90 %, incluso más preferentemente hasta una pureza ≥ 95 %, y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro, es decir, con una pureza mayor del 99,9 % con respecto a las macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y sin agentes infecciosos y pirogénicos. Preferentemente, un polipéptido purificado carece sustancialmente de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal.

Los polipéptidos zcytor17lig recombinantes expresados (o polipéptidos zcytor17lig quiméricos) pueden purificarse usando fraccionamiento y/o procedimientos y medios de purificación convencionales. Puede usarse precipitación con sulfato amónico y extracción con ácido o caótopro para el fraccionamiento de las muestras. Las etapas de purificación ejemplares pueden incluir hidroxapatita, exclusión por tamaño, FPLC y cromatografía líquida de fase inversa de alta resolución. Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, especialmente sílices y similares. Se prefieren PEI, DEAE, QAE y derivados de Q. Los medios cromatográficos ejemplares incluyen los medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como Phenil-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) y similares; o resinas poliacrílicas tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticulada, resinas de poliacrilamida reticulada con perlas de poliestireno y similares que son insolubles en las condiciones en las que se van a usar. Estos soportes pueden modificarse con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de carbohidrato. Los ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazina y derivados de carboxilo y amino para químicas de acoplamiento de carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son bien conocidos y se usan ampliamente en la técnica, y se pueden adquirir en proveedores comerciales. Los procedimientos para unir polipéptidos receptores a medios de soporte son bien conocidos en la técnica. La selección de un procedimiento particular es materia de un diseño rutinario y se determina en parte por las propiedades del soporte elegido. Véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden aislarse por explotación de sus propiedades físicas o bioquímicas. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de adsorción por ión metálico inmovilizado (IMAC) para purificar proteínas ricas en histidina, incluyendo las que comprenden marcadores de polihistidina. En resumen, un gel primero se carga con iones metálicos divalentes para formar un quelato (Sulkowski, *Trends in Biochem. 3: 1-7*, 1985). En esta matriz de adsorberán proteínas ricas en histidina con diferentes afinidades, dependiendo del ión metálico usado, y se eluirán por elución competitiva, reduciendo el pH, o mediante el uso de agentes quelantes

fuertes. Otros procedimientos de purificación incluyen purificación de proteínas glicosiladas por cromatografía de afinidad de lectina y cromatografía de intercambio iónico (Methods in Enzymol., Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, págs. 529-39) y uso del receptor zcytor17 soluble. Puede construirse una fusión del polipéptido de interés y un marcador de afinidad (por ejemplo, proteína de unión de maltosa, un dominio de inmunoglobulina) para facilitar la purificación.

Además, usando procedimientos descritos en la técnica, se construyen fusiones de polipéptidos, o proteínas zcytor17lig híbridas usando regiones o dominios del zcytor17lig de la invención en combinación con los de otras proteínas de la familia de citocinas humanas (por ejemplo interleucinas o GM-CSF), o proteínas heterólogas (Sambrook y col., *ibíd.*, Altschul y col., *ibíd.*, Picard, Cur. Opin. Biology, 5: 511-5, 1994, y referencias citadas en este documento). Estos procedimientos permiten la determinación de la importancia biológica de dominios o regiones de mayor tamaño en un polipéptido de interés. Dichos híbridos pueden alterar la cinética de reacción, la unión, reducir o expandir la especificidad del sustrato, o alterar la localización tisular y celular de un polipéptido, y puede aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

Las proteínas de fusión pueden prepararse por procedimientos conocidos por los expertos en la materia preparando cada componente de la proteína de fusión y conjugándolos químicamente. Como alternativa, puede generarse un polinucleótido que codifica los dos componentes de la proteína de fusión en el marco de lectura apropiada usando técnicas conocidas y expresarse por los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede intercambiarse parte o todo de una hélice que confiere una función biológica entre zcytor17lig de la presente invención con las hélices funcionalmente equivalentes de otro miembro de la familia, tal como IL-15, IL-2, L-4 o GMS-CSF. Estos componentes incluyen, pero sin limitación, la secuencia señal de secreción; hélices A, B, C, D; bucles A/B, B/C, C/D; de citocinas de cuatro haces helicoidales. Sería de esperar que dichas proteínas de fusión tuvieran un perfil funcional biológico igual o similar al de los polipéptidos de la presente invención u otras proteínas de la familia de citocinas de cuatro haces helicoidales, dependiendo de la fusión construida. Además, dichas proteínas de fusión pueden presentar otras propiedades como se desvela en el presente documento.

Pueden usarse técnicas de clonación y de biología molecular convencionales para intercambiar los dominios equivalentes entre el polipéptido zcytor17lig y los polipéptidos con los que se fusionan. En general, un segmento de ADN que codifica un dominio de interés, por ejemplo, las hélices A a D de zcytor17lig, u otro dominio descrito en el presente documento, se une operativamente en fase con al menos otro segmento de ADN que codifica un polipéptido adicional, (por ejemplo, un dominio o región de otra citocina, tal como la IL-2 o similar), y se inserta en el vector de expresión apropiado, como se describe en el presente documento. En general, las construcciones de ADN se preparan de tal forma que varios segmentos de ADN que codifican las regiones correspondientes de un polipéptido se unan operativamente en fase para obtener una sola construcción que codifique la proteína de fusión entera, o una parte funcional de la misma. Por ejemplo, una construcción de ADN codificaría desde el extremo N al extremo C una proteína de fusión que comprende un polipéptido señal seguido de una proteína de fusión de citocina de cuatro haces helicoidales madura que contiene la hélice A, seguida de la hélice B, seguida de la hélice C, seguida de la hélice D. Dichas proteínas de fusión pueden expresarse, aislarse y ensayarse con respecto a la actividad como se describe en el presente documento.

También pueden prepararse polipéptidos zcytor17lig o fragmentos de los mismos mediante síntesis química, los polipéptidos zcytor17lig pueden ser monómeros o multímeros; glicosilados o no glicosilados; pegilados o no pegilados; y pueden incluir o no un resto de aminoácido metionina inicial. Por ejemplo, los polipéptidos pueden prepararse por síntesis de péptidos en fase sólida, por ejemplo como se desvela por Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963.

La actividad de las moléculas descritas en el presente documento puede medirse usando diversos ensayos que miden la proliferación y/o unión a células que expresan el receptor zcytor17lig. Son de un interés particular los cambios en las células dependientes de zcytor17lig. Las líneas celulares adecuadas a modificar por ingeniería genética para ser dependientes de zcytor17lig incluyen la línea celular BaF3 dependiente de IL-3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot y col., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), FDC-P1 (Hapel y col., Blood 64: 786-790, 1984) y MO7e (Kiss y col., Leukemia 7: 235-240, 1993). Pueden establecerse líneas celulares dependientes de factores de crecimiento de acuerdo con procedimientos publicados (por ejemplo Greenberger y col., Leukemia Res. 8: 363-375, 1984; Dexter y col., en Baum y col. Eds., Experimental Hematology Today, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980).

Las proteínas descritas en el presente documento son útiles para estimular la proliferación, activación, diferenciación y/o inducción o inhibición de la función celular especializada de células de la homeostasis implicada en la hematopoyesis y función inmune. En particular, los polipéptidos zcytor17lig son útiles para estimular la proliferación, activación, diferenciación, inducción, o inhibición de funciones celulares especializadas de células de los linajes hematopoyéticos, incluyendo, pero sin limitación, linfocitos T, linfocitos B, monocitos/macrófagos, células NK, neutrófilos, células endoteliales, fibroblastos, eosinófilos, condrocitos, mastocitos, células de langerhan, monocitos y macrófagos, así como células epiteliales. Las células epiteliales incluyen, por ejemplo, ameloblastos, células principales, cromatóforos, células enterocromafines, células de tipo enterocromafin, células caliciformes, células de la granulosa, queratinocitos, células dendríticas, células laberínticas de soporte, melanocitos, células de Merkel, células de Paneth, células parietales, células de Sertoli y similares. La proliferación y/o diferenciación de células

hematopoyéticas puede medirse *in vitro* usando células cultivadas o *in vivo* mediante la administración de moléculas descritas en el presente documento al modelo animal apropiado. Los ensayos que miden la proliferación o diferenciación celular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ensayos que miden la proliferación incluyen ensayos tales como la quimiosensibilidad a un colorante rojo neutro (Cavanaugh y col., *Investigational New Drugs* 8: 347-354, 1990), incorporación de nucleótidos radiomarcados (Cook y col., *Analytical Biochem.* 179: 1-7, 1989), incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el ADN de células proliferativas (Porstmann y col., *J. Immunol. Methods* 82: 169-179, 1985) y el uso de sales de tetrazolio (Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65: 55-63, 1983; Alley y col., *Cancer Res.* 48: 589-601, 1988; Marshall y col., *Growth Reg.* 5: 69-84, 1995; y Scudiero y col., *Cancer Res.* 48: 4827-4833, 1988). Los ensayos para medir la diferenciación incluyen, por ejemplo, la medición de marcadores de la superficie celular asociados con la expresión específica de fase de un tejido, actividad enzimática, actividad funcional o cambios morfológicos (Watt, *FASEB*, 5: 281-284, 1991; Francis, *Differentiation* 57: 63-75, 1994; Raes, *Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses*, 161-171, 1989).

Las moléculas descritas en el presente documento pueden ensayarse *in vivo* usando sistemas de liberación víricos. Los virus ejemplares para este fin incluyen adenovirus, herpesvirus, retrovirus, vaccinia virus y virus adeno-asociados (VAA). El adenovirus, un virus de ADN bicatenario, actualmente es el vector de transferencia génica mejor estudiado para la administración de un ácido nucleico heterólogo (como revisión, véase T.C. Becker y col., *Meth. Cell Biol.* 43: 161-89, 1994; y J.T. Douglas y D.T. Curiel, *Science & Medicine* 4: 44-53, 1997).

Como ligando, la actividad del polipéptido zcytor17lig puede medirse por un microfisiómetro biosensor basado en silicio que mide la velocidad de acidificación extracelular o la excreción de protones asociada con la unión al receptor y las posteriores respuestas celulares fisiológicas. Un dispositivo ejemplar es el Microfisiómetro Cytosensor™ fabricado por Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Pueden medirse diversas respuestas celulares, tales como la proliferación celular, el transporte iónico, la producción de energía, respuestas inflamatorias, actividad reguladora y de receptores y similares por este procedimiento. Véase, por ejemplo, McConnell, H.M. y col., *Science* 257: 1906-1912, 1992; Pitchford, S. y col., *Meth. Enzymol.* 228: 84-108, 1997; Arimilli, S. y col., *J. Immunol. Meth.* 212: 49-59, 1998; Van Liefde, I. y col., *Eur. J. Pharmacol.* 346: 87-95, 1998.

Además, zcytor17lig puede usarse para identificar células, tejidos o líneas celulares que responden a una ruta estimulada por zcytor17lig. El microfisiómetro, descrito anteriormente, puede usarse para identificar rápidamente células que respondan a ligandos, tales como células que responden a cytor17lig de la presente invención. Las células pueden cultivarse en presencia o ausencia del polipéptido cytor17lig. Las células que inducen un cambio medible en la acidificación extracelular en presencia de zcytor17lig responden a zcytor17lig. Dichas células o líneas celulares pueden usarse para identificar antagonistas y agonistas del polipéptido zcytor17lig como se ha descrito anteriormente.

En vista de la distribución tisular observada para agonistas del receptor zcytor17 (incluyendo el zcytor17lig natural/sustrato/cofactor/etc.) y/o sus antagonistas tienen un potencial enorme en aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Los compuestos identificados como agonistas de zcytor17lig son útiles para la expansión, proliferación, activación, diferenciación y/o inducción o inhibición de funciones celulares especializadas de células implicadas en la homeostasis de la hematopoyesis y la función inmune. Por ejemplo, zcytor17lig y los compuestos agonistas son útiles como componentes de medios de cultivo celular definidos, y pueden usarse solos o en combinación con otras citocinas y hormonas para reemplazar el suero que comúnmente se usa en el cultivo celular. De esta manera, los agonistas son útiles para promover específicamente el crecimiento y/o desarrollo de linfocitos T, linfocitos B, monocitos/macrófagos, células NK, linfocitos citotóxicos y otras células del linaje linfoide y mieloides en cultivo.

Los antagonistas también son útiles como reactivos de investigación para caracterizar sitios de interacción ligando-receptor. Los antagonistas son útiles para inhibir la expansión, proliferación, activación y/o diferenciación de células implicadas en la regulación de la hematopoyesis. Los inhibidores de la actividad de zcytor17lig (antagonistas de zcytor17lig) incluyen anticuerpos antizcytor17lig y receptores de zcytor17lig solubles, así como otros agentes peptídicos y no peptídicos (incluyendo ribozimas).

Zcytor17lig también puede usarse para identificar inhibidores (antagonistas) de su actividad. Se añaden compuestos de ensayo a los ensayos desvelados en el presente documento para identificar compuestos que inhiben la actividad de zcytor17lig. Además de los ensayos desvelados en el presente documento, pueden ensayarse muestras con respecto a la inhibición de la actividad de zcytor17lig dentro de diversos ensayos diseñados para medir la unión al receptor, la estimulación/inhibición de respuestas celulares dependientes de zcytor17lig o la proliferación de células que expresan el receptor zcytor17.

Un polipéptido zcytor17lig puede expresarse como una fusión con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, normalmente un fragmento F_c, que contiene dos dominios de región constante y carece de la región variable. Se desvelan procedimientos para preparar dichas fusiones en las Patentes de Estados Unidos N° 5.155.027 y 5.567.584. Dichas fusiones normalmente se secretan como moléculas multiméricas en las que las partes F_c están unidas por enlace disulfuro entre sí y dos polipéptidos no Ig están dispuestos muy cerca entre sí. Pueden usarse fusiones de este tipo, por ejemplo, para dimerización, para aumentar la estabilidad y la semivida *in vivo*, para purificar un ligando por afinidad, como herramienta de ensayo *in vitro* o como antagonista. Para uso en ensayos, las quimeras se unen a un soporte a través de la región F_c y se usan en un formato ELISA.

- Un polipéptido de unión a zcytor17lig también puede usarse para la purificación del ligando. El polipéptido se inmoviliza en un soporte sólido, tal como perlas de agarosa, agarosa reticulada, vidrio, resinas celulósicas, resinas basadas en sílice, poliestireno, poliacrilamida reticulada o materiales similares que son estables en las condiciones de uso. En la técnica se conocen procedimientos para unir polipéptidos a soportes sólidos e incluyen química de aminos, activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, y activación con hidrazina. El medio resultante generalmente se configurará en forma de una columna, y los fluidos que contienen ligandos se pasan a través de la columna una o más veces para permitir que el ligando se una al polipéptido receptor. El ligando después se eluye usando cambios en la concentración de sal, agentes caotrópicos (guanidina HCl) o el pH para alterar la unión ligando-receptor.
- Ventajosamente puede emplearse un sistema de ensayo que usa un receptor de unión a ligando (o un anticuerpo, un miembro de un par complemento/anticomplemento) o un fragmento de unión del mismo, y un instrumento biosensor disponible en el mercado (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Dicho receptor, anticuerpo, miembro de par complemento/anticomplemento o fragmento se inmoviliza en la superficie de una microplaca receptora. Se desvela el uso de este instrumento por Karlsson, J. *Immunol. Methods* 145: 229-40, 1991 y Cunningham y Wells, J. *Mol. Biol.* 234: 554-63, 1993. Un receptor, anticuerpo, miembro o fragmento se une covalentemente, usando química de amina o sulfhidrilo, a fibras de dextrano que están unidas a una película de oro dentro de la celda de flujo. Se pasa una muestra de ensayo a través de la celda. Si en la muestra está presente un ligando, un epítipo o miembro opuesto del par complemento/anticomplemento, se unirá al receptor, anticuerpo o miembro inmovilizado, respectivamente, provocando un cambio en el índice de refracción del medio, que se detecta como un cambio en la resonancia de plasmón superficial de la película de oro. Este sistema permite la determinación de velocidades de asociación y disociación, a partir de las cuales puede calcularse la afinidad de unión, y la evaluación de la estequiometría de unión. Como alternativa, la unión ligando/receptor puede analizarse usando la tecnología SELDI(TM) (CIPHERGEN, Inc., Palo Alto, CA).
- También pueden usarse polipéptidos receptores de unión a ligando dentro de otros sistemas de ensayo bien conocidos en la técnica. Dichos sistemas incluyen el análisis de Scatchard para la determinación de la afinidad de unión (véase Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-72, 1949) y ensayos calorimétricos (Cunningham y col., *Science* 253:545-48, 1991; Cunningham y col., *Science* 245: 821-25, 1991).
- También pueden usarse polipéptidos zcytor17lig para preparar anticuerpos que se unen a epítopos, péptidos o polipéptidos zcytor17lig. El polipéptido zcytor17lig o fragmento del mismo sirve como antígeno (inmunógeno) para inocular en un animal e inducir una respuesta inmune. Dichos anticuerpos pueden usarse para bloquear la acción biológica de zcytor17lig pro-inflamatorio y son útiles como terapias antiinflamatorias en diversas enfermedades como se describe en el presente documento. Un experto en la materia reconocerá que los polipéptidos que llevan epítopos antigénicos contienen una secuencia de al menos 6, preferentemente al menos 9 y más preferentemente de al menos 15 a aproximadamente 30 restos de aminoácido contiguos de un polipéptido zcytor17lig (por ejemplo SEC ID N°: 2). Se incluyen polipéptidos que comprenden una parte mayor de un polipéptido zcytor17lig, es decir, de 30 a 100 restos hasta la longitud entera de la secuencia de aminoácidos. Los antígenos o epítopos inmunogénicos también pueden incluir marcadores unidos, adyuvantes, vehículos y excipientes, como se describe en el presente documento. Los antígenos adecuados incluyen el polipéptido zcytor17lig codificado por la SEC ID N°: 2 desde el aminoácido número 24 al aminoácido número 164, o un fragmento de 9 a 141 aminoácidos contiguo del mismo. Otros antígenos adecuados incluyen el zcytor17lig de longitud completa maduro, las hélices A-D y hélices A, B, C y D múltiples o individuales de la estructura de zcytor17lig de cuatro haces helicoidales, como se describe en el presente documento. Los péptidos preferidos para uso como antígenos son péptidos hidrófilos tales como los predichos por un experto en la materia a partir de un gráfico de hidrofobia, como se describe en el presente documento, por ejemplo, los restos de aminoácido 114-119, 101-105, 126-131, 113-11 y 158-162 de la SEC ID N°: 2; y los restos de aminoácido 34-39, 46-51, 131-136, 158-163 y 157-162 of SEC ID N°: 11. Además, los epítopos antigénicos de zcytor17lig predichos por un gráfico de Jameson-Wolf, por ejemplo, usando el programa DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI) sirven como antígenos preferidos, y los determina fácilmente un experto en la materia.
- Pueden aislarse anticuerpos de una respuesta inmune generada por inoculación de un animal con estos antígenos como se describe en el presente documento. Los procedimientos para preparar y aislar anticuerpos policlonales y monoclonales son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Cooligan, y col. (eds.), *National Institutes of Health, John Wiley y Sons, Inc.*, 1995; Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Hurrell, J. G. R., Ed., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982.
- Como será evidente para un experto en la materia, pueden generarse anticuerpos policlonales por inoculación de diversos animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas con un polipéptido zcytor17lig o un fragmento del mismo. La inmunogenicidad de un polipéptido zcytor17lig puede aumentarse mediante el uso de un adyuvante, tal como alumbre (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para la inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de zcytor17lig o una parte del mismo con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una parte del mismo. Si la parte de polipéptido es de "tipo hapteno", dicha parte puede unirse ventajosamente o asociarse a un

soporte macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o toxoide tetánico) para inmunización.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno, tales como fragmentos proteolíticos $F(ab')_2$ y Fab. También se incluyen anticuerpos intactos modificados por ingeniería genética o fragmentos, tales como anticuerpos quiméricos, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios y similares, así como péptidos y polipéptidos de unión a antígeno sintéticos. Los anticuerpos no humanos pueden humanizarse por injerto de CDR no humanas en regiones marco y constantes humanas, o por incorporación de los dominios variables no humanos enteros (opcionalmente "cubriéndolos" con una superficie de tipo humano por reemplazo de restos expuestos, siendo el resultado un anticuerpo "revestido"). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden conservar restos no humanos dentro de los dominios marco de la región variable humana para aumentar las características de unión apropiadas. Mediante la humanización de anticuerpos, puede aumentarse la semivida biológica y se reduce el potencial de reacciones inmunes adversas tras la administración a seres humanos. Además, pueden producirse anticuerpos humanos en animales transgénicos no humanos que se han modificado por ingeniería genética para contener genes de inmunoglobulina humana como se desvela en la publicación WIPO N° WO 98/24893. Se prefiere que los genes de inmunoglobulina endógenos en estos animales se hayan inactivado o eliminado, tal como por recombinación homóloga.

Los anticuerpos se consideran de unión específica si: 1) presentan un nivel umbral de actividad de unión y 2) no presentan reacción cruzada significativa con moléculas polipeptídicas relacionadas. Se determina un nivel umbral de unión si los anticuerpos anti-zcytor17lig del presente documento se unen a un polipéptido, péptido o epítipo de zcytor17lig con una afinidad de al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión al polipéptido de control (no-zcytor17lig). Se prefiere que los anticuerpos presenten 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 aún más preferentemente $10^9 M^{-1}$ o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarse fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, por análisis de Scatchard (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

Si los anticuerpos anti-zcytor17lig no presentan reacción cruzada significativa con moléculas polipeptídicas relacionadas se demuestra, por ejemplo, mediante el anticuerpo que detecta el polipéptido zcytor17lig, pero no polipéptidos relacionados conocidos usando un análisis de transferencia de Western (Ausubel y col., *ibid.*). Son ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos los desvelados en la técnica anterior, tales como ortólogos conocidos, y parálogos, y miembros conocidos similares de una familia de proteínas. La exploración también puede realizarse usando zcytor17lig no humano y polipéptidos mutantes zcytor17lig. Además, pueden "explorarse anticuerpos contra" polipéptidos relacionados conocidos, para aislar una población que se una específicamente a los polipéptidos zcytor17lig. Por ejemplo, se adsorben anticuerpos inducidos contra zcytor17lig en polipéptidos relacionados adheridos a una matriz insoluble; los anticuerpos específicos para zcytor17lig fluirán a través de la matriz en las condiciones tamponantes apropiadas. La exploración permite el aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales que no presentan reacción cruzada con polipéptidos muy relacionados conocidos (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, y col. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley y Sons, Inc., 1995). La exploración y aislamiento de anticuerpos específicos es bien conocida en la técnica. Véase, Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff y col., Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin y col., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984. Específicamente, puede detectarse la unión de anticuerpos anti-zcytor17lig por varios procedimientos de la técnica, y se desvelan más adelante.

Puede usarse diversos ensayos conocidos por los expertos en la materia para detectar anticuerpos que se unen a proteínas o polipéptidos zcytor17lig. Se describen ensayos ejemplares con detalle en Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de dichos ensayos incluyen: inmunolectroforesis concurrente, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), ensayo de transferencia puntual (dot blot) o transferencia de Western, inhibición o ensayo competitivo y ensayo de tipo sándwich. Además, los anticuerpos pueden explorarse con respecto a la unión a la proteína o polipéptido zcytor17lig de tipo silvestre frente al mutante.

Los anticuerpos contra zcytor17lig pueden usarse para marcar células que expresan zcytor17lig; para aislar zcytor17lig por purificación de afinidad; para ensayos de diagnóstico para determinar los niveles circulantes de polipéptidos zcytor17lig; para detectar o cuantificar zcytor17lig soluble como un marcador de la patología o enfermedad subyacente; en procedimientos analíticos que emplean FACS; para explorar bibliotecas de expresión; para generar anticuerpos anti-idiotípicos; y como anticuerpos neutralizadores o como antagonistas para bloquear la actividad de zcytor17lig *in vitro* e *in vivo*. Los marcadores o señales directas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; los marcadores o señales indirectas pueden presentar el uso de biotina-avidina u otros pares complemento/anticomplemento como intermedios. Los anticuerpos del presente documento también pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados pueden usarse para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas *in vivo*. Además, pueden usarse anticuerpos contra zcytor17lig o fragmentos del mismo *in vitro* para detectar zcytor17lig desnaturalizado o fragmentos del mismo en

ensayos, por ejemplo, Transferencias de Western u otros ensayos conocidos en la técnica.

Las moléculas detectables adecuadas pueden unirse directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo, e incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas pueden unirse directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo, e incluyen toxinas bacterianas o de plantas (por ejemplo, toxina diftérica, saporina, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y similares), así como radionúclidos terapéuticos, tales como yodo-131, renio-188 o itrio-90 (unidos directamente al polipéptido o anticuerpo, o unidos indirectamente por medio de un resto quelante, por ejemplo). Los polipéptidos o anticuerpos también pueden conjugarse con fármacos citotóxicos tales como adriamicina. Para la unión indirecta de una molécula detectable o citotóxica, la molécula detectable o citotóxica puede conjugarse con un miembro de un parte complementario/anticomplementario, estando el otro miembro unido a la parte de polipéptido o anticuerpo. Para estos fines, un par complementario/anticomplementario ejemplar es biotina/estreptavidina.

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

Pueden usarse proteínas de fusión polipéptido-toxina o proteínas de fusión anticuerpo-toxina para una inhibición o anulación celular o tisular dirigida (por ejemplo, para tratar células o tejidos cancerosos). Como alternativa, si el polipéptido tiene múltiples dominios funcionales (es decir, un dominio de activación o un dominio de unión al receptor, más un dominio de dirección), puede ser adecuada una proteína de fusión que incluya solo el dominio de dirección para dirigir una molécula detectable, una molécula citotóxica o una molécula complementaria a un tipo celular o tisular de interés. En los casos en los que la proteína de fusión solo con dominio incluye una molécula complementaria, la molécula anticomplementaria puede conjugarse con una molécula detectable o citotóxica. Dichas proteínas de fusión de dominio-molécula complementaria de esta forman representan un portador o vehículo de dirección genérico para liberación específica de célula/tejido de conjugados genéricos de molécula citotóxica/anticomplementaria-detectable.

En otra realización, pueden usarse proteínas de fusión de citocina zcytor17lig o proteínas de fusión de citocina-anticuerpo para la destrucción *in vivo* de tejidos diana (por ejemplo, leucemia, linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cánceres de piel, sangre y médula ósea, u otros cánceres en los que se expresan receptores de zcytor17lig) (Véase, en general, Hornick y col., Blood 89: 4437-47, 1997). Las proteínas de fusión descritas permiten dirigir una citocina a un sitio de acción deseado, proporcionando de esta manera una concentración local elevada de citocina. Los polipéptidos zcytor17lig adecuados o anticuerpos anti-zcytor17 se dirigen a una célula o tejido indeseable (es decir, un tumor o una leucemia) y la citocina fusionada media la lisis de la célula diana mejorada por las células efectoras. Las citocinas adecuadas para este fin incluyen, por ejemplo, interleucina 2 y factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

En otra realización, si el polipéptido zcytor17lig o el anticuerpo anti-zcytor17lig se dirige a células o tejidos vasculares, dicho polipéptido o anticuerpo puede conjugarse con un radionúclido, y particularmente con un radionúclido de emisión beta, para reducir reestenosis. Dichos enfoques terapéuticos suponen menos riesgo para los médicos que administran la terapia radiactiva. Por ejemplo, las cintas impregnadas con iridio-192 colocadas en vasos en los que se han introducido endoprótesis vasculares de pacientes hasta que se administre la dosis de radiación necesaria mostraron un menor crecimiento de tejido en el vaso y un mayor diámetro del lumen que en el grupo de control, que recibió cintas de placebo. Además, la revascularización y trombosis de la endoprótesis vascular fueron significativamente menores en el grupo de tratamiento. Se predicen resultados similares con la dirección de un conjugado bioactivo que contiene un radionúclido, como se describe en el presente documento.

Los conjugados de polipéptido bioactivo o anticuerpo descritos en el presente documento pueden administrarse por vía intravenosa, intraarterial o intraductal, o pueden introducirse localmente en el sitio de acción deseado.

Además, la inflamación es una respuesta protectora por un organismo para esquivar un agente invasor. La inflamación es un acontecimiento en cascada que implica muchos mediadores celulares y humorales. Por una parte, la supresión de las respuestas inflamatorias puede dejar a un huésped inmunocomprometido; sin embargo, si se deja sin comprobar, la inflamación puede ocasionar complicaciones graves incluyendo enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y similares), choque séptico y fallo multiorgánico. De forma importante, estas diversas patologías comparten mediadores inflamatorios comunes. Las enfermedades colectivas que se caracterizan por inflamación tienen un gran impacto sobre la morbilidad y mortalidad humana. Por lo tanto, está claro que los polipéptidos de unión y anticuerpos antiinflamatorios, tales como los polipéptidos de unión y anticuerpos anti-zcytor17lig descritos en el presente documento, podrían tener un potencial terapéutico crucial para un amplio número de enfermedades humanas y animales, desde asma y alergia hasta autoinmunidad y choque séptico. Como tal, el uso de anticuerpos anti-zcytor17lig antiinflamatorios y polipéptidos de unión descritos en el presente documento pueden usarse terapéuticamente como antagonistas de zcytor17lig descritos en el presente documento, particularmente en enfermedades tales como artritis, endotoxemia, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, enfermedades relacionadas y similares.

1. Artritis

La artritis, incluyendo la osteoartritis, artritis reumatoides, articulaciones artríticas como resultado de una lesión y similares, son afecciones inflamatorias comunes que se beneficiarían del uso terapéutico de anticuerpos anti-zcytor17lig y polipéptidos de unión de la presente invención. Por ejemplo, la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica que afecta al cuerpo entero y es una de las formas más comunes de artritis. Se caracteriza por la inflamación de la membrana que reviste la articulación, que produce dolor, rigidez, calor, enrojecimiento e inflamación. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir el hueso y el cartílago. Como resultado de la artritis reumatoide, el revestimiento de la articulación inflamada, el sinovio, puede invadir y dañar el hueso y el cartílago ocasionando un deterioro de la articulación y dolor severo entre otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su forma y alineamiento, dando como resultado dolor y pérdida de movimiento.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inmune particularmente caracterizada por inflamación y posterior lesión tisular que conduce a una incapacitación severa y a un aumento de la mortalidad. En las articulaciones reumatoides se producen localmente diversas citocinas. Numerosos estudios han demostrado que la IL-1 y el TNF-alfa, dos citocinas pro-inflamatorias prototípicas, desempeñan un papel importante en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la destrucción progresiva de la articulación. De hecho, la administración de inhibidores de TNF-alfa e IL-1 en pacientes con AR ha llevado a una mejoría espectacular de los signos clínicos y biológicos de inflamación y a una reducción de los signos radiológicos de erosión de hueso y destrucción de cartílago. Sin embargo, a pesar de estos resultados alentadores, un porcentaje significativo de los pacientes no responden a estos agentes, lo que sugiere que en la patofisiología de la artritis también están implicados otros mediadores (Gabay, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2(2): 135-149, 2002). Uno de estos mediadores podría ser zcytor17lig, y por lo tanto, una molécula que se una o inhiba zcytor17lig, tal como anticuerpos o asociados de unión a zcytor17lig, podría servir como un agente terapéutico valioso para reducir la inflamación en la artritis reumatoide y otras enfermedades artríticas.

Hay varios modelos animales para la artritis reumatoide conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica que se parece mucho a la artritis reumatoide humana. Como la AIC comparte características inmunológicas y patológicas similares con la AR, esto hace que sea un modelo ideal para seleccionar compuestos potenciales antiinflamatorios humanos. El modelo de AIC es un modelo bien conocido en ratones que depende tanto de la respuesta inmune como de la respuesta inflamatoria, para producirse. La respuesta inmune comprende la interacción de linfocitos B y linfocitos T CD4+ en respuesta al colágeno, que se proporciona como antígeno, y conduce a la producción de anticuerpos anti-colágeno. La fase inflamatoria es el resultado de las respuestas tisulares de mediadores de la inflamación, como consecuencia de la reacción cruzada de algunos de estos anticuerpos con el colágeno nativo del ratón y la activación de la cascada del complemento. Una ventaja del uso del modelo de AIC es que se conocen los mecanismos básicos de la patogénesis. Se han identificado los epítopos relevantes de los linfocitos T y los linfocitos B en el colágeno de tipo II, y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (por ejemplo, hipersensibilidad de tipo retardado y anticuerpo anti-colágeno) e inflamatorios, (por ejemplo citocinas, quimiocinas y enzimas de degradación de la matriz) relacionados con la artritis mediada por el sistema inmune, y por lo tanto pueden usarse para evaluar la eficacia del compuesto de ensayo en el modelo de AIC (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407-20, 1999; Williams y col., *Immunol.* 89:9784-788, 1992; Myers y col., *Life Sci.* 61:1861-78, 1997; and Wang y col., *Immunol.* 92:8955-959, 1995).

La administración de polipéptidos que comprenden zcytor17 soluble (incluyendo receptores heterodiméricos y multiméricos descritos en el presente documento), tales como zcytor17-Fc4 u otras proteínas de fusión y solubles zcytor17 a estos ratones del modelo AIC se usó para evaluar el uso de zcytor17 para mejorar los síntomas y alterar el curso de la enfermedad. Como molécula que modula la respuesta inmune e inflamatoria, zcytor17lig puede inducir la producción de SAA, que está implicado en la patogénesis de la artritis reumatoide, los antagonistas de zcytor17lig pueden reducir la actividad de SAA *in vitro* e *in vivo*, la administración sistémica o local de antagonistas de zcytor17lig tales como anticuerpos anti-zcytor17lig o asociados de unión, polipéptidos que comprenden zcytor17 (incluyendo receptores heterodiméricos y multiméricos descritos en el presente documento), tales como zcytor17-Fc4 u otras proteínas solubles y de fusión de zcytor17 pueden suprimir potencialmente la respuesta inflamatoria de la AR. Otros agentes terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos zcytor17, polipéptidos receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti-zcytor17lig o asociados de unión de la presente invención, y similares.

2. Endotoxemia

La endotoxemia es una afección grave que la producen comúnmente agentes infecciosos tales como bacterias y otros agentes de enfermedades infecciosas, septicemia, síndrome de choque tóxico o en pacientes inmunocomprometidos sometidos a infecciones oportunistas, y similares. La administración de anticuerpos antiinflamatorios y polipéptidos de unión terapéuticamente útiles, tales como anticuerpos anti-zcytor17lig y polipéptidos de unión de la presente invención, podría ayudar a prevenir y tratar la endotoxemia en seres humanos y animales. Otros agentes terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos zcytor17, polipéptidos receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o los anticuerpos anti-zcytor17lig o asociados de unión de la presente invención, y similares, podrían servir como un agente terapéutico valioso para reducir la inflamación y los efectos

patológicos de la endotoxemia.

La endotoxemia inducida por lipopolisacárido (LPS) incorpora muchos de los mediadores proinflamatorios que producen efectos patológicos en las enfermedades infecciosas y la endotoxemia inducida por LPS en roedores es un modelo ampliamente usado y aceptable para estudiar los efectos farmacológicos de posibles agentes proinflamatorios o inmunomoduladores. El LPS producido en bacterias gram negativas, es un importante agente causante de la patogénesis del choque séptico (Glausner y col., Lancet 338:732, 1991). De hecho, puede inducirse experimentalmente un estado similar al choque por una sola inyección de LPS en animales. Las moléculas producidas por células que responden a LPS pueden dirigirse a patógenos directa o indirectamente. Aunque estas respuestas biológicas protegen al huésped contra los patógenos invasores, también pueden producir daños. De esta manera, una estimulación masiva de la inmunidad innata, que se produce como resultado de una infección bacteriana gram negativa severa, conduce a un exceso de producción de citocinas y otras moléculas, y al desarrollo de un síndrome fatal, síndrome de choque séptico, que se caracteriza por fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada e insuficiencia multiorgánica (Durnitru y col. Cell 103: 1071-1083,2000).

Estos efectos tóxicos del LPS están relacionados principalmente con la activación de macrófagos que conduce a la liberación de múltiples mediadores inflamatorios. Entre estos mediadores, el TNF parece desempeñar un papel crucial, como se indica por la prevención de la toxicidad del LPS mediante la administración de anticuerpos neutralizadores anti-TNF (Beutler y col., Science 229:869, 1985). Está bien establecido que la inyección de 1 µg de LPS de *E. coli* en un ratón C57B1/6 dará como resultado un aumento significativo de los niveles circulantes de IL-6, TNF-alfa, IL-1 y proteínas de fase aguda (por ejemplo, SAA) aproximadamente 2 horas después de la inyección. La toxicidad del LPS parece estar mediada por estas citocinas ya que la inmunización pasiva contra estos mediadores puede producir una reducción de la mortalidad (Beutler y col., Science 229:869, 1985). Las estrategias de inmunointervención potenciales para la prevención y/o tratamiento del choque séptico incluyen Amc anti-TNF, antagonista del receptor de IL-1, LIF, IL-10 y G-CSF. Como el LPS induce la producción de factores proinflamatorios que posiblemente contribuyen a la patología de la endotoxemia, la neutralización de la actividad de zcytor17lig, SAA u otros factores pro-inflamatorios antagonizando el polipéptido zcytor17lig puede usarse para reducir los síntomas de la endotoxemia, tales como los observados en el choque endotóxico. Otros agentes terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos zcytor17, polipéptidos receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti-zcytor17lig o asociados de unión de la presente invención, y similares.

3. Enfermedad Inflamatoria intestinal. EII

En los Estados Unidos, aproximadamente 500.000 personas padecen Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) que puede afectar al colon y al recto (colitis ulcerosa) o tanto al intestino delgado como al intestino grueso (enfermedad de Crohn). La patogénesis de estas enfermedades está poco clara, pero implican una inflamación crónica de los tejidos afectados. Los agentes terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos zcytor17, polipéptidos receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o los anticuerpos anti-zcytor17lig o asociados de unión de la presente invención, y similares, podrían servir como agentes terapéuticos valiosos para reducir la inflamación y los efectos patológicos de la EII y enfermedades relacionadas.

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, denominado comúnmente colon, caracterizada por inflamación y ulceración de la mucosa o el revestimiento más interno del colon. Esta inflamación hace que el colon se vacíe con frecuencia, dando como resultado diarrea. Los síntomas incluyen deposiciones sueltas y calambres abdominales asociados, fiebre y pérdida de peso. Aunque se desconoce la causa exacta de la CU, las investigaciones recientes sugieren que las defensas naturales del cuerpo están actuando contra proteínas del cuerpo que el cuerpo considera extrañas (una "reacción autoinmune"). Quizás porque se parecen a proteínas bacterianas del intestino, estas proteínas pueden inducir o estimular el proceso inflamatorio que comienza a destruir el revestimiento del colon. Cuando se destruye el revestimiento del colon, las úlceras liberan moco, pus y sangre. La enfermedad normalmente empieza en el área rectal y finalmente se puede extender a lo largo de todo el intestino grueso. Los episodios repetidos de inflamación conducen a un espesamiento de la pared del intestino y recto con tejido cicatrizado. Puede producirse la muerte del tejido del colon o sepsis con la enfermedad severa. Los síntomas de colitis ulcerosa pueden variar en gravedad y su principio puede ser gradual o súbito. Los ataques los pueden provocar muchos factores, incluyendo infecciones respiratorias o estrés.

Aunque actualmente no hay cura disponible para la CU, los tratamientos se centran en suprimir el proceso inflamatorio anómalo en el revestimiento del colon. Se dispone de tratamientos que incluyen corticoesteroides inmunosupresores (por ejemplo azatioprina, mercaptopurina y metotrexato) y aminosalicilatos para tratar la enfermedad. Sin embargo, el uso a largo plazo de inmunosupresores tales como corticosteroides y azatioprina puede producir efectos secundarios graves incluyendo un adelgazamiento de los huesos, cataratas, infección y efectos en el hígado y la médula ósea. En los pacientes en los que las terapias actuales no son satisfactorias, una opción es la cirugía. La cirugía implica la eliminación del colon entero y del recto.

Hay varios modelos animales que pueden imitar parcialmente la colitis ulcerosa crónica. El modelo usado más ampliamente es el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobensulfónico/etanol (TNBS), que induce la inflamación crónica y la ulceración en el colon. Cuando se introduce TNBS en el colon de ratones susceptibles por instilación intrarrectal, induce una respuesta inmune mediada por linfocitos T en la mucosa colónica, conduciendo en

este caso a una inflamación masiva de la mucosa caracterizada por infiltración densa de linfocitos T y macrófagos a través de toda la pared del intestino grueso. Además, este cuadro histopatológico se acompaña por el cuadro clínico de pérdida de peso progresiva (desgaste), diarrea sanguinolenta, prolapso rectal y un espesamiento de la pared del intestino grueso (Neurath y col. Intern. Rev. Immunol. 19:51-62,2000).

- 5 Otro modelo de colitis usa dextrano sulfato sódico (DSS), que induce una colitis aguda manifestada por diarrea sanguinolenta, pérdida de peso, acortamiento del colon y ulceración de la mucosa con infiltración de neutrófilos. La colitis inducida por DSS se caracteriza histológicamente por infiltración de células inflamatorias en la lámina propia con hiperplasia linfoide, lesiones en las criptas focales y ulceración epitelial. Se cree que estos cambios se desarrollan debido a un efecto tóxico del DSS sobre el epitelio y por fagocitosis de las células de la lámina propia y
- 10 la producción de TNF-alfa e IFN-gamma. A pesar de uso común, siguen sin resolver varios asuntos relacionados con los mecanismos del DSS sobre la relevancia en las enfermedades humanas. El DSS se considera un modelo independiente de linfocitos T porque se observa en animales deficientes en linfocitos T tales como ratones SCID.

15 La administración de anticuerpos anti-zcytor17lig o asociados de unión, polipéptidos que comprenden zcytor17 soluble (incluyendo receptores heterodiméricos y multiméricos) tales como zcytor17-Fc4 u otras proteínas de fusión y solubles de zcytor17 a estos modelos de TNBS o DSS puede usarse para evaluar el uso de antagonistas de zcytor17lig para mejorar los síntomas y alterar el curso de la enfermedad gastrointestinal. Zcytor17lig puede desempeñar un papel en la respuesta inflamatoria en colitis, y la neutralización de la actividad de zcytor17lig mediante la administración de antagonistas de zcytor17lig es un posible enfoque terapéutico para la EI. Otros agentes terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos zcytor17, polipéptidos receptores heterodiméricos y

20 multiméricos solubles o anticuerpos anti-zcytor17lig o asociados de unión de la presente invención, y similares.

4. Psoriasis

La psoriasis es una afección cutánea crónica que afecta a más de siete millones de estadounidenses. Se produce psoriasis cuando nuevas células cutáneas crecen de forma anómala dando como resultado parches inflamados, hinchados y escamosos de piel en los que la piel vieja no se desprende lo suficientemente rápido. La psoriasis en

25 placas, la forma más común, se caracteriza por parches inflamados de piel ("lesiones") cubiertos con escamas blancas plateadas. La psoriasis puede limitarse a unas pocas placas o implicar áreas moderadas a extensas de la piel, apareciendo la mayoría de las veces sobre el cuero cabelludo, rodillas, codos y tronco. Aunque es muy visible, la psoriasis no es una enfermedad contagiosa. La patogénesis de la enfermedad implica inflamación crónica de los tejidos afectados. Los polipéptidos zcytor17, los polipéptidos receptores heterodiméricos y multiméricos solubles o

30 los anticuerpos anti-zcytor17lig o asociados de unión de la presente invención, y similares, podrían servir como agentes terapéuticos valiosos para reducir la inflamación y los efectos patológicos en la psoriasis, otras enfermedades cutáneas inflamatorias, alergias de la piel y la mucosa, y enfermedades relacionadas.

La psoriasis es un trastorno inflamatorio mediado por linfocitos T de la piel que puede producir molestias considerables. Es una enfermedad para la que no hay cura y afecta a personas de todas las edades. La psoriasis

35 afecta aproximadamente al dos por ciento de la población de Europa y Norteamérica. Aunque los individuos con psoriasis leve con frecuencia pueden controlar su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes en todo el mundo requieren una terapia inmunosupresora ultravioleta o sistémica. Desafortunadamente, la inconveniencia y los riesgos de la radiación ultravioleta y las toxicidades de muchas terapias limitan su uso a largo plazo. Además, los pacientes normalmente tienen recurrencia de psoriasis, y en algunos casos un rebote, poco

40 después de interrumpir la terapia inmunosupresora.

La diferenciación es un proceso progresivo y dinámico, que empieza con las células madre pluripotentes y termina con las células diferenciadas terminalmente. Las células madre pluripotentes que pueden regenerarse sin entregarse a un linaje expresan una serie de marcadores de diferenciación que se pierden cuando se entregan a un linaje

45 celular. Las células progenitoras expresan una serie de marcadores de diferenciación que pueden o no seguir expresándose según progresan las células a la ruta del linaje celular hacia la maduración. Los marcadores de diferenciación que se expresan exclusivamente mediante las células maduras normalmente son propiedades funcionales tales como productos celulares, enzimas para producir productos celulares y receptores. La etapa de diferenciación de una población celular se supervisa por la identificación de marcadores presentes en la población celular.

50 Hay indicios que sugieren que factores que estimulan tipos celulares específicos de una ruta hacia la diferenciación o desdiferenciación terminal afectan a la población celular entera que procede de un precursor o célula madre común. De esta manera, la presente invención incluye la estimulación o inhibición de la proliferación de células linfoides, células hematopoyéticas y células epiteliales.

Zcytor17lig se aisló a partir de un tejido que se sabe que tiene una función inmunológica importante y que contiene

55 células que intervienen en el sistema inmune. Zcytor17lig se expresa en células de sangre periférica activadas, seleccionadas por CDS3+ y se ha mostrado que la expresión de zcytor17lig aumenta después de la activación de linfocitos T. Además, los resultados de experimentos descritos en la sección de Ejemplos del presente documento sugieren que los polipéptidos de la presente invención pueden tener un efecto sobre el crecimiento/expansión de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células NK y/o el estado diferenciado de monocitos/macrófagos,

- linfocitos T, linfocitos B, células NK o los progenitores de estas células. Generalmente se conocen factores que estimulan la proliferación de progenitores hematopoyéticos y activan las células maduras, sin embargo, la proliferación y activación también puede requerir factores de crecimiento adicionales. Por ejemplo, se ha mostrado que se requerían IL-7 y el Factor de Steel (ligando de c-kit) para la formación de colonias de progenitores de NK. La IL-15 + IL-2 en combinación con IL-7 y Factor de Steel era más eficaz (Mr6zek y col., Blood 87:2632-2640, 1996). Sin embargo, pueden ser necesarias citocinas no identificadas para la proliferación de una subserie específica de células NK y/o progenitores de NK (Robertson y col., Blood 76:2451-2438, 1990). De forma similar, zcytor17lig puede actuar solo o en coordinación o sinergia con otras citocinas para aumentar el crecimiento, proliferación, expansión y modificación de la diferenciación de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B o células NK.
- Los ensayos que miden la diferenciación incluyen, por ejemplo, la medición de marcadores celulares asociados con la expresión específica de etapa de un tejido, actividad enzimática, actividad funcional o cambios morfológicos (Watt, FASEB, 5:281-284, 1991; Francis, Differentiation 57:63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; todos incorporados en el presente documento por referencia). Como alternativa, el propio polipéptido zcytor17lig puede servir como un marcador secretado o de la superficie celular adicional asociado con la expresión específica de etapa de un tejido. Como tal, la medición directa del polipéptido zcytor17lig o su pérdida de expresión en un tejido según se diferencia, puede servir como marcador de diferenciación de tejidos.
- De forma similar, la medición directa del polipéptido zcytor17lig, o su pérdida de expresión en un tejido puede determinarse en un tejido o en células según experimentan progresión tumoral. Los aumentos en la invasividad y motilidad de las células, o el aumento o la pérdida de expresión de zcytor17lig en un estado precanceroso o canceroso, en comparación con el tejido normal, pueden servir como diagnóstico para la transformación, invasión y metástasis en la progresión tumoral. Como tal, el conocimiento del estado de progresión o metástasis de un tumor ayudará al médico a elegir la terapia más apropiada, o la agresividad del tratamiento, para un paciente con un cáncer individual dado. Los procedimientos para medir el aumento y pérdida de expresión (de un ARNm o proteína) son bien conocidos en la técnica y se describen en el presente documento y pueden aplicarse a la expresión de zcytor17lig. Por ejemplo, la aparición o desaparición de polipéptidos que regulan la motilidad celular puede usarse para ayudar al diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata (Banyard, J. y Zetter, B.R., Cancer and Metast. Rev. 17:449-458, 1999). Como un efector de la motilidad celular, el aumento o pérdida de expresión de zcytor17lig puede servir como diagnóstico para el cáncer linfoide, de linfocitos B, epitelial, células hematopoyéticas y otros cánceres.
- Además, la actividad y el efecto de zcytor17lig sobre la expresión tumoral y la metástasis puede medirse *in vivo*. Se han creado varios modelos de ratón singénico para estudiar la influencia de polipéptidos, compuestos u otros tratamientos sobre la progresión tumoral. En estos modelos, se implantan células tumorales sometidas a pases en cultivo en ratones de la misma cepa que el donante del tumor. Las células desarrollarán tumores con características similares en los ratones receptores, y también se producirá metástasis en algunos de los modelos. Los modelos tumorales apropiados para los estudios de los presentes inventores incluyen el carcinoma de pulmón de Lewis (ATCC N° CRL-1642) y el Melanoma B16 (ATCC N° CRL-6323), entre otros. Estas son dos líneas tumorales usadas comúnmente, singénicas para el ratón C57BL6/J, que se cultivan y manipulan fácilmente *in vitro*. Los tumores resultantes de la implantación de cualquiera de estas líneas celulares pueden producir metástasis en el pulmón en ratones C57BL6/J. El modelo de carcinoma de pulmón de Lewis se ha usado recientemente en ratones para identificar un inhibidor de la angiogénesis (O'Reilly MS, y col. Cell 79: 315-328, 1994). Se tratan ratones C57BL6/J con un agente experimental mediante una inyección diaria de proteína recombinante, agonista o antagonista o una inyección de una vez de adenovirus recombinante. Tres días después de este tratamiento, se implantan de 10^5 a 10^6 células por debajo de la piel dorsal. Como alternativa, las propias células pueden infectarse con adenovirus recombinante, tal como el que expresa zcytor17lig, antes de la implantación de forma que la proteína se sintetice en el sitio del tumor o intracelularmente, en lugar de sistémicamente. Los ratones normalmente desarrollan tumores visibles en 5 días. Los tumores se dejan crecer durante un periodo de hasta 3 semanas, durante el cual pueden alcanzar un tamaño de 1500 - 1800 mm^3 en el grupo tratado de control. El tamaño del tumor y el peso corporal se supervisan cuidadosamente a lo largo de todo el experimento. En el momento del sacrificio, se retira el tumor y se pesa junto con los pulmones y el hígado. Se ha mostrado que el peso del pulmón se correlaciona bien con la carga tumoral metastásica. Como medida adicional, se cuentan las metástasis de la superficie del pulmón. El tumor reseca, los pulmones y el hígado se preparan para el examen histopatológico, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. La influencia del polipéptido expresado en cuestión, por ejemplo, zcytor17lig, sobre la capacidad del tumor de adquirir sistema vascular y experimentar metástasis puede ensayarse de esta manera. Además, aparte de usar adenovirus, las células implantadas pueden transfectarse de forma transitoria con zcytor17lig. El uso de transfectantes de zcytor17lig estables así como el uso de promotores inducibles para activar la expresión de zcytor17lig *in vivo* se conocen en la técnica y pueden usarse en este sistema para evaluar la inducción de metástasis por zcytor17lig. Además, puede inyectarse directamente zcytor17lig purificado o medio acondicionado de zcytor17lig en este modelo de ratón, y por lo tanto usarse en este sistema. Como referencia general, véase O'Reilly MS, y col. Cell 79:315-328, 1994; y Rusciano D, y col. Murine Models of Liver Metastasis. Invasion Metastasis 14:349-361, 1995.
- Zcytor17lig o los anticuerpos contra el mismo serán útiles para tratar la tumorigénesis, y por lo tanto serían útiles en el tratamiento de cánceres. Zcytor17lig se expresa en linfocitos T activados, monocitos y macrófagos, y está asociado con una región de cromosoma humano en la que son comunes las translocaciones en leucemias. Además, se ha mostrado que zcytor17lig actúa mediante un receptor de citocinas, zcytor17, que también se expresa en

linfocitos T activados, monocitos y macrófagos. Durante la estimulación de linfocitos T activados, monocitos y macrófagos por zcytor17lig se podría producir un estado patológico humano tal como, por ejemplo, un cáncer de células inmunes u otros cánceres. Como tal, la identificación de la expresión de zcytor17lig, polipéptidos (por ejemplo, por anticuerpos anti-zcytor17lig, receptores solubles zcytor17 (por ejemplo, receptor zcytor17, heterodímeros (por ejemplo, zcytor17/OSMRbeta, zcytor17/WSX-1), multímeros (por ejemplo, zcytor17/OSMRbeta/WSX-1)), u otros asociados de unión de zcytor17lig) puede servir como diagnóstico y puede servir como antagonistas de la actividad proliferativa de zcytor17lig. El ligando podría administrarse en combinación con otros agentes que ya se usan, incluyendo agentes quimioterapéuticos convencionales así como moduladores inmunes tales como interferón alfa. Se ha mostrado que los interferones alfa/beta son eficaces para tratar algunas leucemias y modelos de enfermedades animales, y los efectos inhibidores del crecimiento del interferón alfa y zcytor17lig pueden ser aditivos.

Se cree que las células NK desempeñan un papel importante en la eliminación de células tumorales metastásicas y los pacientes con metástasis y tumores sólidos han reducido los niveles de la actividad de células NK (Whiteside y col., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 230:221-244, 1998). Un agente que estimula las células NK sería útil en la eliminación de tumores.

La presente memoria descriptiva describe la reducción de la proliferación de monocitos/macrófagos neoplásicos que comprenden administrar a un mamífero con un neoplasma de monocitos/macrófagos una cantidad de una composición de zcytor17lig o anti-zcytor17lig suficiente para reducir la proliferación de los monocitos/macrófagos neoplásicos. En otras realizaciones, la composición puede comprender al menos otra citocina. Puede seleccionarse una segunda citocina del grupo que consiste en IL-2, IL-3, IL-12, IL-21, IL-22, IL-15, IL-4, GM-CSF, ligando de Flt3 o un factor de célula madre.

La presente memoria descriptiva describe la inhibición de la activación o diferenciación de monocitos/macrófagos. Los monocitos son células diferenciadas incompletamente que migran a diversos tejidos en los que maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune al presentar al antígeno a los linfocitos y desempeñan un papel de apoyo como células auxiliares a los linfocitos al secretar numerosas citocinas. Los macrófagos pueden internalizar moléculas extracelulares y tras la activación tienen una mayor capacidad de destruir microorganismos intracelulares y células tumorales. Los macrófagos activados también están implicados en la estimulación de la inflamación aguda o local.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la reducción de la proliferación de linfocitos B o T neoplásicos que comprende administrar a un mamífero con un neoplasma de linfocitos B o T una cantidad de una composición de antagonista de zcytor17lig suficiente para reducir la proliferación de los monocitos/macrófagos neoplásicos. En otras realizaciones, la composición puede comprender al menos otra citocina, pudiendo seleccionarse la citocina del grupo que consiste en IL-12, IL-21, IL-22, IL-15, IL-4, GM-CSF, ligando de Flt3 o factor de célula madre. Además, el antagonista de zcytor17lig puede ser una proteína de fusión de ligando/toxina.

Puede emplearse una toxina de fusión de zcytor17lig-saporina contra una serie similar de leucemias y linfomas, ampliando la serie de leucemias que pueden tratarse con zcytor17lig. Por ejemplo, dichas leucemias pueden ser las que sobreexpresan receptores zcytor17 (por ejemplo, receptor zcytor17, heterodímeros (por ejemplo zcytor17/OSMRbeta, zcytor17/WSX-1), multímeros (por ejemplo zcytor17/OSMPbeta/WSX)). La activación mediada por toxinas de fusión del receptor zcytor17, heterodímeros o multímeros del receptor zcytor17 (por ejemplo, zcytor19/OSMRbeta, zcytor17/WSX-1 o zcytor19/WSX-1/OSMR) proporciona dos medios independientes para inhibir el crecimiento de las células diana, siendo el primero idéntico a los efectos observados por el ligando solo, y siendo el segundo debido a la liberación de la toxina mediante la internalización del receptor. El patrón de expresión restringido a linfoides y monocitos del receptor zcytor17 sugiere que el conjugado de ligando-saporina puede tolerarse por los pacientes.

Cuando el tratamiento de malignidades incluye trasplante de células madre o médula ósea alogénica, zcytor17lig puede ser valioso para aumentar el efecto de injerto contra tumor. Zcytor17lig puede estimular la generación de células NK líticas a partir de progenitores de médula y puede estimular la proliferación de monocitos y macrófagos después de la activación de los receptores de antígeno. Por lo tanto, cuando los pacientes reciben trasplantes de médula alogénicos, zcytor17lig aumentará la generación de respuestas antitumorales, con o sin la infusión de linfocitos del donante.

La distribución tisular de receptores para una citocina dada ofrece una fuerte indicación de los sitios potenciales de acción de esa citocina. Se observó expresión de zcytor17lig en monocitos y linfocitos B, con un aumento espectacular de la expresión tras la activación para linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+. Además, dos líneas celulares monocíticas, THP-1 (Tsuchiya y col., Int. J. Cancer 26:171-176, 1980) y U937 (Sundstrom y col., Int. J. Cancer 17:565-577, 1976) también fueron positivas para la expresión de zcytor17.

El análisis de Northern del receptor WSX-1 reveló transcritos en todos los tejidos examinados, con mayores niveles de expresión en bazo, timo, ganglio linfático, médula ósea y leucocitos de sangre periférica humanos. Además, los niveles de expresión de WSX-1 aumentaron tras la activación de linfocitos T.

Se ha notificado que la expresión de OSMR es muy amplia (Mosley y col, JBC 271:32635-32643, 1996). Esta distribución de receptores zcytor17, WSX-1 y OSM confirma un papel para zcytor17lig en respuestas inmunes, especialmente la expansión de linfocitos T tras la activación o un papel en el brazo de monocitos/macrófagos del sistema inmune.

5 De esta manera, la presente memoria descriptiva describe el uso de zcytor17/WSX-1/OSMR soluble, y heterodímeros de zcytor17/OSMR como antagonistas en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunes tales como pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria intestinal (IEE), enfermedad de Crohn, cáncer de colon e intestinal, diverticulosis, enfermedad autoinmune, sepsis, trasplante de órganos o de médula ósea; inflamación debida a traumatismo, cirugía o infección; 10 amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad de injerto contra huésped; y cuando la inhibición de la inflamación, supresión inmune, reducción de la proliferación de células hematopoyéticas, inmunes, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (incluyendo células Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), supresión de respuesta inmune a un patógeno o antígeno. Además, la presencia de expresión de zcytor17 en células inmunes activadas tales como células CD4+ y CD19+ activadas mostró que el receptor zcytor17 puede estar implicado en reacciones defensivas 15 inmunes corporales contra invasores extraños tales como microorganismos y desechos celulares, y podría desempeñar un papel en respuestas inmunes durante la inflamación y la formación de cánceres. Como tales, los anticuerpos de la presente invención que son agonistas o antagonistas para la función del receptor zcytor17, tales como zcytor17lig, pueden ser de utilidad para modificar respuestas inmunes e inflamación, como se define en las reivindicaciones.

20 La estructura y la expresión tisular de zcytor17lig sugiere un papel en el desarrollo hematopoyético o de timocitos temprano y en la regulación de la respuesta inmune o inflamación. Estos procesos implican la estimulación de la proliferación celular y la diferenciación en respuesta a la unión de una o más citocinas a sus receptores afines. En vista de la distribución tisular observada para este zcytor17lig, los agonistas (incluyendo el receptor o receptores naturales) y los antagonistas tienen un enorme potencial en aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Los compuestos 25 identificados como agonistas de zcytor17lig son útiles para estimular la proliferación y el desarrollo de células diana *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los compuestos agonistas, zcytor17lig, o anticuerpos anti- zcytor17lig son útiles como componentes de un medio de cultivo celular definido, y pueden usarse solos o en combinación con otras citocinas y hormonas para reemplazar el suero que se usa comúnmente en los cultivos celulares. De esta manera, los agonistas son útiles para promover específicamente el crecimiento y/o desarrollo o activación de monocitos, linfocitos T, 30 linfocitos B y otras células de los linajes linfoides y mieloide, y células hematopoyéticas en cultivo.

Zcytor17lig puede ser útil para estimular la inmunidad mediada por células y para estimular la proliferación de linfocitos, tal como en el tratamiento de infecciones que implican inmunosupresión, incluyendo ciertas infecciones víricas. Otros usos incluyen la supresión tumoral, en la que transformación maligna da como resultado células tumorales que son antigénicas. Zcytor17lig podría usarse para inducir citotoxicidad, que puede estar mediada por la 35 activación de células efectoras tales como linfocitos T, células NK (citotóxicas naturales) o células LAK (destructoras activadas por linfoides), o inducirse directamente mediante rutas apoptóticas. Zcytor17lig también puede ser útil para tratar leucopenias aumentando los niveles del tipo celular afectado, y para aumentar la regeneración del repertorio de linfocitos T después del trasplante de médula ósea; o para aumentar la proliferación o activación de monocitos, y para diagnóstico y otros usos descritos en el presente documento.

40 Zcytor17lig puede tener utilidad en la supresión del sistema inmune, tal como en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, etc. También puede usarse supresión inmune para reducir el rechazo de trasplante e injertos de tejidos u órganos y para tratar leucemias o linfomas específicos de linfocitos T, linfocitos B o monocitos, y otros cánceres, mediante la inhibición de la proliferación del tipo celular afectado. Además, zcytor17lig puede usarse para 45 detectar monocitos, macrófagos y linfocitos T activados y ayudar en el diagnóstico de dicha enfermedad autoinmune, particularmente en patologías en las que están elevados o activados los monocitos.

Los polipéptidos, péptidos, anticuerpos de zcytor17lig y similares también pueden usarse dentro de sistemas de diagnóstico para la detección de niveles circulantes de zcytor17lig. Dentro de una realización relacionada, pueden usarse anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente a polipéptidos zcytor17lig para detectar 50 polipéptidos zcytor17lig circulantes. La elevación o reducción de los niveles de polipéptidos ligando puede ser indicativa de estados patológicos, incluyendo cáncer. Los polipéptidos zcytor17lig pueden contribuir a procesos patológicos y pueden ser un marcador indirecto de una enfermedad subyacente.

Además, el zcytor17lig puede usarse para detectar o fijar como diana su receptor o receptores en ciertos estados patológicos. Por ejemplo, los niveles elevados de receptor de IL-2 soluble en suero humano se han asociado con 55 una amplia diversidad de afecciones inflamatorias y neoplásicas, tales como infarto de miocardio, asma, miastenia grave, artritis reumatoide, leucemia aguda de linfocitos T, linfomas de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de ovario (Heaney y col., Blood 87:847-857, 1996). De forma similar, el receptor zcytor17 está elevado en monocitos activados y, por lo tanto, el receptor zcytor17 y/o sus receptores solubles pueden estar asociados o servir como un marcador de afecciones inflamatorias y neoplásicas asociadas 60 con el mismo. El zcytor17lig, incluyendo los conjugados citotóxicos, por lo tanto puede usarse para detectar o fijar como dianas dichos tejidos, y estados patológicos.

Las moléculas descritas en el presente documento tienen utilidad particular en el brazo de monocitos/macrófagos del sistema inmune. Se conocen procedimientos que pueden evaluar dicha actividad. Por ejemplo, el interferón gamma (IFN γ) es un potente activador de fagocitos mononucleares. Por ejemplo, un aumento en la expresión de zcytor17 tras la activación de células THP-1 (ATCC No. TIB-202) con interferón gamma podría sugerir que este receptor está implicado en la activación de monocitos. Los monocitos son células incompletamente diferenciadas que migran a diversos tejidos en los que maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune al presentar el antígeno a los linfocitos y desempeñan un papel de apoyo como células auxiliares a los linfocitos al secretar numerosas citocinas. Los macrófagos pueden internalizar moléculas extracelulares y tras la activación tienen una mayor capacidad de destruir microorganismos intracelulares y células tumorales. Los macrófagos activados también están implicados en la estimulación de la inflamación aguda o local. Además, se ha mostrado que la función de monocitos-macrófagos es anómala en diversos estados patológicos. Por ejemplo, véase Johnston, RB, New Eng. J. Med. 318:747-752, 1998.

Un experto en la materia reconocerá que son útiles los agonistas del receptor zcytor17, tales como zcytor17lig. Por ejemplo, se ha notificado una migración reducida de monocitos en poblaciones con una predisposición a infecciones, tales como bebés recién nacidos, pacientes que reciben corticosteroides u otra terapia inmunosupresora, y pacientes con diabetes mellitus, quemaduras o SIDA. Los agonistas para zcytor17, tales como zcytor17lig, podrían producir un aumento en la capacidad de los monocitos de migrar y posiblemente prevenir la infección en estas poblaciones. También hay un profundo defecto de destrucción fagocítica por los fagocitos mononucleares de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. Esto da como resultado la formación de abscesos subcutáneos, así como abscesos en el hígado, pulmones, bazo y ganglios linfáticos. Un agonista del receptor zcytor17 tal como zcytor17lig podría corregir o mejorar este defecto fagocítico. Además, se ha notificado una citotoxicidad defectuosa de monocitos en pacientes con cáncer y síndrome de Wiskott-Aldrich (eccema, trombocitopenia e infecciones recurrentes). La activación de monocitos por agonistas del receptor zcytor17 tales como zcytor17lig podría ayudar en el tratamiento de estas afecciones. El sistema de monocitos-macrófagos está implicado de forma prominente en varias enfermedades de almacenamiento de lípidos (esfingolipidosis) tales como la enfermedad de Gaucher. La resistencia a la infección puede verse afectada por un defecto en la función de los macrófagos, que podría tratarse por agonistas del receptor zcytor17 tales como zcytor17lig.

Además, un experto en la materia reconocerá que son útiles los antagonistas de zcytor17lig. Por ejemplo, en lesiones ateroscleróticas, una de las primeras anomalías es la localización de monocitos/macrófagos en células endoteliales. Estas lesiones podrían prevenirse mediante el uso de antagonistas de zcytor17lig. Los anticuerpos anti-zcytor17lig (por ejemplo, anticuerpos neutralizadores de zcytor17lig), receptores solubles zcytor17, heterodímeros y multímeros, y asociados de unión de zcytor17lig también pueden usarse como antagonistas para el zcytor17lig. Además, la leucemia monoblástica está asociada con diversas anomalías clínicas que reflejan la liberación de los productos biológicos de los macrófagos, incluyendo los ejemplos altos niveles de lisozima en el suero y orina y fiebres elevadas. Además, dichas leucemias presentan un aumento anómalo de células monocíticas. Estos efectos posiblemente podrían prevenirse por antagonistas para zcytor17lig, tales como los descritos en el presente documento. Además, anti-zcytor17lig puede conjugarse con moléculas tales como restos tóxicos y citocinas, como se describe en el presente documento, para dirigir la destrucción de células monocíticas de leucemia.

Usando procedimientos conocidos en la técnica y desvelados en el presente documento, un experto podría evaluar fácilmente la actividad de agonistas y antagonistas de zcytor17lig en los estados patológicos desvelados en el presente documento, inflamación, estados inmunes (por ejemplo autoinmunes), cáncer o infección así como en otros estados patológicos que implican células monocíticas. Además, como zcytor17lig se expresa de una manera específica de linfocitos T, macrófagos y monocitos, y estas enfermedades implican anomalías en células monocíticas, tales como proliferación, función, localización y activación celular, los polinucleótidos y polipéptidos descritos en el presente documento, y los anticuerpos de la presente invención, son útiles como diagnósticos para detectar dichas anomalías de células monocíticas, e indicar la presencia de enfermedad, como se define en las reivindicaciones. Dichos procedimientos implican una muestra biológica de un paciente, tal como sangre, saliva o biopsia, y la comparación de la misma con una muestra de control normal. Pueden usarse procedimientos histológicos, citológicos, citometría de flujo, procedimientos bioquímicos y otros procedimientos para determinar los niveles relativos o la localización de zcytor17lig, o células que expresan zcytor17lig, es decir, monocitos, en la muestra del paciente en comparación con el control normal. Un cambio en el nivel (aumento o reducción) de la expresión de zcytor17lig, o un cambio en el número de localización de monocitos (por ejemplo, aumento o infiltración de células monocíticas en tejidos en los que normalmente no están presentes) en comparación con un control indicaría enfermedad. Dichos procedimientos de diagnóstico también pueden incluir el uso de marcadores radiométricos, fluorescentes y colorimétricos asociados a los polinucleótidos o polipéptidos descritos en el presente documento, o a anticuerpos de la presente invención. Dichos procedimientos son bien conocidos en la técnica y se desvelan en el presente documento.

Pueden usarse secuencias de aminoácidos que tienen actividad de zcytor17lig para modular el sistema inmune por unión al receptor zcytor17, y por lo tanto, prevenir la unión de zcytor17lig con el receptor de zcytor17lig endógeno. También pueden usarse antagonistas de zcytor17lig, tales como anticuerpos anti-zcytor17lig para modular el sistema inmune por inhibición de la unión de zcytor17lig con el receptor de zcytor17lig endógeno. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva describe el uso de proteínas, polipéptidos y péptidos que tienen actividad de

zcytor17lig (tales como polipéptidos de zcytor17lig, análogos de zcytor17lig (por ejemplo, anticuerpos anti-idiotipo anti-zcytor17lig) y proteínas de fusión de zcytor17lig) a un sujeto que carece de una cantidad adecuada de este polipéptido, o que produce un exceso de uno o más receptores que comprenden zcytor17. También pueden usarse antagonistas de zcytor17 (por ejemplo, anticuerpos anti-zcytor17) para tratar a un sujeto que produce un exceso de zcytor17lig o uno o más receptores que comprende zcytor17. Los sujetos adecuados incluyen mamíferos, tales como seres humanos.

Se ha demostrado que zcytor17lig se expresa en células mononucleares activadas, y puede estar implicado en la regulación de la inflamación. Como tal, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ensayarse y usarse por su capacidad de modificar la inflamación o pueden usarse como un marcador de inflamación. En la técnica se conocen procedimientos para determinar calidades proinflamatorias y antiinflamatorias de zcytor17lig y se analizan en el presente documento. Además, puede estar implicado en la regulación positiva de la producción de reactivos de fase aguda, tales como amiloide A de suero (SAA), α 1-antiquimotripsina y haptoglobina, y la expresión de ligando del receptor zcytor17 puede estar aumentada tras la inyección de lipopolisacárido (LPS) *in vivo* que está implicado en la respuesta inflamatoria (Dumoutier, L. y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000). La producción de proteínas de fase aguda, tales como SAA, se considera un mecanismo de supervivencia a corto plazo en el que la inflamación es beneficiosa; sin embargo, el mantenimiento de proteínas de fase aguda durante periodos más prolongados contribuye a la inflamación crónica y puede ser perjudicial para la salud humana. Como revisión, véase Uhlar, CM y Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265:501-523, 1999, y Baumann H. y Gauldie, J. Immunology Today 15:74-80, 1994. Además, la proteína SAA de fase aguda está implicada en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias crónicas, está implicada en la aterosclerosis y artritis reumatoide, y es el precursor de la proteína A amiloide depositada en la amiloidosis (Uhlar, CM y Whitehead, supra.). De esta manera, cuando hay un ligando tal como zcytor17lig que actúa como molécula proinflamatoria e induce la producción de SAA, los antagonistas serían útiles para tratar la enfermedad inflamatoria y otras enfermedades asociadas con proteínas de respuesta de fase aguda inducidas por el ligando. Dichos antagonistas se definen en las reivindicaciones. Por ejemplo, la invención permite reducir la inflamación en un mamífero con inflamación usando una cantidad de anticuerpo anti-zcytor17lig (por ejemplo, anticuerpo neutralizador) como se define en las reivindicaciones que es suficiente para reducir la inflamación. Además, la memoria descriptiva describe la supresión de una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación mediante: (1) la determinación de un nivel de proteína amiloide A en suero; (2) la administración de una composición que comprende un polipéptido zcytor17lig o anticuerpo anti-zcytor17lig como se describe en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) la determinación del nivel posterior a la administración de proteína amiloide A en suero; (4) la comparación del nivel de proteína A amiloide en suero en la etapa (1) con el nivel de proteína A amiloide en suero de la etapa (3), en la que la ausencia de un aumento o una reducción en el nivel en suero de proteína A amiloide es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria.

Los receptores que se unen a zcytor17lig incluyen al menos una subunidad de receptor zcytor17. Un segundo polipéptido receptor incluido en el receptor heterodimérico soluble pertenece a la subfamilia de receptores que incluye las subunidades de receptor de citocinas de clase I, y más específicamente OSMRbeta y WSX-1. Además de un polipéptido receptor zcytor17 monomérico u homodimérico, un receptor zcytor17 heterodimérico soluble, como se ejemplifica por una realización que comprende un receptor zcytor17 soluble + componente heterodimérico de receptor soluble de clase I, tal como OSMRbeta o WSX-1, puede actuar como antagonista del zcytor17lig. Otras realizaciones incluyen receptores multiméricos solubles que comprenden zcytor17, tales como receptor zcytor17 + componente multimérico de receptor soluble de clase I, tal como OSMRbeta y WSX-1.

Al igual que zcytor17lig, el análisis de la distribución tisular del ARNm que corresponde al ADNc del receptor zcytor17 mostró que el nivel de ARNm era máximo en monocitos y células de próstata, y está elevado en monocitos activados, y células CD4+ activadas, CD8+ activadas y CD3+ activadas. Por lo tanto, el receptor zcytor17 también está implicado en la inducción de respuestas inflamatorias e inmunes. De esta manera, ciertas realizaciones particulares de la presente invención se dirigen a anticuerpos de zcytor17lig, para su uso como antagonistas en enfermedades inflamatorias, o afecciones tales como enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn, sepsis y cuando hay inhibición de inflamación, supresión inmune, reducción de la proliferación de células hematopoyéticas, inmunes, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (incluyendo células Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), supresión de la respuesta inmune a un patógeno o antígeno. Además, la presencia de receptor zcytor17 y expresión de zcytor17lig en células inmunes activadas tales como células CD3+ activadas, monocitos, células CD4+ y CD19+ mostró que el receptor zcytor17 puede estar implicado en las reacciones defensivas inmunes del cuerpo contra invasores extraños: tales como microorganismos y desechos celulares, y podría desempeñar un papel en respuestas inmunes durante la inflamación y la formación de cánceres. Como tales, zcytor17lig y los anticuerpos de zcytor17lig de la presente invención (como se definen en las reivindicaciones) que son agonistas o antagonistas de la función del receptor zcytor17 pueden usarse para modificar la respuesta inmune y la inflamación, como se define en las reivindicaciones.

Además, los polipéptidos zcytor17lig que se unen a polipéptidos receptores zcytor17, y anticuerpos contra los mismos, son útiles para:

- 1) Antagonizar o bloquear la señalización a través de receptores que comprenden zcytor17 en el tratamiento de la inflamación aguda, inflamación como resultado de traumatismo, lesión tisular, cirugía, sepsis o infección, y

enfermedades inflamatorias crónicas tales como asma, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), colitis crónica, esplenomegalia, artritis reumatoide, episodios inflamatorios agudos recurrentes (por ejemplo, tuberculosis) y tratamiento de amiloidosis y aterosclerosis, enfermedad de Castleman, asma y otras enfermedades asociadas con la inducción de respuesta de fase aguda.

5 2) Antagonizar o bloquear la señalización a través de receptores que comprenden el receptor zcytor17 en el
tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como IDDM, esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso
sistémico (LES), miastenia grave, artritis reumatoide e EII para prevenir o inhibir la señalización en células
10 inmunes (por ejemplo linfocitos, monocitos, leucocitos) mediante el receptor zcytor17 (Hughes C y col., J.
Immunol 153: 3319-3325, 1994). Como alternativa, también pueden usarse anticuerpos, tales como
anticuerpos monoclonales (AcM) contra zcytor17lig, como antagonistas para reducir células inmunes
indeseadas para tratar una enfermedad autoinmune. El asma, la alergia y otras enfermedades atópicas pueden
15 tratarse con un AcM contra, por ejemplo, anticuerpos anti-zcytor17lig, receptores solubles zcytor17 o
heterodímeros zcytor17/CRF2-4, para inhibir la respuesta inmune o reducir las células ofensivas. El bloqueo o
inhibición de la señalización a través de zcytor17 usando los polipéptidos y anticuerpos de la presente
invención también pueden ser beneficiosos para enfermedades del páncreas, riñón, hipófisis y células
neuronales. Pueden beneficiarse la IDDM (diabetes mellitus dependiente de insulina), NIDDM (diabetes
20 mellitus no dependiente de insulina), pancreatitis y carcinoma pancreático. Zcytor17 puede servir como diana
para la terapia con AcM de cánceres en los que un AcM antagonista inhibe el crecimiento del cáncer y se dirige
la destrucción mediada por el sistema inmune. (Holliger P, y Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016,
1998). Los AcM contra monómeros, homodímeros, heterodímeros y multímeros de receptor zcytor17 soluble
también pueden ser útiles para tratar nefropatías tales como glomeruloesclerosis, neuropatía membranosa,
amiloidosis (que también afecta al riñón entre otros tejidos), arterioesclerosis renal, glomerulonefritis de
diversos orígenes, enfermedades fibroproliferativas del riñón, así como disfunción renal asociada con LES,
25 IDDM (diabetes mellitus dependiente de insulina), diabetes de tipo II (NIDDM), tumores renales y otras
enfermedades.

3) Agonizar o iniciar la señalización a través de los receptores zcytor17 en el tratamiento de enfermedades
autoinmunes tales como IDDM, EM, LES, miastenia grave, artritis reumatoide y EII. Zcytor17lig puede señalar
a los linfocitos u otras células inmunes para que se diferencien, alteren la proliferación o cambien la producción
de citocinas o proteínas de la superficie celular que mejoran la autoinmunidad. Específicamente, la modulación
30 de una respuesta de linfocitos T auxiliares a un patrón alternativo de secreción de citocinas puede desviar una
respuesta autoinmune para mejorar la enfermedad (Smith JA y col., J. Immunol. 160:4841-4849, 1998). De
forma similar, zcytor17lig puede usarse para señalar, reducir y desviar células inmunes implicadas en el
asma, alergia y enfermedades atópicas. La señalización a través del receptor zcytor17lig también puede ser
beneficioso para enfermedades del páncreas, riñón, pituitaria y células neuronales. Pueden beneficiarse la
35 IDDM, NIDDM, pancreatitis y carcinoma pancreático. Zcytor17 puede servir como diana para la terapia con
AcM de cáncer pancreático cuando la señalización de un AcM inhibe el crecimiento del cáncer y se dirige a la
destrucción mediada por el sistema inmune (Tutt, AL y col., J Immunol. 161: 3175-3185, 1998). De forma
similar, pueden tratarse con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos neutralizadores) contra
receptores solubles que comprenden zcytor17 de la presente invención leucemias específicas de linfocitos T,
40 linfomas, discrasia de células plasmáticas (por ejemplo mieloma múltiple) y carcinomas.

Los anticuerpos anti-zcytor17lig, los polipéptidos monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos del
receptor zcytor17 soluble descritos en el presente documento pueden usarse para neutralizar/bloquear la actividad
del ligando del receptor zcytor17 en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedad atópica, NIDDM,
45 pancreatitis y disfunción renal como se ha descrito anteriormente. Puede usarse una forma soluble del receptor
zcytor17 para promover una respuesta inmune mediada por linfocitos T y/o promover la producción de IL-4 u otras
citocinas por linfocitos u otras células inmunes:

Los anticuerpos anti-zcytor17lig y los receptores que comprenden zcytor17 solubles son útiles como antagonistas de
zcytor17lig. Dichos efectos antagonistas pueden conseguirse por neutralización directa o unión de su ligando
50 natural. Además de los usos antagonistas, los receptores solubles pueden unirse a zcytor17lig y actuar como
portador o proteínas portadoras, para transportar zcytor17lig a diferentes tejidos, órganos y células dentro del
cuerpo. Como tales, los receptores solubles pueden fusionarse o acoplarse a moléculas, polipéptidos o restos
químicos que dirigen el complejo receptor soluble-ligando a un sitio específico, tal como un tejido, célula inmune
específica, monocitos o tumor. Por ejemplo, en la infección aguda o algunos cánceres, pueden obtenerse beneficios
por la inducción de inflamación y proteínas de respuesta local de fase aguda. De esta manera, los receptores
55 solubles descritos en el presente documento o anticuerpos de la presente invención pueden usarse para dirigir
específicamente la acción de un ligando zcytor17lig pro-inflamatorio. Véase Cosman, D. Cytokine 5: 95-106, 1993; y
Fernandez-Botran, R. Exp. Opin. Invest. Drugs 9:497-513, 2000.

Además, los receptores solubles pueden usarse para estabilizar el zcytor17lig, para aumentar la biodisponibilidad,
longevidad terapéutica y/o eficacia del Ligando estabilizando el Ligando frente a la degradación o eliminación,
60 dirigiendo el ligando a un sitio de acción dentro del cuerpo. Por ejemplo, el complejo IL-6/IL6-R soluble natural
estabiliza la IL-6 y puede señalar a través del receptor gp130. Véase Cosman, D. supra., y Fernandez-Botran, R.
supra. Además, zcytor17lig puede combinarse con un ligando afín tal como su ligando para comprender un complejo

ligando/receptor soluble. Dichos complejos pueden usarse para estimular respuestas de células que presentan una subunidad de receptor de compañía. La especificidad celular de los complejos receptor zcytor17/zcytor17lig puede diferir de la observada del ligando administrado solo. Además, los complejos pueden tener propiedades farmacocinéticas distintas tales como un efecto sobre la semivida, dosis/respuesta y especificidad de órgano o tejido, de esta manera, los complejos zcytor17/ligando pueden tener actividad agonista para aumentar una respuesta inmune o estimular a las células mesangiales o estimular a las células hepáticas. Como alternativa, solo los tejidos que expresan una subunidad de señalización que forma heterodímero con el complejo pueden afectarse de forma análoga a la respuesta a los complejos IL6/IL6R (Hirota H. y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 92:4862-4866, 1995; Hirano, T. en Thomason, A. (Ed.) "The Cytokine Handbook", 3ª Ed., p. 208-209). Los complejos receptor soluble/citocina para IL12 y CNTF presentan actividades similares.

Zcytor17lig también puede usarse dentro de sistemas de diagnóstico para la detección de niveles circulantes de ligando, y en la detección de una respuesta inflamatoria de fase aguda. Dentro de una realización relacionada, pueden usarse anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente a zcytor17lig para detectar polipéptidos zcytor17lig circulantes; por el contrario, el propio zcytor17lig puede usarse para detectar polipéptidos del receptor circulante o de acción local. Los niveles elevados o reducidos de polipéptidos de ligando o receptor pueden ser indicativos de estados patológicos, incluyendo inflamación o cáncer. Además, la detección de proteínas o moléculas de fase aguda tales como zcytor17lig puede ser indicativa de un estado inflamatorio crónico en ciertos estados patológicos (por ejemplo artritis reumatoide). La detección de dichas afecciones sirve para ayudar al diagnóstico de la enfermedad además de ayudar al médico a elegir una terapia apropiada.

Los polipéptidos y proteínas descritos en el presente documento también pueden usarse *ex vivo*, tal como en un cultivo de médula autólogo. En resumen, se retira médula ósea de un paciente antes de la quimioterapia o trasplante de órganos y se trata con zcytor17lig, opcionalmente en combinación con una o más citocinas adicionales. La médula tratada después se devuelve al paciente después de la quimioterapia para acelerar la recuperación de la médula o después del trasplante para suprimir la enfermedad de injerto contra huésped. Además, las proteínas descritas en el presente documento también pueden usarse para la expansión *ex vivo* de monocitos/macrófagos de médula o células progenitoras de sangre periférica (PBPC). Antes del tratamiento, la médula puede estimularse con factor de células madre (SCF) para liberar las células progenitoras en sus primeras fases en la circulación periférica. Estos progenitores pueden recogerse y concentrarse a partir de sangre periférica y después tratarse en cultivo con zcytor17lig, opcionalmente en combinación con una o más citocinas adicionales, incluyendo pero sin limitación SCF, IL-2, IL-4, IL-7, Lif, IL-3, IL-12, IL-21 o IL-15, para diferenciar y proliferar cultivos linfoides de alta densidad, que después pueden devolverse al paciente después de la quimioterapia o trasplante.

La presente memoria descriptiva describe la expansión de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas que comprende cultivar médula ósea o células de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de zcytor17lig suficiente para producir un aumento en el número de células linfoides en la médula ósea o células de sangre periférica en comparación con las células de médula ósea o de sangre periférica cultivadas en ausencia de zcytor17lig. En otras realizaciones, las células hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, las células linfoides son células NK o linfocitos T citotóxicos. Además, la composición también puede comprender al menos otra citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-15, IL-4, Lif, IL-3, IL-12, IL-21, GM-CSF, ligando de Flt3 y factor de célula madre.

Como alternativa, zcytor17lig puede activar el sistema inmune, lo cual sería importante para reforzar la inmunidad contra enfermedades infecciosas, tratar a pacientes inmunocomprometidos tales como pacientes VIH+, pacientes con cáncer o para mejorar vacunas. En particular, la estimulación o expansión con zcytor17lig de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células NK o sus progenitores, proporcionaría un valor terapéutico en el tratamiento de infecciones víricas, y como un factor antineoplásico. De forma similar, la estimulación con zcytor17lig de la respuesta inmune contra agentes patógenos víricos y no víricos (incluyendo bacterias, protozoos y hongos) proporcionaría un valor terapéutico en el tratamiento de dichas infecciones mediante la inhibición del crecimiento de dichos agentes infecciosos. La determinación directa o indirectamente de los niveles de un patógeno o antígeno, tal como una célula tumoral, presente en el cuerpo puede conseguirse por varios procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento.

La presente memoria descriptiva describe la estimulación de una respuesta inmune en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno que comprende las etapas de: (1) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno presente en dicho mamífero; (2) administrar una composición que comprende polipéptido zcytor17lig en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno en dicho mamífero; y (4) comparar el nivel del antígeno o patógeno de la etapa 1 con el nivel de antígeno o patógeno de la etapa 3, en el que un cambio en el nivel es indicativo de la estimulación de una respuesta inmune. En otra realización, la composición de zcytor17lig se readministra. En otras realizaciones, el antígeno es un tumor de linfocitos B; un virus, un parásito o una bacteria.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la estimulación de una respuesta inmune en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno que comprende: (1) determinar el nivel de un anticuerpo específico de antígeno o patógeno; (2) administrar una composición que comprende polipéptido zcytor17lig en un vehículo farmacéutico aceptable; (3) determinar un nivel posterior a la administración de anticuerpo específico de antígeno o patógeno; (4)

comparar el nivel de anticuerpo en la etapa (1) con el nivel de anticuerpo en la etapa (3), en el que un aumento en el nivel de anticuerpo es indicativo de estimulación de una respuesta inmune.

Los polinucleótidos que codifican polipéptidos zcytor17lig son útiles dentro de aplicaciones de terapia génica en las que se desea aumentar o inhibir la actividad de zcytor17lig. Si un mamífero tiene un gen de zcytor17lig mutado o ausente, el gen de zcytor17lig puede introducirse en las células del mamífero. En una realización, se introduce un gen que codifica un polipéptido zcytor17lig *in vivo* en un vector vírico. Dichos vectores incluyen un virus de ADN atenuado o defectuoso tal como, pero sin limitación, el virus del herpes simple (VHS), papilomavirus, virus de Epstein Barr (VEB), adenovirus, virus adenoasociado (VAA) y similares. Se prefieren virus defectuosos, que carecen total o casi totalmente de genes víricos. Un virus defectuoso no es infeccioso después de introducirse en una célula. El uso de vectores víricos defectuosos permite la administración a las células en un área localizada específica, sin preocupación de que el vector pueda infectar a otras células. Los ejemplos de vectores particulares incluyen, pero sin limitación, vector de virus del herpes simple 1 defectuoso (VHS1) (Kaplitt y col., Molec. Cell. Neurosci. 2:320-30, 1991); un vector adenovírico atenuado, tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet y col., J. Clin. Invest. 90:626-30, 1992; y un vector de virus adenoasociado defectuoso (Samulski y col., J. Virol. 61:3096-101, 1987; Samulski y col., J. Virol. 63:3822-8, 1989).

Un gen de zcytor17lig puede introducirse en un vector retrovívico, por ejemplo, como se describe en Anderson y col., Patente de Estados Unidos N° 5.399.346; Mann y col. Cell 33:153, 1983; Temin y col., Patente de Estados Unidos N° 4.650.764; Temin y col., Patente de Estados Unidos N° 4.980.289; Markowitz y col., J. Virol. 62:1120, 1988; Ternin y col., Patente de Estados Unidos N° 5.124.263; Publicación de Patente Internacional N° WO 95/07358, publicada el 16 de marzo de 1995 por Dougherty y col.; y Kuo y col., Blood 82:845, 1993. Como alternativa, el vector puede introducirse por lipofección *in vivo* usando liposomas. Pueden usarse lípidos catiónicos sintéticos para preparar liposomas, para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador (Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7, 1987; Mackey y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-31, 1988). El uso de lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos *in vivo* tiene ciertas ventajas prácticas. La dirección molecular de liposomas a células específica representa un área de efectos beneficiosos. Más particularmente, la dirección de la transfección a células particulares representa un área de efectos beneficiosos. Por ejemplo, la dirección de la transfección a tipos celulares particulares sería particularmente ventajosa en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el sistema inmune, páncreas, hígado, riñón y cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas para la dirección. Los péptidos dirigidos (por ejemplo hormonas o neurotransmisores) proteínas tales como anticuerpos o moléculas no peptídicas pueden acoplarse a liposomas químicamente.

Es posible retirar las células diana del cuerpo para introducir el vector como un plásmido de ADN desnudo; y después reimplantar las células transformadas en el cuerpo. Los vectores de ADN desnudo para terapia génica pueden introducirse en las células huésped deseadas por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato cálcico, uso de una pistola génica o uso de un transportador de vectores de ADN. Véase, por ejemplo, Wu y col., J. Biol. Chem, 267:963-7, 1992; Wu y col., J. Biol. Chem. 263:14621-4, 1988.

Puede usarse la metodología antisentido para inhibir la transcripción del gen de zcytor17lig, tal como para inhibir la proliferación celular *in vivo*. Se diseñan polinucleótidos que son complementarios a un segmento de un polinucleótido que codifica zcytor17lig (por ejemplo, un polinucleótido como se expone en la SEC ID N°: 1) para unirse al ARNm que codifica zcytor17lig e inhibir la traducción de dicho ARNm. Dichos polinucleótidos antisentido se usan para inhibir la expresión de genes que codifican el polipéptido zcytor17lig en un cultivo celular o en un sujeto.

También pueden generarse ratones modificados por ingeniería genética que expresan el gen de zcytor17lig, denominados "ratones transgénicos" y ratones que presentan una ausencia completa de función del gen zcytor17lig, denominados "ratones knock out" (Snouwaert y col., Science 257:1083, 1992; Lowell y col., Nature 366:740-42, 1993; Capecchi, M.R., Science 244: 1288-1292, 1989; Palmiter, R.D. y col. Annu Rev Genet. 20: 465-499, 1986). Por ejemplo, pueden usarse ratones transgénicos que sobreexpresan zcytor17lig, de forma ubicua o bajo un promotor específico de tejido o restringido a un tejido para preguntarse si la sobreexpresión produce un fenotipo. Por ejemplo, la sobreexpresión de un polipéptido zcytor17lig de tipo silvestre, fragmento del polipéptido o un mutante del mismo puede alterar procesos celulares normales, dando como resultado un fenotipo que identifica un tejido en el que la expresión de zcytor17lig es funcionalmente relevante y puede indicar una diana terapéutica para el zcytor17lig, sus agonistas o antagonistas. Por ejemplo, un ratón transgénico preferido para modificarse por ingeniería genética es uno que sobreexpresa el zcytor17lig (restos de aminoácido 23-164 de la SEC ID N°: 2; o 24-163 de la SEC ID N°: 11). Además, dicha sobreexpresión puede dar como resultado un fenotipo que muestra similitud con enfermedades humanas. De forma similar, pueden usarse ratones knockout para zcytor17lig para determinar si zcytor17lig es absolutamente necesario *in vivo*. El fenotipo de ratones knockout es predictivo de los efectos *in vivo* que puede tener un antagonista de zcytor17lig, tales como los descritos en el presente documento. El ADNc de zcytor17lig humano o de ratón descrito en el presente documento puede usarse para generar ratones knockout. Estos ratones pueden emplearse para estudiar el gen de zcytor17lig y la proteína codificada por el mismo en un sistema *in vivo*, y puede usarse como modelos *in vivo* para las enfermedades humanas correspondientes. Además, puede usarse la expresión en ratones transgénicos de polinucleótidos antisentido de zcytor17lig o ribozimas dirigidas contra zcytor17lig, descrita en el presente documento, de forma análoga a los ratones transgénicos descritos anteriormente. También pueden realizarse estudios mediante la administración de proteína

zcytor17lig purificada.

Las pruebas experimentales sugieren un papel de zcytor17lig en la progresión de enfermedades que implican la piel o el epitelio de superficies internas, tales como, por ejemplo, intestino grueso, intestino delgado, páncreas, pulmón, próstata, útero y similares. En primer lugar, como se desvela en el presente documento, los receptores zcytor17, incluyendo tanto el receptor OSM beta como zcytor17, se expresan en varios tipos celulares localizados en superficies epiteliales que incluyen líneas celulares derivadas de epitelio pulmonar, fibroblastos pulmonares, próstata, colon, mama, epitelio hepático, hueso y epitelio cutáneo, fibroblastos óseos y similares. Además, como se desvela en el presente documento, los ejemplos de cada uno de estos tipos celulares respondían a la activación por zcytor17lig de una construcción indicadora STAT. Además, varias líneas celulares respondían a la estimulación por zcytor17lig mediante la producción de mayores niveles de IL-6, IL-8, MCP-1 (un factor quimiotáctico) como se describe en el presente documento. En conjunto, estos datos sugieren un papel para zcytor17lig en enfermedades que implican el epitelio, tales como, por ejemplo, dermatitis atópica; dermatitis; psoriasis; artritis psoriásica, eccema, gingivitis, enfermedad periodontal; enfermedades inflamatorias intestinales (EII) (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn); trastornos reproductivos, tales como, por ejemplo, displasia cervical, cáncer cervical, otras enfermedades cutáneas tales como cánceres: sarcomas, carcinomas, melanomas, etc., es decir, no solo enfermedades inflamatorias, ya que el sistema inmune está implicado en la activación/cura de cánceres; enfermedades que implican disfunción de barreras, tales como, por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y síndrome del intestino irritable (EII); y enfermedades que implican el epitelio pulmonar, tales como asma, enfisema y similares. Además, la liberación de citocinas IL-6, IL-8 y MPC-1 por células expuestas a zcytor17lig sugiere que zcytor17lig está implicado en la inflamación. Por lo tanto, la regulación de zcytor17lig puede ser útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias o cancerosas asociadas con los tejidos que expresan el receptor. Estas enfermedades incluyen, por ejemplo, prostatitis, hepatitis, osteoartritis y similares. Zcytor17lig puede regular positiva o negativamente, directa o indirectamente estas enfermedades. Por lo tanto, la administración de zcytor17lig puede usarse para tratar enfermedades como las descritas en el presente documento directamente o con moléculas que inhiben la actividad de zcytor17lig que incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales contra zcytor17lig o anticuerpos monoclonales contra zcytor17lig, o anticuerpos monoclonales que reconocen el complejo de receptor zcytor17 y OSM beta.

Los datos también sugieren que zcytor17lig puede estar implicado en la regulación de enfermedades mediadas por linfocitos T TH2. En primer lugar, zcytor17lig se fabrica por la subserie TH2 de linfocitos T activados. Las células TH2 expresan más zcytor17lig que las células TH1. Además, se estimularon al menos dos líneas de células epiteliales pulmonares (SK-LU-1, A549) para aumentar el ARNm del receptor de IL13 alfa-2 en respuesta a la estimulación por ligando de zcytor17 como se describe en el presente documento. Existe una asociación de la cadena alfa2 del receptor de IL-13 y la tumorigenicidad de tumores pancreáticos y de mama humanos. Esto sugiere que zcytor17lig puede desempeñar un papel en la regulación de la tumorigenicidad de estos tipos de cánceres, así como de otros cánceres. Por lo tanto, la administración de un antagonista de zcytor17lig o el uso directo de zcytor17lig puede ser útil en el tratamiento de estos tipos de cánceres, benignos o malignos y en diversos grados (grados I-IV) y estadios (por ejemplo, procedimientos de clasificación de estadios TNM o AJC) del desarrollo tumoral, en mamíferos, preferentemente seres humanos.

Es bien sabido en la técnica que la IL13 está implicada en la generación de células TH2 activadas y en enfermedades mediadas por TH2, tales como asma, dermatitis atópica y similares. Zcytor17lig o los antagonistas de zcytor17lig pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades en las que están implicados los linfocitos T TH2. Éstas incluirían enfermedades tales como, por ejemplo, dermatitis atópica, asma, así como otras enfermedades que se exacerban por células TH2 activadas. La implicación de zcytor17lig en enfermedades, tales como, por ejemplo, dermatitis atópica, también se confirma por el fenotipo de los ratones transgénicos que sobreexpresan zcytor17lig y desarrollan síntomas de dermatitis atópica como se describe en el presente documento.

A pesar de la expresión preferente de zcytor17lig por las células TH2, sigue habiendo alguna expresión de zcytor17lig en las células TH1 y en los linfocitos T CD8+. Por lo tanto, zcytor17lig o sus antagonistas pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades que implican la modulación inmune de linfocitos T activos que incluyen, por ejemplo, infección vírica, cánceres, rechazo de injertos y similares.

Zcytor17lig también puede estar implicado en el desarrollo de cánceres. Existe expresión del receptor zcytor17 y de receptores OSM beta en osteosarcomas de fibroblastos óseos humanos, melanoma de fibroblastos cutáneos humanos, carcinoma epitelial de colon, adenocarcinoma, adenocarcinoma epitelial de mama, adenocarcinoma epitelial de próstata y adenocarcinoma y carcinoma epitelial de pulmón. Por lo tanto, puede ser útil tratar tumores de origen epitelial con zcytor17lig, fragmentos del mismo o antagonistas de zcytor17lig que incluyen, pero sin limitación, carcinoma, adenocarcinoma y melanoma. Independientemente, zcytor17lig o un antagonista de zcytor17lig puede usarse para tratar un cáncer o reducir uno o más síntomas de un cáncer, desde un cáncer que incluye, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas o epidermoide, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, adenoma bronquial, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células transicionales, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor mixto maligno de origen de glándulas salivares, tumor de Wilms, teratoma inmaduro, teratocarcinoma y otros tumores que comprenden al menos algunas células de origen epitelial.

Generalmente, la dosis de polipéptido zcytor17lig administrado (o análogo o proteína de fusión de zcytor17) variará dependiendo de factores tales como la edad del paciente, el peso, la altura, el sexo, el estado médico general y la historia médica previa. Normalmente, es deseable proporcionar al receptor una dosificación de polipéptido zcytor17lig que esté en el intervalo de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque también puede administrarse una dosificación menor o mayor cuando lo dicten las circunstancias. Un experto en la materia puede determinar fácilmente dichas dosificaciones, y los ajustes de las mismas, usando procedimientos conocidos en la técnica.

La administración de un polipéptido Zcytor17lig a un sujeto puede ser tópica, mediante un inhalador, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleurales, intratecal, por perfusión a través de un catéter regional o por inyección intralesional directa. Cuando se administran proteínas terapéuticas por inyección, la administración se puede realizar por infusión continua o mediante una sola o múltiples emboladas.

Vías de administración adicionales incluyen la vía oral, en la membrana mucosa, pulmonar y transcutánea. La administración oral es adecuada para microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas de proteinoide, microesferas de policianoacrilato, y 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 viabilidad de una administración intranasal se ejemplifica por un modo parecido de administración de insulina (véase, por ejemplo, Hinchcliffe e Illum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35: 199 (1999)). Pueden prepararse partículas secas o líquidas que comprende Zcytor17lig e inhalarse con la ayuda de dispensadores de polvo seco, generadores de aerosol líquido o nebulizadores (por ejemplo, Pettit y Gombotz, *TIBTECH* 16: 343 (1998); Patton y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35: 235 (1999)). Este enfoque se ilustra por el sistema de tratamiento de diabetes AERX, que es un inhalador electrónico portátil que libera insulina aerosolizada en los pulmones. Ciertos estudios han mostrado que se han administrado proteínas de hasta 48.000 kDa a través de la piel a concentraciones terapéuticas con ayuda de ultrasonidos de baja frecuencia, lo que ilustra la viabilidad de la administración transcutánea (Mitragotri y col., *Science* 269: 850 (1995)). La administración transdérmica usando electroporación proporciona otro medio para administrar una molécula que tiene actividad de unión a Zcytor17lig (Potts y col., *Pharm. Biotechnol.* 10: 213 (1997)).

Una composición farmacéutica que comprende una proteína, polipéptido o péptido que tiene actividad de unión a Zcytor17lig puede formularse de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, con lo que las proteínas terapéuticas se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede tolerarse por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un 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).

Para el objetivo de la terapia, las moléculas que tienen actividad de unión a Zcytor17lig y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una combinación de una proteína, polipéptido o péptido que tiene actividad de unión a Zcytor17lig y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia produce un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente usado para tratar la inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia al menos una parte de la respuesta inflamatoria.

Una composición farmacéutica que comprende Zcytor17lig (o un análogo o proteína de fusión de Zcytor17lig) puede prepararse en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran con soluciones inyectables, aerosoles, pequeñas gotas, soluciones topológicas y suspensiones orales. Ejemplos de formas sólidas incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. Esta última forma se ilustra con bombas miniosmóticas e implantes (Bremer y col., *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 y col., "Protein Delivery with Infusion Pumps," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey y col., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)). Otras formas incluyen cremas, pastas, otras aplicaciones topológicas y similares.

Los liposomas proporcionan un medio para administrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto por vía intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea o mediante administración oral, inhalación o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos (véase, en general, Bakker-Woudenberg y col., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Supl. 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46: 618 (1993), y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas son similares en composición a las membranas celulares y como resultado, los liposomas pueden administrarse de forma segura y son biodegradables. Dependiendo del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y los liposomas pueden variar en tamaño con diámetros que varían de 0,02 µm a más de 10 µm. En los liposomas puede encapsularse diversos agentes: agentes hidrófobos repartidos en las bicapas y agentes

hidrófilos repartidos dentro del espacio o espacios acuosos internos. (Véase, por ejemplo, Machy y col., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987), y Ostro y col., *American J. Hosp. Pharm* 46: 1576 (1989)). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño del liposoma, el número de bicapas, la composición de lípidos, así como la carga y las características superficiales de los liposomas.

Los liposomas pueden adsorberse prácticamente a cualquier tipo de célula y después liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma absorbido puede introducirse por endocitosis en células que son fagocíticas. La endocitosis se continúa por la degradación intralisosomal de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados (Scherphorf y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446: 368 (1985)). Después de la administración intravenosa, los liposomas pequeños (de 0,1 a 1,0 μm) normalmente los captan las células del sistema reticuloendotelial, localizado principalmente en el hígado y bazo, mientras que los liposomas mayores de 3,0 μm se depositan en el pulmón. Esta captación preferente de los liposomas más pequeños por las células del sistema reticuloendotelial se ha usado para administrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos y a tumores del hígado.

El sistema reticuloendotelial puede evitarse por varios procedimientos que incluyen saturación con grandes dosis de partículas de liposoma, o inactivación selectiva de macrófagos por medios farmacológicos (Claassen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 802:429 (1984)). Además, se ha mostrado que la incorporación de fosfolípidos derivatizados con glicolípidos o polietilenglicol en las membranas del liposoma da como resultado una captación significativamente reducida por el sistema reticuloendotelial (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

También pueden prepararse liposomas para dirigirse a células u órganos particulares variando la composición de fosfolípidos o insertando receptores o ligandos en los liposomas. Por ejemplo, se han usado liposomas preparados con un alto contenido de tensioactivo no iónico para dirigir al hígado (Hayakawa y col., Patente japonesa 04-244,018; Kato y col., *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 después reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha mostrado que una formulación liposomal de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esteril-glucósido (SG) derivado de soja y colesterol (Ch) se dirige al hígado (Shimizu y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20: 881 (1997)).

Como alternativa, diversos ligandos de dirección pueden unirse a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, carbohidratos, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas pueden modificarse con derivados de galactosil lípidos de tipo ramificado para dirigirse a receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente en la superficie de células hepáticas (Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14: 287 (1997); Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20: 259 (1997)). De forma similar, Wu y col., *Hepatology* 27: 772 (1998) han mostrado que el marcaje de liposomas con asialofetina conduce a una menor semivida en plasma de liposoma y a una captación muy aumentada del liposoma marcado con asialofetina por los hepatocitos. Por otra parte, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galactosil lípidos de tipo ramificado puede inhibirse mediante una preinyección de asialofetina (Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20: 259 (1997)). Los liposomas de albúmina de suero humano poliaconitilados proporcionan otro enfoque para dirigir liposomas a las células hepáticas (Kamps y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94: 11681 (1997)). Además, Geho, y col. Patente de Estados Unidos N° 4.603.044, describen un sistema de liberación de vesículas de liposomas dirigidas a hepatocitos, que tiene especificidad por receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.

En un enfoque más general a la dirección de tejidos, las células diana se premarcan con anticuerpos biotinilados específicos por un ligando expresado por la célula diana (Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 99 (1998)). Después de la eliminación en plasma del anticuerpo libre, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otro enfoque, los anticuerpos de dirección se unen directamente a los liposomas (Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 99 (1998)).

Los polipéptidos que tienen actividad de unión a Zcytor17lig pueden encapsularse dentro de liposomas usando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson y col., *Infect. Immun.* 31: 1099 (1981), Anderson y col., *Cancer Res.* 50: 1853 (1990), y Cohen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1063: 95 (1991), Alving y col. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," en *Liposome Technology*, 2ª Edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef y col., *Meth. Enzymol.* 149: 124 (1987)). Como se ha indicado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener diversos componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados de lípidos de poli(etilenglicol) (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150: 9 (1993)).

Se han diseñado microesferas de polímeros degradables para mantener altos niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables tales como poli(lactida-co-glicolida) (PLG), polianhídridos, poli (orto ésteres), polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en los que las proteínas quedan atrapadas en el polímero (Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6: 332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," en *Protein Delivery*:

Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus y col., Science 281: 1161 (1998); Putney y Burke, Nature Biotechnology 16: 153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 548 (1998)). Las nanoesferas revestidas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para la administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref y col., Pharm. Biotechnol. 10: 167 (1997)).

5 La presente memoria descriptiva describe polipéptidos modificados químicamente que tienen actividad de zcytor17lig, tales como el polipéptido zcytor17lig, agonistas de zcytor17lig y antagonistas de Zcytor17lig, por ejemplo, anticuerpos anti-zcytor17lig, en los que un polipéptido se une con un polímero, como se ha analizado anteriormente.

10 Los expertos en la materia pueden idear otras formas de dosificación como se muestra, por ejemplo, por 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 por Ranade y Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996).

15 Como ilustración, las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse como un kit que comprende un recipiente que comprende un polipéptido zcytor17lig o un antagonista de zcytor17lig (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al polipéptido Zcytor17lig). Los polipéptidos terapéuticos pueden proporcionarse en forma de una solución inyectable para una sola o múltiples dosis, o como un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Como alternativa, dicho kit puede incluir un dispensador de polvo seco, generador de aerosol líquido, o nebulizador para la administración de un polipéptido terapéutico. Dicho kit puede comprender además información escrita sobre las indicaciones y uso de la composición farmacéutica. Además, dicha información puede incluir una información de que la composición de Zcytor17lig está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida a Zcytor17lig.

20 Dentro de un aspecto, la presente memoria descriptiva describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de restos de aminoácido que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: (a) el polipéptido mostrado desde el resto 38 (Val) al 152 (Leu) como se muestra en la SEC ID N°: 2; (b) el polipéptido mostrado desde el resto 27 (Leu) al 164 (Thr) como se muestra en la SEC ID N°: 2; (c) el polipéptido mostrado desde el resto 24 (Thr) al 164 (Thr) como se muestra en la SEC ID N°: 2; y (d) el polipéptido mostrado desde el resto 1 (Met) al 164 (Thr) como se muestra en la SEC ID N°: 2. En una realización, el polipéptido aislado es como se ha desvelado anteriormente, en el que los restos de aminoácido 73, 133 y 147 son cisteínas. En otra realización, el polipéptido aislado es, como se ha desvelado anteriormente, en el que el polipéptido se une al receptor zcytor17 como se muestra en la SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 71. En otra realización, el polipéptido aislado comprende al menos 14 restos de aminoácido contiguos de la SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 11. En otra realización, el polipéptido aislado es como se ha desvelado anteriormente, en el que los restos de aminoácido se seleccionan del grupo que consiste en: (a) restos de aminoácido 38-52 de la SEC ID N°: 2; (b) restos de aminoácido 83-98 de la SEC ID N°: 2; (c) restos de aminoácido 104-117 de la SEC ID N°: 2; y (d) restos de aminoácido 137-152 de la SEC ID N°: 2.

25 Dentro de un segundo aspecto la presente memoria descriptiva describe una proteína de fusión que comprende al menos cuatro polipéptidos en la que el orden de los polipéptidos desde el extremo N al extremo C es: un primer polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácido de 38-52 de la SEC ID N°: 2; un primer espaciador de 6-27 restos de aminoácido; un segundo polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácido seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) restos de aminoácido de la hélice B de IL-2 de la SEC ID N°: 168; (b) restos 65-83 de la hélice B de IL-4 de la SEC ID N°: 164; (c) restos 73-86 de la hélice B de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos 72-81 de la hélice B de GM-CSF de la SEC ID N°: 166; y (e) restos de aminoácido 83-98 de la SEC ID N°: 2; un segundo espaciador de 5-11 restos de aminoácido; un tercer polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácido seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) restos 102-116 de la hélice D de IL-2 de la SEC ID N°: 162; (b) restos 94-118 de la hélice C de IL-4 de la SEC ID N°: 164; (c) restos 91-103 de la hélice C de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos 85-103 de la hélice C de GM-CSF de la SEC ID N°: 166; y (e) restos de aminoácido 104-117 de la SEC ID N°: 2; un tercer espaciador de 3-29 restos de aminoácido; y un cuarto polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácido seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) restos 134-149 de la hélice D de IL-2 de la SEC ID N°: 162; (b) restos 123-141 de la hélice D de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (c) restos 131-151 de la hélice D de IL-4 de la SEC ID N°: 164; (d) restos 120-131 de la hélice D de GM-CSF de la SEC ID N°: 166; y (e) restos de aminoácido 137-152 de la SEC ID N°: 2.

30 Dentro de un tercer aspecto, la presente memoria descriptiva describe una proteína de fusión que comprende al menos cuatro polipéptidos, en la que el orden de los polipéptidos desde el extremo N al extremo C es: un primer polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada entre un grupo que consiste en: (a) restos 27-48 de la hélice A de IL-2 de la SEC ID N°: 162; (b) restos 30-42 de la hélice A de IL-4 de la SEC ID N°: 164; (c) restos 35-45 de la hélice A de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos 30-44 de la hélice A de GM-CSF de la SEC ID N°: 166; y (e) restos de aminoácido 38-52 de la SEC ID N°: 2; un primer espaciador de 6-27 restos de aminoácido; un segundo polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) restos de aminoácido de la hélice B de IL-2 de la SEC ID N°: 168; (b) restos 65-83 de la hélice B de IL-4 de la SEC ID N°: 164; (c) restos 73-86 de la hélice B de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos 72-81 de la hélice B de GM-CSF de la SEC ID N°: 166; y (e) restos de aminoácido 83-98 de la SEC ID N°: 2; un segundo

espaciador de 5-11 restos de aminoácido; un tercer polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) restos 102-116 de la hélice C de IL-2 de la SEC ID N°: 162; (b) restos 94-118 de la hélice C de IL-4 de la SEC ID N°: 164; (c) restos 91-103 de la hélice C de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos 85-103 de la hélice C de GM-CSF de la SEC ID N°: 166; y (e) restos de aminoácido 104-117 de la SEC ID N°: 2; un tercer espaciador de 3-29 restos de aminoácido; y un cuarto polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácido de 137-152 de la SEC ID N°: 2. En otra realización, la proteína de fusión es como se ha desvelado anteriormente, en la que el cuarto polipéptido comprende los restos de aminoácido 137-152 de la SEC ID N°: 2.

Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido desvelado anteriormente. En una realización, el polinucleótido aislado es como se ha desvelado anteriormente, en el que los nucleótidos se seleccionan entre el grupo que consiste en: (a) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID N°: 1 desde el nucleótido 139 al nucleótido 483; (b) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID N°: 1 desde el nucleótido 106 al nucleótido 519; (c) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID N°: 1 desde el nucleótido 97 al nucleótido 519; y (d) un polinucleótido como se muestra en la SEC ID N°: 1 desde el nucleótido 28 al nucleótido 519.

Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido como se desvela en el presente documento.

Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: (a) un promotor de transcripción; (b) un segmento de ADN que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácido seleccionada entre el grupo que consiste en: (i) los restos de aminoácido 38-52 de la SEC ID N°: 2; (ii) los restos de aminoácido 83-98 de la SEC ID N°: 2; (iii) los restos de aminoácido 104-117 de la SEC ID N°: 2; (iv) los restos de aminoácido 137-152 de la SEC ID N°: 2; y (v) combinaciones de los mismos; y (c) un terminador de la transcripción.

Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: (a) un promotor de transcripción; (b) un segmento de ADN que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácido que es al menos un 90 % idéntica a los restos 38 (Val) a 152 (Leu) como se muestran en la SEC ID N°: 2; y (c) un terminador de la transcripción. En una realización, el vector de expresión es como se ha desvelado anteriormente, que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: (a) un promotor de transcripción; (b) un segmento de ADN que codifica un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 38 (Val) a 152 (Leu) de la SEC ID N°: 2; y (c) un terminador de la transcripción.

Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona una célula cultivada que comprende el vector de expresión como se ha desvelado anteriormente.

Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un procedimiento para producir una proteína que comprende: cultivar una célula como se ha desvelado anteriormente en condiciones en las que se expresa el segmento de ADN; y recuperar la proteína codificada por el segmento de ADN.

Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un procedimiento para producir un anticuerpo contra un polipéptido zyctor17lig que comprende: inocular un animal con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polipéptido que consiste en 9 a 141 aminoácidos, en el que polipéptido es idéntico a una secuencia contigua de restos de aminoácido en la SEC ID N°: 2 desde el aminoácido número 24 (Ser) al aminoácido número 164 (Thr); un polipéptido como se ha desvelado anteriormente; (c) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el aminoácido número 38-52; (d) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el aminoácido número 83-98; (e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el aminoácido número 104-117; (f) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el aminoácido número 137-152; (g) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el aminoácido número 38-152; (h) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el aminoácido número 24-164; (c) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el aminoácido número 38-52; (d) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el aminoácido número 85-98; (e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el aminoácido número 104-118; (f) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el aminoácido número 141-157; (g) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el aminoácido número 38-157; (h) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el aminoácido número 24-163; (i) un polipéptido que comprende un epítipo antigénico de acuerdo con el perfil de hidrofilia de Hopp/Woods de la SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 11, en el que el perfil se basa en una ventana de seis restos deslizante, los restos G, S y T ocultos y los restos H, Y y W expuestos ignorados; y en el que el polipéptido induce una respuesta inmune en el animal para producir el anticuerpo; y aislar el anticuerpo a partir del animal.

Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo neutralizador) producido por el procedimiento desvelado anteriormente, en el que el anticuerpo se une a un

polipéptido de la SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 11. En una realización, el anticuerpo desvelado anteriormente se une específicamente a un polipéptido mostrado en la SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 11.

5 Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la estimulación de una respuesta inmune en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno, que comprende las etapas de: (1) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno presente en dicho mamífero; (2) administrar una composición que comprende polipéptido zyc171lig en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno en dicho mamífero; y (4) comparar el nivel del antígeno o patógeno de la etapa 1 con el nivel de antígeno o patógeno de la etapa 3, en el que un cambio en el nivel es indicativo de la estimulación de una respuesta inmune. En una realización, el procedimiento para estimular una respuesta inmune en un mamífero desvelado anteriormente comprende además: (5) volver a administrar una composición que comprende polipéptido zyc171lig en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (6) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno en dicho mamífero; y; (7) comparar el número de nivel de antígeno o patógeno de la etapa 1 con el nivel de antígeno de la etapa 6, en el que un cambio en el nivel es indicativo de estimulación de una respuesta inmune.

15 Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la expansión de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas que comprende cultivar médula ósea o células de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de zyc171lig suficiente para producir un aumento en el número de células linfoides en la médula ósea o células de sangre periférica en comparación con la médula ósea o células de sangre periférica cultivadas en ausencia de zyc171lig. En una realización, el procedimiento para la expansión de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es como se ha desvelado anteriormente, en el que las células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, el procedimiento para la expansión de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es como se ha desvelado anteriormente, en el que las células linfoides son células monocíticas, macrófagos o linfocitos T.

25 Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la estimulación de una respuesta inmune en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno, que comprende: (1) determinar el nivel de un anticuerpo específico de antígeno o patógeno; (2) administrar una composición que comprende polipéptido zyc171lig en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar el nivel después de la administración de anticuerpo específico de antígeno o patógeno; (4) comparar el nivel de anticuerpo en la etapa (1) con el nivel de anticuerpo en la etapa (3), en el que un aumento en el nivel de anticuerpo es indicativo de estimulación de una respuesta inmune.

30 Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la detección de la presencia de ARN de zyc171lig en una muestra biológica, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una sonda de ácido nucleico de zyc171lig en condiciones de hibridación con (i) moléculas de ARN de ensayo aisladas a partir de la muestra biológica, o (ii) moléculas de ácido nucleico sintetizadas a partir de las moléculas de ARN aisladas, en el que la sonda tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una parte de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico desvelada anteriormente, o su complemento y (b) detectar la formación de híbridos de la sonda de ácido nucleico y las moléculas de ARN de ensayo o las moléculas de ácido nucleico sintetizadas, en el que la presencia de los híbridos indica la presencia de ARN de zyc171lig en la muestra biológica.

40 Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de polipéptido zyc171lig que comprende los restos 27-164 de la SEC ID N°: 2 en una muestra biológica, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo como se desvela en las reivindicaciones, en el que el contacto se realiza en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la muestra biológica y (b) detectar cualquier anticuerpo unido o fragmento de anticuerpo unido.

45 Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la destrucción de células cancerosas que comprende obtener *ex vivo* un tejido o muestra biológica que contiene células cancerosas a partir de un paciente, o identificar las células cancerosas *in vivo*; producir un polipéptido por el procedimiento desvelado en el presente documento; formular el polipéptido en un vehículo farmacéuticamente aceptable; y administrar al paciente o exponer las células cancerosas al polipéptido; en el que el polipéptido destruye a las células. En una realización, el procedimiento de destrucción de células cancerosas es como se ha desvelado anteriormente, en el que polipéptido se conjuga adicionalmente con una toxina. En una realización, el anticuerpo es como se ha desvelado anteriormente, en el que el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en: (a) anticuerpo policlonal, (b) anticuerpo monoclonal murino, (c) anticuerpo humanizado derivado de (b), (d) un fragmento de anticuerpo y (e) anticuerpo monoclonal humano.

55 Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: (a) el polipéptido mostrado desde el resto 38 (Val) al 152 (Leu) como se muestra en la SEC ID N°: 2; (b) el polipéptido mostrado desde el resto 27 (Leu) al 164 (Thr) como se muestra en la SEC ID N°: 2; (c) el polipéptido mostrado desde el resto 24 (Thr) al 164 (Thr) como se muestra en la SEC ID N°: 2; y (d) el polipéptido mostrado desde el resto 1 (Met) al 164 (Thr) como se muestra en la SEC ID N°: 2. En otra realización, el anticuerpo es como se ha desvelado anteriormente, en el que el anticuerpo comprende además un radionúclido, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimioluminiscente, marcador peptídico, partícula magnética,

60

fármaco o toxina.

Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la inhibición de la proliferación o la diferenciación inducida por zyc171lg de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas, que comprende cultivar médula ósea o células de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de un anticuerpo como se ha desvelado en el presente documento suficiente para reducir la proliferación o diferenciación de las células hematopoyéticas en la médula ósea o células de sangre periférica en comparación con la médula ósea o células de sangre periférica cultivadas en ausencia de receptores de citocinas solubles. En una realización, el procedimiento para inhibir la proliferación o diferenciación inducida por zyc171lg de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es como se ha desvelado anteriormente, en el que las células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, el procedimiento para inhibir la proliferación o diferenciación inducida por zyc171lg de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es como se ha desvelado anteriormente, en el que las células linfoides son macrófagos o linfocitos T.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso en la reducción de la inflamación inducida por un polipéptido que comprende los restos 27-164 de la SEC ID N°: 2.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en un procedimiento para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación, comprendiendo dicho procedimiento: (1) determinar el nivel de una molécula inflamatoria; (2) administrar una composición que comprende el anticuerpo en un vehículo farmacéutico aceptable; (3) determinar el nivel de la molécula inflamatoria después de la administración; (4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa de (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (3), en el que la ausencia de un aumento o una reducción de del nivel de la molécula inflamatoria es indicativa de supresión de la respuesta inflamatoria. En una realización, el anticuerpo es como se define en las reivindicaciones, en las que el anticuerpo comprende además un radionúclido, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimioluminiscente, marcador peptídico, partícula magnética, fármaco o toxina.

Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la inhibición de la proliferación o la diferenciación inducida por zyc171lg de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas, que comprende cultivar médula ósea o células de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de un anticuerpo como se desvela en el presente documento suficiente para reducir la proliferación o diferenciación de las células hematopoyéticas en la médula ósea o células de sangre periférica en comparación con la médula ósea o células de sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor de citocinas soluble. En una realización, el procedimiento para inhibir la proliferación o diferenciación inducida por zyc171lg de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es como se ha desvelado anteriormente, en el que las células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, el procedimiento para inhibir la proliferación o diferenciación inducida por zyc171lg de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es como se ha desvelado anteriormente, en el que las células linfoides son macrófagos o linfocitos T.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en la reducción de la inflamación inducida por un polipéptido que comprende los restos 31-163 de la SEC ID N°: 11.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en un procedimiento para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación, comprendiendo dicho procedimiento: (1) determinar el nivel de una molécula inflamatoria; (2) administrar una composición que comprende el anticuerpo en un vehículo farmacéutico aceptable; (3) determinar el nivel de la molécula inflamatoria después de la administración; (4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (3), en el que la ausencia de un aumento o una reducción del nivel de la molécula inflamatoria es indicativa de supresión de la respuesta inflamatoria.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de un mamífero que padece una enfermedad inflamatoria en la que interviene zyc171lg, en el que el antagonista es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende los restos 27-164 de la SEC ID N°: 2 o los restos 31-163 de la SEC ID N°: 11. En una realización, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica, tal como una enfermedad inflamatoria crónica seleccionada del grupo que consiste en: enfermedad inflamatoria intestinal; colitis ulcerosa; enfermedad de Crohn; dermatitis atópica; eccema; y psoriasis. En otra realización, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda tal como una enfermedad inflamatoria aguda seleccionada del grupo que consiste en endotoxemia, septicemia, síndrome de choque tóxico y enfermedad infecciosa. En otra realización, el anticuerpo comprende además un radionúclido, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimioluminiscente, marcador peptídico, partícula magnética, fármaco o toxina.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la inflamación en

un paciente, que comprende: incubar un tejido o muestra biológica de un paciente con un anticuerpo como se define en las reivindicaciones en condiciones en las que el anticuerpo se une a su polipéptido complementario en un tejido o muestra biológica; visualizar el anticuerpo unido al tejido o muestra biológica; y comparar los niveles de anticuerpo unido al tejido o muestra biológica del paciente con una muestra biológica o tejido de control normal, en el que un aumento en el nivel de anticuerpo unido al tejido o muestra biológica del paciente con respecto al tejido o muestra biológica normal es indicativo de inflamación en el paciente.

Dentro de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la detección de inflamación en un paciente, que comprende: obtener un tejido o muestra biológica de un paciente; marcar un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1 o el complemento de la SEC ID N°: 1; incubar el tejido o muestra biológica en condiciones en las que el polinucleótido hibridará con una secuencia polinucleotídica complementaria; visualizar el polinucleótido marcado en el tejido o muestra biológica; y comparar el nivel de hibridación del polinucleótido marcado en el tejido o muestra biológica del paciente con un tejido o muestra biológica de control normal, en el que un aumento en la hibridación del polinucleótido marcado en el tejido o muestra biológica del paciente con respecto al tejido o muestra biológica de control normal es indicativo de inflamación en el paciente.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de Quimera MPL-polipéptido zcytor17: MPL extracelular y dominio TM fusionado al dominio de señalización intracelular de zcytor17

El dominio extracelular 5' del receptor de MPL murino se aisló a partir de un plásmido que contenía el receptor de MPL murino (plásmido PHZ1/MPL) por digestión con EcoRI y BamHI generando un fragmento de 1164 pb. La digestión se realizó en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento se aisló usando el kit de extracción de gel Qiaquick (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El resto del dominio extracelular de MPL y el dominio transmembrana se generaron usando PCR con cebadores ZC6.673 (SEC ID N°: 13) y ZC29.082 (SEC ID N°: 14). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 15 ciclos a 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min; seguido de 72 °C durante 7 min; después una inmersión de 4 °C. El producto de PCR se procesó en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento del receptor de MPL de aproximadamente 400 pb se aisló usando el kit de extracción de gel Qiaquick™ (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El dominio intracelular de zcytor17 humano se aisló a partir de un plásmido que contenía ADNc del receptor zcytor17 (#23/pCAP) usando PCR con cebadores ZC29.083 (SEC ID N°: 15) y ZC29.145 (SEC ID N°: 16). La secuencia polinucleotídica que corresponde a la secuencia codificante del receptor zcytor17 se muestra en la SEC ID N°: 5. Las condiciones de reacción fueron como se ha indicado anteriormente. El producto de PCR se procesó en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento de zcytor17 de aproximadamente 320 pb se aisló usando el kit de extracción de gel Qiaquick siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cada uno de los fragmentos de PCR aislados descritos anteriormente se mezclaron en una relación volumétrica 1:1 y se usaron en una reacción PCR usando ZC6673 (SEC ID N°: 13) y ZC29145 (SEC ID N°: 16) para crear todo excepto la parte 5' MPL de la quimera MPL-zcytor17. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 15 ciclos a 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min; seguido de 72 °C durante 7 min; y después una inmersión de 4 °C. El producto de PCR entero se procesó en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento de la quimera MPL-zcytor17 de aproximadamente 700 pb se aisló usando el kit de extracción de gel Qiaquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de la quimera MPL-zcytor17 se digirió con BamHI (BRL) y XbaI (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante. La digestión entera se procesó en un gel de agarosa al 1 % y la quimera MPL-zcytor17 escindida se aisló usando el kit de extracción de gel Qiaquick™ (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La quimera MPL-zcytor17 escindida resultante más el fragmento EcoRI/BamHI 5' MPL descrito anteriormente se insertaron en un vector de expresión para generar el receptor quimérico MPL-zcytor17 completo como se describe más adelante.

El vector de expresión receptor pZP-7 se digirió con EcoRI (BRL) y XbaI (BRL) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se purificó en gel como se ha descrito anteriormente. Este fragmento de vector se combinó con la quimera de PCR MPL-zcytor17 escindida con EcoRI y XbaI aislada anteriormente y el fragmento EcoRI y BamHI 5' MPL aislado anteriormente en una reacción de ligamiento. El ligamiento se realizó usando Ligasa de T4 (Epicentre Technologies), a temperatura ambiente durante 1 hora siguiendo las instrucciones del fabricante. Una muestra del ligamiento se introdujo por electroporación en células *E. coli* electrocompetentes DH10B ElectroMAX™ (25 µF, 200 Ω, 1,8 V). Los transformantes se cultivaron en placas con LB+Ampicilina y las colonias individuales se exploraron por miniprep (Qiagen) y digestión con EcoRI para comprobar la presencia de la quimera MPL-zcytor17. La digestión con EcoRI de los clones correctos produjo un fragmento de aproximadamente 2 kb. La confirmación de la secuencia de la quimera MPL-zcytor17 se realizó por análisis de secuencia. El inserto fue de aproximadamente 3,1 kb y fue de longitud completa.

Ejemplo 2

Proliferación basada en quimera MPL-zcytor17 en ensayo de BAF3 usando AlamarBlueA. Construcción de células BaF3 que expresan quimera MPL-zcytor17

Se mantuvieron células BaF3, una línea celular prelinfoide dependiente de interleucina-3 (IL-3) derivada de médula ósea murina (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734; 1985; Mathey-Prevot y col., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986) en medio completo (medio RPMI, JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) suplementado con suero bovino fetal inactivado térmicamente al 10 %, 1-2 ng/ml de IL-3 murina (mIL-3) (R & D, Minneapolis, MN), L-glutaMax-1™ 2 mM (Gibco BRL), Piruvato Sódico 1 mM (Gibco BRL) y antibióticos PSN (GIBCO BRL). Antes de la electroporación, se preparó ADN del plásmido pZP-7/MPL-zcytor17 (Ejemplo 1) y se purificó usando un kit Qiagen Maxi Prep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células BaF3 para la electroporación se lavaron dos veces en medio RPMI y después se resuspendieron en medio RPMI a una densidad celular de 10⁷ células/ml. Un ml de las células BaF3 resuspendidas se mezcló con 30 µg de ADN del plásmido pZP-7/MPL-zcytor17 y se transfirió a cámaras de electroporación desechables separadas (GIBCO BRL). A temperatura ambiente, a las células se les aplicaron 5x shocks de 1 ms a 800 voltios seguidos de 5x shocks de 2 ms a 600 voltios administrados por un aparato de electroporación (Cyto-Pulse). Como alternativa las células se sometieron a electroporación con dos pulsos en serie (800 µFAD/300V; seguido de 1180 µFAD/300 V) administrados por un aparato de electroporación Cell-Porator (GibcoBRL). Las células sometidas a electroporación se transfirieron a 50 ml de medio completo y se pusieron en un incubador durante 15-24 horas (37 °C, CO₂ al 5 %). Después se añadió selección con Geneticin™ (Gibco) (1 mg/ml de G418) a las células en un matraz T-162 para aislar el grupo resistente a G418. Los grupos de células BaF3 transfectadas, denominadas en lo sucesivo células BaF3/MPL-zcytor17, se ensayaron con respecto a la capacidad de señalización como se describe más adelante.

B. Ensayo de la capacidad de señalización de las células BaF3/MPL-zcytor17 usando un Ensayo de Proliferación con AlamarBlue

Se centrifugaron células BaF3/MPL-zcytor17 y se lavaron en medio completo, descrito anteriormente, pero sin mIL-3 (denominado en lo sucesivo "medio sin mIL-3"). Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para asegurar la eliminación de la mIL-3. Después, las células se contaron en un hemacitómetro. Las células se cultivaron en un formato de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando el medio sin mIL-3.

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

Los resultados confirmaron la capacidad de señalización de la parte intracelular del receptor zcytor17, ya que la trombopoyetina inducía la proliferación aproximadamente 9-13 veces con respecto al nivel de fondo a concentraciones de mTPO de 50 ng/ml y superiores.

Ejemplo 3Construcción de Vector de Expresión que Expresa zcytor17 de longitud completa: pZp7pX/zcytor17A. Clonación de ADNc de zcytor17 de longitud completa para la expresión:

Para obtener un ADNc de zcytor17 de longitud completa, se aislaron productos de PCR 5' y 3' y se unieron usando un sitio PstI interno. Los cebadores de PCR se diseñaron usando la secuencia de nucleótidos SEC ID N°: 4 e incluyen sitios de restricción BamHI y Xho I para la clonación.

Se generó un producto de PCR 5' usando una biblioteca de ADNc WI-38 como molde y los oligonucleótidos ZC29.359 (SEC ID N°: 18) y ZC27.899 (SEC ID N°: 19) como cebadores. WI-38 es una biblioteca de ADNc interna generada a partir de una línea celular de pulmón embrionario humano (ATCC CRL-2221). Esta reacción PCR 5' se realizó como se indica a continuación: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos y después 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 10 °C. La reacción PCR usó aproximadamente 3 µg de plásmido preparado a partir de la biblioteca de ADNc, 20 pmoles de cada oligonucleótido y cinco unidades de ADN polimerasa de PWO (Roche). Aproximadamente un 90 % de producto de PCR 5' se precipitó con etanol, se digirió con BamHI y PstI y se purificó en un gel de agarosa al 1,0 %. La banda de aproximadamente 600 pb se escindió y se usó para ligamiento con el vector de clonación pUC18 digerido con BamHI y PstI. Los transformantes resultantes se secuenciaron para confirmar la secuencia de ADNc de zcytor17. Para uno de estos transformantes, se preparó

ADN plasmídico y se digirió con BamHI y PstI. La banda de aproximadamente 600 pb resultante se purificó en gel y se usó para un ligamiento para formar un ADNc de longitud completa.

Se generó un producto de PCR 3' usando una biblioteca de ADNc interna de testículo humano como molde y los oligonucleótidos ZC27.895 (SEC ID N°: 20) y ZC29.122 (SEC ID N°: 21) como cebadores. Esta reacción PCR 3' se realizó como se indica a continuación: 30 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 65 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 2 minutos y después 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 10 °C. La reacción PCR 3' entera se purificó en un gel de agarosa al 1,0 % y se escindió la banda principal de 1500 pb. Esta banda se clonó en el vector PCRBlunt II TOPO usando el kit Zeroblunt TOPO (Invitrogen). Los transformantes resultantes se secuenciaron para confirmar la secuencia de ADNc de zcytor17. Para uno de estos transformantes, se preparó ADN plasmídico y se digirió con PstI y XhoI. La banda de aproximadamente 1500 pb resultante se purificó en gel. Se realizó un ligamiento de tres partes con el fragmento BamHI-Pst I 5' anterior, el fragmento PstI-XhoI 3' y el vector de expresión pZp7pX digerido con BamHI y XhoI. Esto generó un plásmido pZp7pX que contenía un ADNc de longitud completa para zcytor17 (SEC ID N°: 4), denominado pZp7p/zcytor17. El ADNc de zcytor17 de longitud completa en pZp7p/zcytor17 tiene una mutación silenciosa que cambia la T por G en la posición 1888 de la SEC ID N°: 4 (que codifica un resto de Gly en el resto 464 de la SEC ID N°: 5). Como esta mutación era silenciosa, el ADNc de zcytor17 en pZp7p/zcytor17 codifica el polipéptido mostrado en la SEC ID N°: 5. El plásmido pZp7pX es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de CMV, intrón A, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes y un terminador de hormona de crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión con marcador de selección de mamífero que tiene un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de resistencia a puromicina y el terminador de SV40.

B. Construcción de Vector de Expresión que Expresa WSX-1 de Longitud Completa

El receptor WSX-1 entero (SEC ID N°: 9) se aisló a partir de un plásmido que contenía el ADNc del receptor WSX-1 (SEC ID N°: 8) (Patente de Estados Unidos N° 5.925.735). Se digirió ADN del plásmido hWSX-1/pBluescript SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA) con EcoRI y XhoI para generar un fragmento de 1075 pb, y también se digirió con XhoI y XbaI para generar un fragmento de 900 pb. Los dos productos de digestión se procesaron en un gel de agarosa al 1 % y se aislaron los fragmentos de WSX-1 escindidos.

El vector de expresión receptor pZp7Z se digirió con EcoRI y XbaI y se purificó en gel como se ha descrito anteriormente. Este fragmento de vector se combinó con los dos fragmentos de zcytor17 escindidos aislados anteriormente en una reacción de ligamiento usando la ligasa T4 (BRL). El ligamiento se incubó a temperatura ambiente durante una noche. Una muestra del ligamiento se introdujo por electroporación en células *E. coli* electrocompetentes DH10B electroMAX™ (25 µF, 200Ω, 2,3V). Se cultivaron seis colonias y se preparó ADN sometido a miniprep y se digirió para confirmar el inserto de longitud completa correcto de WSX-1 de 2,0 kb. El plásmido resultante es pZP7Z/WSX-1.

Ejemplo 4

35 Proliferación basada en Zcytor17 en un ensayo de BAF3 usando AlamarBlue

A. Construcción de Células BaF3 que Expresan el Receptor zcytor17, receptor WSX-1 y OSMR

Se construyeron células BaF3 que expresaban el receptor zcytor17 de longitud completa según el Ejemplo 2A anterior, usando 30 µg del vector de expresión de zcytor17, descrito en el Ejemplo 3A. Una excepción es que en lugar de selección con Geneticina, se añadieron 2 µg/ml de Puromicina (ClonTech) a las células transfectadas en un matraz T-162 para aislar el grupo resistente a puromicina. Las células BaF3 que expresaban el ARNm del receptor zcytor17 se denominaron BaF3/zcytor17. Para obtener clones, se contaron las células BaF3/zcytor17 en un hemocitómetro y se cultivaron a 1 célula/pocillo, 0,5 células/pocillo, 0,1 células/pocillo y 0,01 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Quince clones se aumentaron a escala en matraces T75 y cinco clones se ensayaron con respecto a la expresión de zcytor17. Se aisló el ARN total a partir de los sedimentos celulares usando el Kit de Aislamiento de ARN total S.N.A.P.™ (Invitrogen). Se sintetizó ADNc de primera cadena usando el kit de RT-PCR de Primera Cadena proSTAR™, y después PCR con cebadores específicos de zcytor17 ZC29.180 (SEC ID N°: 22) y ZC29.122 (SEC ID N°: 23) para explorar los clones con respecto a la expresión de zcytor17. Se eligió un clon, BaF3/zcytor17#15 para expandir y transfectar con el vector de expresión de WSX-1.

Se construyeron células BaF3 que expresaban zcytor17 y WSX-1 de longitud completa según el Ejemplo 2A anterior, usando 30 µg del vector de expresión de WSX-1 WSX-1/pZp7Z (Ejemplo 3B) para someter a electroporación las células BaF3/zcytor17#15. Una excepción es que en lugar de selección con Geneticina, se añadieron 200 µg/ml de Zeocina (Invitrogen) a las células transfectadas en un matraz T-162 para aislar el grupo resistente a zeocina. Las células BaF3 que expresaban zcytor17 y WSX-1 se denominaron BaF3/zcytor17/hWSX-1. Para obtener clones, se cultivaron grupos de células BaF3/zcytor17/hWSX-1 con dilución limitante en placas de 96 pocillos. Los clones resultantes se expandieron y el ARN total se aisló usando el Kit de Aislamiento total S.N.A.P.™ (Invitrogen). Se sintetizó ADNc de primera cadena usando el kit de RT-PCR de Primera Cadena proSTAR™ y después se usó PCR con cebadores específicos de WSX-1 ZC9791 (SEC ID N°: 24) y ZC9793 (SEC ID N°: 25) para explorar los clones con respecto a la expresión de WSX-1. Se eligió un clon, BaF3/zcytor17/hWSX-1#5 para

expandir adicionalmente y transfectar con el vector de expresión OSMRbeta

Se construyeron células BaF3 que expresaban zcytor17, WSX-1 y OSMRbeta de longitud completa según el Ejemplo 2A anterior usando 30 µg del vector de expresión de OSMRbeta OSMR/pZp7NX como se describe en el Ejemplo 29 para someter a electroporación las células BaF3/zcytor17/hWSX-1#5. Las células BaF3 que expresaban ARNm de zcytor17, WSX-1 y OSMRbeta se denominaron BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR. Para obtener clones, se cultivaron grupos de células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta a dilución limitante en placas de 96 pocillos. Se expandieron clones individuales y se aisló el ARN total usando un Kit de Aislamiento de ARN total S.N.A.P.[™] (Invitrogen). Se sintetizó ADNc de primera cadena usando el kit de RT-PCR de Primera Cadena proSTAR[™] y después PCR con cebadores específicos de OSMRbeta ZC40109 (SEC ID N^o: 26) y ZC40112 (SEC ID N^o: 27) para explorar los clones con respecto a la expresión de zcytor17, WSX-1 y OSMR. Se seleccionó un clon, BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR#5 y estas células se usaron para seleccionar zcytor17lig como se describe más adelante en los Ejemplos 5 y 6.

B. Construcción de Células BaF3 que Expresan receptor zcytor17 y OSMR

Se construyeron células BaF3 que expresaban el receptor zcytor17 de longitud completa según el Ejemplo 2A anterior, usando 30 µg del vector de expresión de zcytor17, descrito en el Ejemplo 3A. Una excepción es que en lugar de selección con Geneticina, se añadieron 2 µg/ml de Puomicina (ClonTech) a las células transfectadas en un matraz T-162 para aislar el grupo resistente a puomicina. Las células BaF3 que expresaban el ARNm del receptor zcytor17 se denominaron BaF3/zcytor17. Para obtener clones, se cultivaron grupos de células BaF3/zcytor17 a dilución limitante en placas de 96 pocillos. Estos clones se expandieron en cultivo y se aisló el ARN total usando un Kit de Aislamiento de ARN total S.N.A.P.[™] (Invitrogen). Se sintetizó ADNc de Primera Cadena usando el kit de RT-PCR de Primera Cadena proSTAR[™] y después se usó PCR para explorar los clones con respecto a la expresión de zcytor17. Se eligió un clon, BaF3/zcytor17 #15 para expandir y transfectar con el vector de expresión de OSMRbeta.

Se construyeron células BaF3 que expresaban zcytor17 y OSMRbeta de longitud completa según el Ejemplo 2A anterior, usando 30 µg del vector de expresión de OSMRbeta OSMR/pZp7NX (Ejemplo 29) para someter a electroporación las células BaF3/zcytor17#15. Las células BaF3 que expresaban el ARNm de zcytor17 y OSMRbeta se denominaron BaF3/zcytor17/OSMR. Estas células se usaron para seleccionar zcytor17lig como se describe más adelante en el Ejemplo 5.

Ejemplo 5

Selección de zcytor17lig usando células BaF3/Zcytor17/WSX-1/OSMRbeta usando Ensayo de Proliferación con AlamarBlue

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

Se obtuvieron células CCRF-CEM y CCRF-HSB2 a partir de ATCC y se estimularon en cultivo para producir medio acondicionado para ensayar con respecto a la presencia de la actividad de zcytor17lig como se describe más adelante. Las células en suspensión se sembraron a 2×10^5 células/ml o 5×10^5 células/ml en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM (GibcoBRL), PSN 1X (GibcoBRL) y se activaron con 10 ng/ml de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Calbiochem, San Diego, CA) y 0,5 µg/ml de Ionomycin[™] (Calbiochem) durante 24 o 48 horas. El sobrenadante de las células estimuladas se usó para ensayar la proliferación de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o las células BaF3/zcytor17/OSMRbeta como se describe más adelante.

B. Exploración de zcytor17lig usando células BaF3/Zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta usando un Ensayo de Proliferación con Alamar Blue

Se centrifugaron células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta y se lavaron en medio sin mL-3. Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para asegurar la eliminación de la mL-3. Después, las células se contaron en un hemacitómetro. Las células se cultivaron en un formato de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando el medio sin mL-3.

La proliferación de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o las células BaF3/zcytor17/OSMRbeta se evaluó usando medio acondicionado de células CCRFCEM y CCRF-HSB2 activadas (véase el Ejemplo 5A). El medio acondicionado se diluyó con medio sin mL-3 a concentraciones del 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,5 %, 0,75 % y 0,375 %. Se añadieron cien microlitros del medio acondicionado diluido a las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o las células BaF3/zcytor17/OSMRbeta. El volumen de ensayo total fue de 200 µl. Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 3-5 días después de lo cual se añadió AlamarBlue (Accumed, Chicago, IL) a 20 µl/pocillo. De nuevo, las placas se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 horas. Las placas se leyeron en el lector de placas Fmax[™] (Molecular devices) como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 2).

Los resultados confirmaron la respuesta proliferativa de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o las células BaF3/zcytor17/OSMRbeta a un factor presente en el medio acondicionado de CCRF-CEM y CCRF-HSB2 activadas. La respuesta, según se midió, fue aproximadamente 10 veces mayor que el nivel de fondo a la concentración del 25

%. Las células BaF3 no transfectadas no proliferaban en respuesta a este factor, ni tampoco lo hacían las células BaF3 transfectadas con zcytor17 y WSX-1 (células BaF3/zcytor17/WSX-1), mostrando que este factor era específico para receptores Zcytor17/OSMRbeta o zcytor17/OSMRbeta/WSX-1. Además, el receptor zcytor17 soluble disminuía esta actividad proliferativa de zcytor17lig en las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta (véase el Ejemplo 11). Se esperan resultados similares en células BaF3/zcytor17/OSMRbeta.

C. Fuente Primaria Humana usada para aislar zcytor17lig

Se realizaron extracciones de cien mililitros de sangre a partir de cada uno de seis donantes. La sangre se extrajo usando 10 tubos vacutainer de 10 ml que contenían heparina. Se reunió la sangre de seis donantes (600 ml), se diluyó 1:1 en PBS, y se separó usando un Ficoll-Plaque® PLUS (Pharmacia Biotech). El rendimiento de células humanas primarias aisladas después de la separación en gradiente de ficoll fue de $1,2 \times 10^9$ células.

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

Se preparó una columna VS+ (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La columna VS+ después se puso en un campo magnético VarioMACS (Miltenyi). La columna se equilibró con 5 ml de tampón MACS. Las células humanas primarias aisladas después se aplicaron a la columna. Las células negativas para CD3 se dejaron pasar a su través. La columna se aclaró con 9 ml (3 x 3 ml) de tampón MACS. La columna después se retiró del imán y se puso sobre un tubo falcon de 15 ml. Las células CD3+ se eluyeron añadiendo 5 ml de tampón MACS a la columna y las células unidas se descargaron usando el émbolo proporcionado por el fabricante. La incubación de las células con las perlas magnéticas de CD3, los lavados y las etapas de columna VS+ (incubación a lo largo de la elución) anteriores se repitieron 5 veces más. Las fracciones de CD3+ resultantes de las seis separaciones de columna se reunieron. El rendimiento de células humanas seleccionadas CD3+ fue de 3×10^8 células en total.

Se retiró una muestra de las células humanas seleccionadas CD3+ reunidas para tinción y clasificación en un separador de células con anticuerpos fluorescentes (FACS) para evaluar su pureza. Las células seleccionadas CD3+ humanas eran un 91 % de células CD3+.

Las células seleccionadas CD3+ humanas se activaron por incubación en RPMI + 5 % de FBS + 10 ng/ml de PMA y 0,5 µg/ml de Ionomicina (Calbiochem) durante 13 horas a 37 °C. El sobrenadante de estas células humanas seleccionadas CD3+ activadas se ensayó con respecto a la actividad zcytor17lig como se describe más adelante. Además, las células humanas seleccionadas CD3+ activadas se usaron para preparar una biblioteca de ADNc como se describe en el Ejemplo 6 proporcionado a continuación.

D. Ensayo del sobrenadante de células humanas seleccionadas CD3+ activadas con respecto a zcytor17lig usando células BaF3/Zcytor17/WSX-1/OSMRbeta y un Ensayo de Proliferación con AlamarBlue

Se centrifugaron células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta y se lavaron en medio sin mL-3. Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para asegurar la eliminación de la mL-3. Después las células se contaron en un hemacitómetro. Las células se cultivaron en un formato de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando el medio sin mL-3.

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

Los resultados confirmaron la respuesta proliferativa de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o las células BaF3/zcytor17/OSMRbeta a un factor presente en el medio acondicionado de células humanas seleccionadas CD3+ activadas. La respuesta, según se midió, fue aproximadamente 15 veces mayor que el nivel de fondo a la concentración del 25 %. Las células BaF3 no transfectadas no proliferaban en respuesta a este factor, ni tampoco lo hacían las células BaF3 transfectadas con zcytor17 y WSX-1 (células BaF3/zcytor17/WSX-1), mostrando que este factor era específico para receptores Zcytor17/OSMRbeta o zcytor17/OSMRbeta/WSX-1.

Ejemplo 6

Clonación de zcytor17lig humano a partir de una Biblioteca de células seleccionadas CD3+ humanas

La exploración de una biblioteca de ADNc de células seleccionadas CD3+ activadas humanas primarias reveló un ADN aislado que es un nuevo miembro de la familia de citocinas de cuatro haces helicoidales. Este ADNc codificaba el zcytor17lig. El ADNc se identificó por exploración de la actividad del zcytor17lig usando los receptores zcytor17/WSX-1/OSM.

A. El vector para la construcción de la biblioteca seleccionada CD3+

El vector para la construcción de la biblioteca seleccionada CDS3+ fue pZP7NX. El vector pZP7NX se construyó como se indica a continuación: se retiró la región codificante del marcador de selección de DHFR en el vector pZP7 por digestión del ADN con las enzimas de restricción NcoI y PstI (Boehringer Mannheim). El ADN digerido se procesó en un gel de agarosa al 1 %, se cortó y el gel se purificó usando el Kit de Extracción de Gel Qiagen (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificó un fragmento de ADN que representaba la región codificante del marcador selectivo de Zeocina por el procedimiento de PCR con cebadores ZC13.946 (SEC ID N°: 28) y C13,945 (SEC ID N°: 29), y pZeoSV2(+) como molde. Hay sitios de restricción PstI y BclI adicionales en el cebador ZC13.946 (SEC ID N°: 28), y sitios NcoI y SfuI adicionales en el cebador ZC13.945 (SEC ID N°: 29). El fragmento de PCR se cortó con enzimas de restricción PstI y NcoI y se clonó en el vector pZP7 preparado por escisión con las mismas dos enzimas y posterior purificación en gel. Este vector se denominó pZP7Z. Después, la región codificante de Zeocina se retiró por digestión del ADN del vector pZP7Z con enzimas de restricción Bell y SfuI. El ADN digerido se procesó en un gel de agarosa al 1 %, se cortó y se purificó en gel, y después se unió con un fragmento de ADN de la región codificante de Neomicina cortada a partir del vector pZem228 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATTC), Manassas, VA; N° de Depósito de ATCC 69446) con las mismas enzimas de restricción (BclI y SfuI).

Este nuevo vector se denominó pZP7N, en el que la región codificante para el marcador de selección de DHFR se reemplazó por la región codificante para un marcador selectivo de Neomicina del vector pZem228. Se añadió un fragmento de relleno que incluía un sitio XhoI a pZP7N para crear un vector adecuado para la clonación direccional de alta eficacia del ADNc; este nuevo vector se denominó pZP7NX. Para preparar el vector para el ADNc, se digirieron 20 µg de pZP7NX con 20 unidades de EcoRI (Life Technologies Gaithersberg, MD) y 20 unidades de XhoI (Boehringer Mannheim Indianapolis, IN) durante 5 horas a 37 °C, y después a 68 °C durante 15 minutos. El producto de digestión después se procesó en un gel IXTAE de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8 % para separar el relleno del vector. La banda del vector se escindió y se digirió con "beta-Agarasa" (New England Biolabs, Beverly, MA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después de la precipitación con etanol, el vector digerido se resuspendió en agua a 45 ng/ml en la preparación para el ligamiento de la biblioteca de ADNc seleccionada CD3+ descrita más adelante.

B. Preparación de biblioteca de ADNc de células seleccionadas CD3+ activadas humanas primarias

Se aislaron aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células seleccionadas CD3+ humanas primarias estimuladas en ionomicina/PMA por centrifugación después del cultivo a 37 °C durante 13 horas (Ejemplo 5C). El ARN total se aisló a partir del sedimento celular usando el kit "RNeasy Midi" de Qiagen, Inc. (Valencia, CA). Se aisló ARNm a partir de 225 microgramos de ARN total usando el "kit de purificación de ARNm MPG" de CPG Inc. (Lincoln Park, NJ). Se aislaron 3,4 microgramos de ARNm y se convirtieron en ADNc bicatenario usando el siguiente procedimiento.

Se sintetizó ADNc de primera cadena a partir de células seleccionadas CD3+ humanas estimuladas como se indica a continuación. Se mezclaron 9 microlitros de ARN CD3+ poli(A) seleccionado con oligo d (T) a una concentración de 0,34 µg/µl y se mezclaron 1,0 µl de cebador de primera cadena ZC18.698 (SEC ID N°: 30) a 1 µg/µl que contenía un sitio de restricción XhoI y se calentaron a 65 °C durante 4 minutos y se enfriaron por refrigeración en hielo. La síntesis de ADNc de primera cadena se inició mediante la adición de 9 µl de tampón de primera cadena (tampón SUPERScript® 5x (Life Technologies), 4 µl de ditiotreitol 100 mM y 2 µl de una solución de desoxinucleótido trifosfato que contenía una concentración 10 mM de cada uno de dATP, dGTP, dTTP y 5-metil-dCTP (Pharmacia Biotech Inc.) a la mezcla de ARN-cebador. La mezcla de reacción se incubó a 45 °C durante 4 minutos seguido de la adición de 8 µl de SuperscriptII® 200 U/µl, RNasa H-transcriptasa inversa (Life technologies). La reacción se incubó a 45 °C durante 45 minutos seguido de una rampa de incubación de 1°C cada 2 minutos hasta 50 °C donde se mantuvo la reacción durante 10 minutos. Para desnaturalizar cualquier estructura secundaria y permitir la extensión adicional del ADNc, la reacción después se calentó a 70 °C durante 2 minutos y después se redujo a 55 °C durante 4 minutos, después de lo cual se añadieron 2 µl de SuperscriptII® RT y se incubó 15 minutos más seguido de una rampa hasta 70 °C 1 minuto/1 °C. Los nucleótidos no incorporados se retiraron del ADNc por precipitación dos veces en presencia de 2 µg de vehículo de glucógeno, acetato amónico 2,0 M y 2,5 volúmenes de etanol, seguido de un lavado de 100 µl con etanol al 70 %. El ADNc se resuspendió en 98 µl de agua para uso en la síntesis de la segunda cadena.

La síntesis de la segunda cadena se realizó sobre el ADNc de la primera cadena en condiciones que promovían el cebado con la primera cadena de la síntesis de segunda cadena dando como resultado la formación de una horquilla de ADN. La reacción de segunda cadena contenía 98 µl del ADNc de primera cadena, 30 µl de tampón de polimerasa I 5x (Tris:Hcl 100 mM; pH 7,5, KCl 500 mM, MgCl₂ 25 mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM), 2 µl de ditiotreitol 100 mM, 6 µl de una solución que contenía una concentración 10 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 5 µl de b-NAD 5 mM, 1 µl de ADN ligasa de *E. coli* 3 U/µl (New England Biolabs Inc.) y 4 ml de ADN polimerasa de *E. coli* 10 U/ml (New England Biolabs Inc.). La reacción se preparó a temperatura ambiente y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos seguido de la adición de 4 µl de RNasa H 3,8 U/µl (Life Technologies). La reacción se incubó a 15 °C durante dos horas seguido de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron diez microlitros de TRIS 1 M pH 7,4 a la reacción y se extrajo dos veces con fenol/cloroformo y una vez con cloroformo,

las fases orgánicas después se extrajeron de nuevo con 50 µl de TE (TRIS 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM), se reunieron con la otras fases acuosas y se precipitaron con etanol en presencia de acetato sódico 0,3 M. El sedimento se lavó con 100 µl de etanol al 70 %, se secó al aire y se resuspendió en 40 µl de agua.

5 El ADN monocatenario de la estructura de horquilla se escindió usando nucleasa de judía mungo. La mezcla de reacción contenía 40 µl de ADNc de segunda cadena, 5 µl de tampón de nucleasa de judía mungo 10 x (Life technologies), 5 µl de nucleasa de judía mungo (Pharmacia Biotech Corp.) diluida a 1U/µl en tampón de nucleasa de judía mungo 1X. La reacción se incubó a 47 °C durante 45 minutos. La reacción se terminó por la adición de 10 µl de Tris: HCl 1 M, pH 7,4 seguido de extracciones secuenciales con fenol/cloroformo y cloroformo como se ha descrito anteriormente. Después de las extracciones, el ADNc se precipitó con etanol en presencia de acetato sódico 0,3 M.
10 El sedimento se lavó con 100 µl de etanol al 70 %, se secó al aire y se resuspendió en 38 µl de agua.

15 El ADNc resuspendido se convirtió en un ADN de extremos romos con ADN polimerasa T4. El ADNc, que se resuspendió en 38 µl de agua, se mezcló con 12 µl de tampón de ADN polimerasa de T4 5x (Tris:HCl 250 mM, pH 8,0, KCl 250 mM, MgCl₂ 25 mM), 2µl de ditiotreitól 0,1 M, 6 µl de una solución que contenía una concentración 10 mM de cada desoxinucleótido trifosfato y 2 µl de ADN polimerasa T4 1 U/µl (Boehringer Mannheim Corp.). Después de una incubación de 45 minutos a 15 °C, la reacción se terminó por la adición de 30 µl de TE seguido de extracciones secuenciales con fenol/cloroformo y cloroformo y se volvió a extraer con 20 µl de TE como se ha descrito anteriormente. El ADN se precipitó con etanol en presencia de 1 µl de vehículo Pellet Paint™ (Novagen) y acetato sódico 0,3 M y se resuspendió en 11 µl de agua.

20 Se ligaron adaptadores de *Eco* RI a los extremos 5' del ADNc descrito anteriormente para permitir la clonación en un vector de expresión. Se mezclaron 11 µl de ADNc y 4 µl de 65 pmol/µl de adaptador hemifosforilado de *Eco* RI (Pharmacia Biotech Corp) con 5 µl de tampón ligasa 5x (Life Technologies), 2 µl de ATP 10mM y 3 µl de ADN ligasa T4 1 U/µl (Life Technologies), 1 µl de tampón de ligamiento 10x (Promega Corp), 9 µl de agua. La dilución extra con tampón 1X se hizo para prevenir que el pellet paint precipitara. La reacción se incubó 9 horas en un baño de agua con una rampa de temperatura de 10 °C a 22 °C durante 9 horas, seguido de 45 minutos a 25 °C. La reacción se terminó por incubación a 68 °C durante 15 minutos.
25

30 Para facilitar la clonación direccional del ADNc en un vector de expresión el ADNc se digirió con *Xho*I, dando como resultado un ADNc que tenía un extremo cohesivo *Eco* RI 5' y un extremo cohesivo *Xho*I 3'. El sitio de restricción *Xho*I en el extremo 3' del ADNc se había introducido previamente usando el cebador ZC18698 (SEC ID N°: 30). La digestión con enzimas de restricción se realizó en una mezcla de reacción que contenía 35 µl de la mezcla de ligamiento descrita anteriormente, 6 µl de tampón H 10x (Boehringer Mannheim Corp.), 1 µl de BSA 2 mg/ml (Biolabs Corp.), 17 µl de agua y 1,0 µl de *Xho*I 40 U/µl (Boehringer Mannheim). La digestión se realizó a 37 °C durante 1 hora. La reacción se terminó por incubación a 68 °C durante 15 minutos seguido de precipitación con etanol, lavado y secado como se ha descrito anteriormente y resuspensión en 30 µl de agua.

35 El ADNc resuspendido se calentó a 65 °C durante 5 minutos y se enfrió en hielo, se añadieron 4 µl de colorante de carga de gel 5X (Research Genetics Corp.) el ADNc se cargó en un gel de TAE 1X de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8 % (agarosa de bajo punto de fusión SEA PLAQUE GTG™; FMC Corp.) y se sometió a electroforesis. Los adaptadores contaminantes y el ADNc por debajo de 0,6 kb de longitud se escindieron del gel. Los electrodos se invirtieron, se añadió agarosa fundida para rellenar los pocillos, se cambió el tampón y el ADNc se sometió a electroforesis hasta que se concentró cerca del origen del carril. El área del gel que contenía el ADN concentrado se escindió y se puso en un tubo de microcentrífuga, y la agarosa se fundió por calentamiento a 65 °C durante 15 minutos. Después de equilibrar la muestra a 45 °C, se añadieron 2 µl de Beta-agarasa I 1 U/µl (Biolabs, Inc.) y la mezcla se incubó durante 90 minutos a 45 °C para digerir la agarosa. Después de la incubación, se añadió 1 décimo de volumen de acetato Na 3 M a la muestra, y la mezcla se incubó en hielo durante 15 minutos. La muestra se centrifugó a 14.000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente para retirar la agarosa no digerida, el ADNc se precipitó con etanol, se lavó en etanol al 70 %, se secó al aire y se resuspendió en 40 µl de agua.
40
45

50 Para determinar la relación óptima entre ADNc y vector se realizaron varios ligamientos y se sometieron a electroporación. En resumen, se mezclaron 2 µl de tampón ligasa de T4 5X (Life Technologies), 1 µl de ATP 10 mM, 1 µl de pZP7NX digerido con *Eco*RI-*Xho*I, 1 µl de ADN ligasa T4 diluida a 0,25 U/µl (Life Technologies), agua hasta 10 µl y 0,5, 1, 2 ó 3 µl de ADNc en 4 ligamientos separados, se incubaron a 22 °C durante 4 horas, a 68 °C durante 20 minutos, se precipitaron con acetato sódico-etanol, se lavaron, se secaron y se resuspendieron en 10 µl. Un solo microlitro de cada ligamiento se introdujo por electroporación en 40 µl de una bacteria electrocompetente de DH10b ElectroMax™ (Life Technologies) usando una cubeta de 0,1 cm (Biorad) y un Genepulser, pulse controller™ (Biorad) fijado a 2,5 KV, 251 F, 200 ohms. Estas células inmediatamente se resuspendieron en 1 ml de caldo SOC (Manniaty y col, supra.) seguido de 500 µl de glicerol al 50 %-SOC como conservante. Estas "reservas de glicerol" se congelaron en varias alícuotas a -70 °C. Se descongeló una alícuota de cada una y se cultivó en serie en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina a 100 µg/ml. El número de colonias indicó que la relación óptima entre ADN de CD3+ y vector pZP7NX era de 1 µl a 45 ng; dicho ligamiento produjo 4,5 millones de clones primarios.
55

Para explorar la biblioteca usando un ensayo de proliferación basado en BaF3 (Ejemplo 5), se diluyeron las reservas

de glicerol anteriores en cultivos líquidos de 100 o 250 clones por grupo en placas de microtitulación de pocillos profundos, se cultivaron 24 horas a 37 °C con agitación y el plásmido se aisló usando el kit Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicho ADN posteriormente se introdujo por transfección en células BHK, el medio se acondicionó durante 72 horas, se recogió y almacenó a -80 °C y posteriormente se puso en células 5K BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o BaF3/zcytor17/OSMRbeta durante 72 horas, después de lo cual se evaluó la proliferación usando un ensayo de fluorescencia con "AlamarBlue" (Ejemplo 5B y Ejemplo 2B)

Ejemplo 7

Clonación de Expresión de zcytor17lig humano

Las reservas de glicerol de la biblioteca de células seleccionadas CD3+ humanas activadas (Ejemplo 6) se añadieron a Super Broth II™ (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) + ampicilina a 0,1 mg/ml (amp) a una concentración de 250 células por 800 µl. Las células *E. coli* se dejaron equilibrar durante 24 horas a temperatura ambiente. En el momento de la inoculación, se pusieron 400 µl en placas de LB + amp para determinar el título real de la inoculación. Después de 24 horas, las placas se contaron y después se ajustó la concentración final del SuperBrothII™ + *E. coli* de forma que la concentración final fuera 250 células por 1,2 ml. Se inocularon 2 litros tres veces para un total de 6 litros. El medio después se cultivó en bloques de pocillos profundos de 96 pocillos (Qiagen). El cultivo se realizó en el dispensador Q-Fill2™ de 8 canales (Genetix, Christchurch, Dorset, Reino Unido). Las células *E. coli* se cultivaron durante una noche a 37 °C con agitación a 250 revoluciones/min en un agitador de entorno multinivel New Brunswick Scientific Innova 4900. Las células *E. coli* se centrifugaron para separarse de la solución a 3000 rpm, usando una centrifuga Beckman GS-6KR. Estos sedimentos de *E. Coli* se congelaron a -20 °C o se usaron recientes antes de la minipreparación del ADN plasmídico. Cada sedimento contiene aproximadamente 250 clones de ADNc de la biblioteca de células seleccionadas CD3+ humanas.

Estos grupos de 250 clones de ADNc después se sometieron a minipreparación usando el kit 96 Turbo Miniprep de QIAprep™ (Qiagen). El ADN plasmídico se eluyó usando 125 µl de TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA1 mM). Este ADN plasmídico después se usó para transfectar células BHK.

Transfección de BHK

Se cultivaron células BHK en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a una densidad de 12.000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo. El medio de cultivo era DMEM (GibcoBRL), suero bovino inactivado con calor al 5 %, L-glutamina 2 mM (Gibco-BRL), PSN 1X (GibcoBRL), y NaPiruvato 1 mM (GibcoBRL).

Al día siguiente, las células BHK se lavaron una vez con 100 µl de SFA. SFA es medio sin suero que es DMEM/F12 o DMEM (Gibco/BRL), GlutaMax™ 2 mM (GibcoBRL), NaPiruvato 1 mM, 10 µg/ml de transferrina, 5 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de fetuina, 2 µg/ml de selenio, HEPES 25 mM (Gibco/BRL), aminoácidos no esenciales 100 µM (Gibco/BRL).

Se realizó una mezcla de ADN/Lipofectamine™ como se indica a continuación: se combinaron 2,2 µl de reactivo Lipofectamine™ (GibcoBRL) con 102,8 µl de SFA a temperatura ambiente; después se añadieron aproximadamente 5 µl del ADN plasmídico (200 ng/ml) al Lipofectamine™/SFA para formar la mezcla de ADN/Lipofectamine™, que se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El SFA se retiró de las células BHK y las células se incubaron con 50 µl de la mezcla de ADN/Lipofectamine™ durante 5 horas a 37 °C con un 5 % de CO₂. Se añadieron cincuenta µl de la mezcla de ADN/Lipofectamine™ a cada uno de dos pocillos de las células BHK de forma que las transfecciones se realizaron por duplicado.

Después, las células BHK se incubaron con la mezcla de ADN/Lipofectamine™ durante 5 horas, la mezcla de ADN/Lipofectamine™ se retiró y se añadieron 100 µl de medio de cultivo. Las células se incubaron durante una noche, el medio se retiró y se reemplazó por 100 µl de medio de cultivo. Después de cultivar las células durante 48-72 horas, se retiró el medio acondicionado, se congeló a -80 °C durante un mínimo de 20 minutos, se descongeló y después se ensayaron 50 µl en el ensayo de proliferación de Baf3, descrito en el Ejemplo 5, para identificar grupos de 250 clones con actividad de ligando.

Se exploraron veinte placas de 96 pocillos en un solo ensayo. Esto representaba aproximadamente 250 ADNc/pocillo o 480.000 ADNc en total. De estos, los medios acondicionados de aproximadamente 60 pocillos (que representaban 250 ADNc por pocillo) dieron un resultado positivo en el ensayo de proliferación. Uno de estos grupos positivos se eligió para romper y aislar un solo ADNc que codificaría el zcytor17lig. Este fue el grupo 62A12.

Para el grupo 62A12, se usó 1 µl de ADN para transformar células DH10B ElectroMax™ (Gibco/BRL) por electroporación. Los transformantes se cultivaron en placas con LB + amp (100 µg/ml) para proporcionar colonias individuales. A partir del grupo sometido a electroporación, se seleccionaron 672 colonias individuales por repicado en siete placas de 96 pocillos que contenían 1,2 ml de SuperBrothII™ por pocillo. Estas placas se enumeraron 62.1 a 62.7. Estas se cultivaron durante una noche y el AND plasmídico se sometió a minipreparación como se ha indicado anteriormente. Para las siete placas, se transfectó ADN plasmídico de las placas de descomposición en

células BHK y se ensayó por proliferación como se ha indicado anteriormente, con la excepción de que las transfecciones no se realizaron por duplicado.

Se identificaron dos clones positivos 62.6C7 y 62.6E9 por actividad a partir de un total de 672 clones. Se secuenció el ADN plasmídico minipreparado a partir del clon 62.6E9 y se obtuvo una supuesta identificación, pero se obtuvo una secuencia mixta a partir de estos clones positivos. Para aislar adicionalmente el ADNc de zcytor17lig en un solo clon, se usó 1 µl de ADN del grupo 62.6E9 para someter a electroporación células DH10B y los transformantes se cultivaron en placas LB + amp (100 µg/ml) para dar colonias individuales. El ADN plasmídico minipreparado a partir de varias colonias se secuenció para dar la secuencia de ADN exacta. La secuencia polinucleotídica de zcytor17lig era de longitud completa (SEC ID N°: 1) y se muestra su secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N°: 2).

10 Ejemplo 8

Construcción de Vectores de Expresión de Mamífero que Expresan Receptores Solubles zcytor 17: zcytor17CEE, zcytor17CFLG, zcytor17CHIS y zcytor17-Fc4

A. Construcción de Vector de Expresión de Mamífero de zcytor17 que contiene zcytor17CEE, zcytor17CFLG y zcytor17CHIS

15 Se preparó un vector de expresión para la expresión del dominio extracelular soluble del polipéptido zcytor17, pZp9zcytor17CEE, donde la construcción se diseñó para expresar el polipéptido zcytor17 que comprendía la metionina iniciadora prevista y truncado adyacente al dominio transmembrana previsto, y con un marcador C-terminal Glu-Glu (SEC ID N°: 32).

20 Se generó un producto de PCR de aproximadamente 1500 pb usando ZC29.451 (SEC ID N°: 33) y ZC29.124 (SEC ID N°: 34) como cebadores de PCR para añadir sitios de restricción EcoRI y BamHI. Se usó una biblioteca de ADNc interna de HPVS humano como molde y la amplificación por PCR se realizó como se indica a continuación: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1,5 minutos; después 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 10 °C. La reacción PCR se precipitó con etanol y se digirió con enzimas de restricción EcoRI y BamHI. El producto de PCR digerido se purificó en un gel de agarosa al 1,0 % y se escindió la banda de aproximadamente 25 1500 pb. Esta banda después se reamplificó usando cebadores idénticos con el siguiente ciclo: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 3 minutos, y después 72 °C durante 7 minutos; inmersión 10 °C. La reacción PCR se precipitó con etanol y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. El producto de PCR digerido se purificó en un gel de agarosa al 1,0 % y se escindió la banda de aproximadamente 30 1500 pb. El ADN escindido se subclonó en el plásmido CEEpZp9 que se había cortado con EcoRI y BamHI para generar un plásmido con un receptor soluble marcado en el extremo C con GLU-GLU para zcytor17, zcytor17CEEpZp9. El dominio extracelular en el ADNc de zcytor17CEE en zcytor17CEEpZp9 tiene una mutación silenciosa que cambia la T por C en la posición 1705 de la SEC ID N°: 4 (que codifica un resto de Pro en el resto 403 de la SEC ID N°: 5). Como esta mutación era silenciosa, el ADNc de zcytor17 en zcytor17CEEpZp9 codifica el polipéptido mostrado en la SEC ID N°: 5. Además, debido a la construcción usada, se insertó un par de restos Gly-Ser en posición C-terminal al extremo del dominio extracelular soluble de zcytor17 y antes del marcador C-terminal 35 Glu-Glu (SEC ID N°: 32). Como tal, el marcador en el extremo C del dominio extracelular de zcytor17, era un marcador Glu-Glu como se muestra en la SEC ID N°: 17. El plásmido CEEpZp9 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de la metalotioneína-1 de ratón, múltiples sitios de restricción para inserción de secuencias codificantes y un terminador de hormona de crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. Coli*, una unidad de expresión de marcador detectable de mamífero que tiene un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador de SV40. Usando técnicas convencionales de biología molecular, zcytor17CEEpZp9 se introdujo por electroporación en 40 células DH10B competentes (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cultivó en placas LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante una noche. Las colonias se exploraron por análisis de restricción, o PCR a partir de ADN preparado a partir de colonias individuales. La secuencia de inserción de los clones positivos se verificó por análisis de la secuencia. Se realizó una preparación de plásmido a gran escala usando un kit Maxi prep de QIAGEN® (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

50 Se usó el mismo procedimiento para preparar los receptores solubles zcytor17 con un marcador His C-terminal, compuesto de 6 restos de His en una fila, y un marcador FLAG® C-terminal (SEC ID N°: 36), zcytor17CFLAG. Para construir estas construcciones, el vector mencionado anteriormente tiene el marcador His o el marcador FLAG® en lugar del marcador glu-glu (por ejemplo, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 32 o SEC ID N°: 35).

8. Construcción de Expresión de Mamífero de receptor zcytor17 humano Soluble: zcytor17-Fc4.

55 Se preparó un vector de expresión, pEZE-2 hzcytor17/Fc4 para expresar una versión soluble marcada con Fc4 en el extremo C de hzcytor17 (zcytor17-Fc4 humano) en células PF CHO. Las células PF CHO son una línea celular CHO interna adaptada para el crecimiento en medio sin proteínas (medio ExCell 325 PF; JRH Biosciences). La línea celular CHO interna se obtuvo originalmente a partir de células CHO DG44 (G. Urlaub, J. Mitchell, E. Kas, L.A. Chasin, V.L. Funanage, T.T. Myoda y J.L. Hamlin, "The Effect De Gamma Rays at the Dihydrofolate Reductase

Locus: Deletions y Inversions," Somatic Cell y Molec. Genet., 12: 555-566 (1986). Un fragmento de ADNc de zcytor17 que incluye la secuencia polinucleotídica desde el dominio extracelular del receptor zcytor17 se fusionó en fase con la secuencia polinucleotídica de Fc4 (SEC ID N°: 37) para generar una fusión zcytor17-Fc4 (SEC ID N°: 38 y SEC ID N°: 39). El vector pEZE-2 es un vector de expresión de mamífero que contiene la secuencia polinucleotídica de Fc4 y un sitio de clonación que permite la rápida construcción de fusiones Fc4 C terminales usando técnicas convencionales de biología molecular.

Se generó un fragmento de 1566 pares de bases por PCR, que contenía el dominio extracelular de zcytor17 humano y los dos primeros aminoácidos de Fc4 (Glu y Pro) con sitios FseI y BglII codificados en los extremos 5' y 3', respectivamente. Este fragmento de PCR se generó usando cebadores ZC29.157 (SEC ID N°: 40) y ZC29.150 (SEC ID N°: 41) por amplificación a partir de un plásmido que contenía el dominio extracelular de zcytor17 humano (pZp9zcytor17CEE) (Ejemplo 8A). Las condiciones de reacción PCR fueron las siguientes: 25 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 2 minutos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos, seguido de una inmersión a 4 °C. El fragmento se digirió con endonucleasas de restricción FseI y BglII y posteriormente se purificó por electroforesis en gel al 1 % y purificación de bandas usando el kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen). El ADN purificado resultante se ligó durante 5 horas a temperatura ambiente al vector pEZE-2 previamente digerido con FseI y BglII que contenía Fc4 en posición 3' de los sitios FseI y BglII.

Dos µl de la mezcla de ligamiento se introdujeron por electroporación en 37 µl de células *E. coli* DH10B electrocompetentes (Gibco) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se diluyeron en 400 µl de medio LB y se cultivaron en placas LB que contenían 100 µl/ml de ampicilina. Los clones se analizaron por digestiones de restricción y los clones positivos se enviaron para la secuenciación del ADN para confirmar la secuencia de la construcción de fusión. Un microlitro de un clon positivo se usó para transformar 37 µl de células *E. coli* DH10B electrocompetentes y se cultivó en estrías en una placa con LB/amp. Se repicó una sola colonia a partir de esta placa cultivada en estrías para empezar un cultivo de 250 ml de LB/amp que después se dejó crecer durante una noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. Este cultivo se usó para generar 750 µg de ADN purificado usando un kit Qiagen plasmid Maxi (Qiagen).

Ejemplo 9

Transfección y Expresión de Polipéptidos del Receptor Soluble Zcytor17

Se cultivan células BHK 570 (ATCC N° CRL-10314), DG-44 CHO u otras células de mamífero a aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células/pocillo (placa de 6 pocillos) en 800 µl de medio sin suero (SF) apropiado (por ejemplo DMEM, Gibco/BRL High Glucose) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Las células se transfectan con plásmidos de expresión que contienen zcytor17CEE, zcytor17CFLG, zcytor17CHIS o zcytor17-Fc4 (Ejemplo 8), usando Lipofectin™ (Gibco BRL), en medio sin suero (SF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aíslan colonias individuales que expresan los receptores solubles, se exploran y se dejan crecer en medio de cultivo celular, y se purifican usando técnicas convencionales.

A. Expresión en Mamífero del Receptor zcytor17CEE humano soluble

Se cultivaron células BHK 570 (ATCC N°: CRL-10314) en matraces de cultivo de tejidos T-75 y se dejaron crecer hasta una confluencia de aproximadamente un 50 a un 70 % a 37 °C con un 5 % de CO₂, en medio DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL High Glucose, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), suero bovino fetal al 5 %, L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenea, KS), piruvato sódico 1 mM (Gibco BRL)). Las células después se transfectaron con el plásmido que contenía zcytor17CEE (Ejemplo 8A) usando Lipofectamine™ (Gibco BRL), en formulación de medio sin suero (SF) (DMEM, 10 mg/ml de transferrina, 5 mg/ml insulina, 2 mg/ml fetuina; un 1 % L-glutamina y un 1 % de piruvato sódico). Diez microgramos del ADN plasmídico de pZp9zcytor17CEE (Ejemplo 8A) se diluyó en un tubo de 15 ml hasta un volumen final total de 500 µl con medio SF. Se mezclaron 50 µl de Lipofectamine con 450 µl de medio SF. La mezcla de Lipofectamine se añadió a la mezcla de ADN y se dejó incubar aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 4 ml de medio SF a la mezcla de ADN: Lipofectamine. Las células se aclararon una vez con 5 ml de medio SF, se aspiraron y se añadió la mezcla de ADN: Lipofectamine. Las células se incubaron a 37 °C durante cinco horas, y después se añadieron 5 ml de medio DMEM/FBS al 10 %. Los matraces se incubaron a 37 °C durante una noche, después de lo cual las células se dividieron en el medio de selección (medio DMEM/FBS de lo anterior con la adición de metotrexato 1 µM o Metotrexato 10 µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) en placas de 150 mm a 1:2, 1:10, y 1:50. Aproximadamente 10 días después de la transfección, se tripsinizó una placa de 150 mm de colonias resistentes a metotrexato 1 µM, las células se reunieron y la mitad de las células se volvieron a cultivar en metotrexato 10 µM; para amplificar adicionalmente la expresión de la proteína zcytor17CEE. Una muestra en medio acondicionado de este grupo de células amplificadas se ensayó con respecto a los niveles de expresión usando SDS-PAGE y análisis de Western.

B. Expresión en mamífero del receptor zcytor17-Fc4 humano soluble

Se linealizaron cinco réplicas de 200 µg de ADN plasmídico de pEZE-2hzcytor17Fc4 (Ejemplo 8B) por digestión de restricción con FspI, una enzima de restricción que corta una vez dentro del vector y no altera los genes necesarios para la expresión. Se añadieron 200 µg de ADN genómico de células CHO a cada réplica como ADN portador y

después el ADN se precipitó por adición de 0,1 volúmenes de Acetato Sódico 3M pH 5,2 y 2,2 volúmenes de etanol seguido de una incubación en hielo de 15 minutos y microcentrifugación a 4 °C. Los sedimentos de ADN resultantes se lavaron en etanol al 70 % y se secaron al aire antes de resuspenderse en 100 µl de medio de crecimiento sin selección de CHO sin proteína (PF) (21 g/l de PF CHO Ex Cell 325/200 L-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco)/Suplemento HT 1x (Gibco). Se añadieron diez millones de células PF CHO sometidas a 61 pases al ADN en 600 µl de medio de crecimiento sin selección de PF CHO y después se sometieron a electroporación en un sistema de electroporación Gene Pulser II (BioRad) usando una capacitancia de 950 µF y 300 Kv usando una cubeta de electroporación Gene Pulser (BioRad) con un hueco de 0,4 cm. Las 5 réplicas de las células sometidas a electroporación se reunieron y se seleccionaron directamente en medio-HT (21 g/l PF CHO Ex Cell 325/ L-Glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco). Las células se seleccionaron durante 1,5 días en medio-HT antes de someterse a pases a 4×10^5 ml en la selección MTX 50 nm. Ocho días después, las células se sembraron a $3,5 \times 10^5$ células/ml en selección con MTX 200 mM. Después de una semana, las células se sembraron a 4×10^5 células/ml en 1 selección con MTX pom. Después de dos semanas con MTX 1 µM, las células se sembraron a 1×10^6 células/ml en 50 ml para generar medio acondicionado. El medio acondicionado de 72 horas resultante se analizó por transferencias de western con sonda con un anticuerpo generado contra Ig humana. Las células produjeron proteína hzcytor17/Fc4 a aproximadamente 1 mg/l.

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

Se linealizaron doscientos µg de AND plasmídico de pEZE-2hzcytor17Fc4 (Ejemplo 8B) por digestión de restricción con FspI, una enzima de restricción que corta una vez dentro del vector pEZE-2 y no altera los genes necesarios para la expresión. Se añadieron doscientos microgramos de ADN genómico de CHO (preparado internamente) como ADN de soporte y después el ADN se precipitó por la adición de 0,1 volúmenes de Acetato Sódico 3 M, pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol seguido de microcentrifugación a temperatura ambiente. Se realizaron cinco réplicas de sedimentos de ADN y se usaron para la transformación. El sedimento de ADN resultante se lavó en etanol al 70 % y se secó al aire antes de resuspenderse en 100 µl de medio de crecimiento sin selección de PF CHO (21 g/l PF CHO Ex Cell 325 /L-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco)/Suplemento HT 1x (Gibco). Se añadieron diez millones de células PF CHO al ADN en 600 µl de medio de crecimiento sin selección de PF CHO y después se sometieron a electroporación en un sistema de electroporación Gene Pulser II (BioRad) usando una capacitancia de 950 µF y 300 voltios usando una cubeta de electroporación Gene Pulser (BioRad) de hueco de 0,4 cm. Las células sometidas a electroporación se reunieron y se pusieron directamente en selección en medio-HT (21 g/L PF CHO Ex Cell 325/ L-Glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco). Las células se seleccionaron durante 14 días en medio-HT antes de pasarse a 4×10^5 /ml en selección de MTX 50 nM. Las células se amplificaron en MTN 200 nM y después a MTX 1 µM. Los grupos -HT, 50 nM y 1 µM se sembraron a 1×10^6 c /mi durante 48 horas, y el medio acondicionado resultante se analizó por transferencias de western con sonda con un anticuerpo generado contra Ig humana.

Ejemplo 10

Purificación de receptores solubles zcytor17 a partir de células BHK 570 y CHO

A. Expresión en mamífero transitoria y purificación del receptor zcytor17-Fc4 humano soluble

Se introdujo ADN del plásmido pEZE-2hzcytor17Fc4 (Ejemplo 8B) en 40 maxi placas de células BHK usando Lipofectamine (Gibco BRL) como se describe en el presente documento y en las instrucciones del fabricante. Las células se dejaron recuperar durante una noche y después se aclararon y se volvieron a alimentar con medio sin suero (SL7V4, fabricado internamente). Después de 72 horas, el medio se recogió y se filtró y las células se volvieron a alimentar con medio sin suero. Después de 72 horas, el medio se recogió de nuevo y se filtró.

El medio acondicionado sin suero (2 lotes de 1,5 l) procedente de células BHK transfectadas de forma transitoria se bombeó sobre una columna de 1,5 ml de Proteína A-agarosa en Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M. La columna se lavó extensivamente con este tampón y después la proteína unida se eluyó con 1 ml de glicina 0,2 M, pH 2,5, NaCl 0,5 M. La proteína eluida se recogió en 0,1 ml de Tris 2 M, pH 8,5. Se recogieron alícuotas para la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y el zcytor17-Fc en bruto se dializó durante una noche frente a PBS. El receptor soluble se filtró de forma estéril y se puso en alícuotas a -80 °C.

B. Purificación de zcytor17-Fcd

Se produjo zcytor17 marcado con Fc4 en el extremo carboxilo recombinante (Ejemplo 8 y Ejemplo 9) a partir de células CHO transfectadas. La transfección de CHO se realizó usando procedimientos conocidos en la técnica. Se recogieron aproximadamente cinco litros de medio acondicionado y se filtraron de forma estéril usando filtros Nalgene de 0,2 µm.

La proteína se purificó a partir del medio filtrado por una combinación de cromatografía de afinidad en proteína A Poros 50 (PerSeptive Biosystems, 1-5559-01, Framingham, MA) y columna de cromatografía de exclusión molecular Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). El medio de cultivo se cargó directamente en una columna de afinidad de proteína A de 10x70mm (volumen de lecho 5,5 ml) a un flujo de aproximadamente 3-10

ml/minuto. Después de lavar la columna con diez volúmenes de columna de PBS, se eluyó la proteína unida por cinco volúmenes de columna de glicina 0,1 M, pH 3,0 a 10 ml/minuto). Se recogieron fracciones de 2 ml cada una en tubos que contenían 100 µl de Tris 2,0 M, pH 8,0, para neutralizar las proteínas eluidas. Las muestras de la columna de afinidad se analizaron por SDS-PAGE con tinción con coomassie y transferencia de Western con respecto a la presencia de zcytor17-Fc4 usando Ig humana-HRP. Se reunieron las fracciones que contenían zcytor17-Fc4 y se concentraron a 1-2 ml usando el concentrador Biomax-30 (Millipore) y se cargaron en una columna de filtración de gel Superdex 200 de 20 x 580 mm. Las fracciones que contenían zcytor17-Fc4 purificado, se reunieron, se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm, se dividieron en alícuotas de 100 µl y se congelaron a -80 °C. La concentración de la proteína purificada final se determinó por ensayo BCA (Pierce, Rockford, IL).

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

Zcytor17-Fc4 recombinante se analizó por SDS-PAGE (Nupage 4-12 %, Invitrogen, Carlsbad, CA) con el procedimiento de tinción de coomassie y transferencia de Western usando Ig humana-HRP. El medio acondicionado o la proteína purificada se introdujeron por electroporación usando una minicélula Xcell II de Invitrogen Novex y se transfirieron a nitrocelulosa (0,2 mm; Invitrogen, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente usando el módulo de transferencia Xcell II de Novex con agitación de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el manual del instrumento. La transferencia se realizó a 500 mA durante una hora en un tampón que contenía base Tris 25 mM, glicina 20 mM y metanol al 20 %. Los filtros después se bloquearon con leche desnatada en polvo al 10 % en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. La nitrocelulosa se aclaró rápidamente, después se añadió el anticuerpo Ig humana-HRP (1:2000) en PBS que contenía un 2,5 % de leche desnatada en polvo. Las manchas de transferencia se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente, o durante una noche a 4 °C, con agitación suave. Después de la incubación, las manchas de transferencia se lavaron tres veces durante 10 minutos cada vez en PBS, y después se aclararon rápidamente en H₂O. Las manchas de transferencia se revelaron usando reactivos de sustrato quimioluminiscente disponibles en el mercado (Super-Signal® ULTRA reactivos 1 y 2, mezclados 1:1; reactivos obtenidos en Pierce, Rockford, IL) y la señal se capturó usando el software Lumi-Imager's Lumi Analyst 3.0 (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) para tiempos de exposición que variaban de 10 segundos a 5 minutos o según fuera necesario.

El zcytor17-Fc4 purificado apareció como una sola banda con la tinción con coomassie o plata a aproximadamente 220 kDa en condiciones no reductoras, y a aproximadamente 120 kDa en condiciones reductoras, lo que sugiere la forma dimérica de zcytor17-Fc4 en condiciones no reductoras como era de esperar.

30 Ejemplo 11

Ensayo usando receptor soluble zcytor17, receptor soluble zcytor17-Fc4 en ensayo de inhibición competitiva.

Se centrifugaron células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta y células BaF3/zcy17/OSMRbeta y se lavaron en medio sin mL-3. Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para asegurar que se eliminaba la mL-3. Después las células se contaron en un hemacitómetro. Las células se cultivaron en un formato de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando el medio sin mL-3.

Se añadieron medios acondicionados de la activación de células CCRF-CEM y CCRF-HSB2 y las células seleccionadas CD3+ humanas, descritas en el Ejemplo 5, en experimentos separados a concentraciones del 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,5 %, 0,75 %, 0,375 %, y 0,187 % con o sin receptores solubles zcytor17 (Zcytor17-Fc4; Véase el Ejemplo 9 y Ejemplo 10) a 1-10 µg/ml. El volumen de ensayo total fue de 200 µl.

40 Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C, con un 5 % de CO₂ durante 3-5 días, después de lo cual se añadió AlamarBlue (Accumed) a 20 µl/pocillo. Las placas se incubaron de nuevo a 37 °C con un 5 % de CO₂ durante 16-24 horas. Las placas se leyeron en el lector de placas Fmax™ (Molecular Devices) como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados demostraron la inhibición parcial del crecimiento celular con el receptor soluble zcytor17-Fc4 a 10 µg/ml, confirmando que el factor en cada muestra era específico para el receptor zcytor17.

45 También se realizaron curvas de titulación, diluyendo el receptor soluble, o heterodímeros de receptor soluble que comprendían zcytor17/OSMR y zcytor17/WSX-1 usando el ensayo indicado anteriormente para determinar si los receptores zcytor17 pueden inhibir completamente el crecimiento, por ejemplo, a bajas concentraciones o a concentraciones fisiológicas.

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

Ejemplo 12

Ensayo de trampa de secreción

55 Se usó un ensayo de trampa de secreción para ensayar la unión del zcytor17lig a receptores que comprenden el receptor zcytor17, tales como el receptor zcytor17 o heterodímeros del receptor que comprenden zcytor17/OSMR y

zcytor17/WSX-1. Se introdujo por transfección ADN del plásmido zcytor17lig en células COS, y se usó para evaluar la unión del zcytor17lig a receptores que comprendían el receptor zcytor17 por trampa de secreción como se describe más adelante.

A. Transfecciones de células COS

- 5 La transfección de células COS se realizó como se indica a continuación: se mezclaron 800 ng de ADNc de zcytor17lig y 4 µl de Lipofectamine™ en 80 µl de medio DMEM sin suero (55 mg de piruvato sódico, 146 mg de L-glutamina, 5 mg de transferrina, 2,5 mg de insulina, 1 µg de selenio y 5 mg de fetuina en 500 ml de DMEM), y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se añadieron 320 µl de medio DMEM sin suero. Esta mezcla se 500 µl se añadió sobre 2×10^5 células COS/pocillo cultivadas en una placa de cultivo de tejidos de 12 pocillos y se incubaron durante 5 horas a 37 °C. Después se añadieron 500 µl de medio FBS DMEM al 20 % (100 ml de FBS, 55 mg de piruvato sódico y 146 mg de L-glutamina en 500 ml de DMEM) y las células se incubaron durante una noche.

B. Ensayos de Trampa de Secreción

- 15 La trampa de secreción se realizó como se indica a continuación: el medio se aclaró de las células con PBS, después las células se fijaron durante 15 minutos con formaldehído al 1,8 % en PBS. Las células después se lavaron con PBS/BSA al 0,1 % y se permeabilizaron con Triton-X al 0,1 % en PBS durante 15 minutos, y de nuevo se lavaron con PBS/BSA al 0,1 %. Las células se bloquearon durante 1 hora con PBS/BSA al 0,1 %. Dependiendo del receptor soluble que se usara, las células se incubaron durante 1 hora en TNB con: (A) 1-3 µg/ml de receptor soluble zcytor17, proteína de fusión zcytor17-Fc4 (Ejemplo 10); o (B) 1-3 µg/ml de proteína receptora soluble zcytor17/OSMRbeta. Las células después se lavaron con TNT. Dependiendo del receptor soluble que se usara (por ejemplo, si estaba marcado con un marcador Fc4 (SEC ID N°: 37), un marcador FLAG C-terminal (SEC ID N°: 26) o un marcador CEE (SEC ID N°: 32; SEC ID N°: 35)), las células se incubaron durante otra hora con: (A) Ig de cabra anti-humana-HRP diluida 1:200 (específica de Fc); (B) M2-HRP diluida 1:1000; (C) anticuerpo anti-GluGlu-HRP diluido 1:1000; o (D) estreptavidina-HRP diluido 1:300 (kit NEN) en TNB, por ejemplo. De nuevo las células se lavaron con TNT.

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

Ejemplo 13

Alineamiento Cromosómico y Colocación de la Secuencia Génica para el zcytor17lig

- 35 La secuencia génica de zcytor17lig se localizó en el cromosoma humano 12 usando la versión disponible en el mercado del "Stanford G3 Radiation Hybrid Mapping Panel" (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). El "Stanford G3 RH Panel" contiene ADN de cada uno de 83 clones de híbridos de radiación del genoma humano completo, más dos ADN de control (el donante de RM y el receptor de A3). Un servidor WWW disponible públicamente localizado en Internet en www.stanford.edu permite la localización cromosómica de marcadores y genes.

- 40 Para localizar la secuencia génica de zcytor17lig con el "Stanford G3 RH Panel", se prepararon reacciones de 20 µl en una placa de microtitulación de 96 pocillos compatible para PCR (Stratagene, La Jolla, CA) y se usaron en un termociclador "RoboCycler Gradient 96" (Stratagene). Cada una de las 95 reacciones PCR consistía en 2 µl de tampón de reacción PCR 10X (Qiagen, Inc. Valencia, CA), 1,6 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM de cada uno, PERKIN-ELMER, Foster City, CA), 1 µl de cebador con sentido, ZC41.458 (SEC ID N°: 42), 1 µl de cebador antisentido, ZC41.457 (SEC ID N°: 43), 2 µl de "RediLoad" (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL), 0.1 µl de HotStarTaq ADN Polimerasa de Qiagen (5 unidades/µl), 25 ng de ADN de un clon híbrido individual o control y agua destilada para un volumen total de 20 µl. Las reacciones se cubrieron con una cantidad igual de aceite mineral y se sellaron. Las condiciones del aparato de ciclos de PCR fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización de 15 minutos a 95 °C, 35 ciclos de desnaturalización de 45 segundos a 95 °C, 1 minuto de hibridación a 53 °C y 1 minuto y 15 segundos de extensión a 72 °C, seguido de una extensión de un ciclo final de 7 minutos a 72 °C. Las reacciones se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (EM Science, Gibbstown, NJ) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

- Los resultados mostraron la asociación de la secuencia del gen de zcytor17lig al marcador del cromosoma 12 SHGC-83339 con una puntuación LOD >11 y a una distancia de 17 cR_10000 del marcador. Este marcador sitúa al gen de zcytor17lig en la región cromosómica 12q24.31.

Ejemplo 14

Identificación y clonación de zcytor17lig murinoA. Identificación de zcytor17lig murino de longitud completa

5 Usando la secuencia del péptido zcytor17lig humano (SEC ID N°: 2) para consultar una base de datos de ADN interna, se identificó un ADNc murino, N° de Acceso del Genbank AK005939, como secuencia parcial potencial para el zcytor17lig murino. La secuencia de ADNc de AK005939 se usó para estudiar una base de datos que contenía fragmentos genómicos murinos. Se montó un contig genómico del zcytor17lig murino (SEC ID N°: 76). La predicción del potencial codificante en este fragmento genómico con el programa Genscan reveló una probable secuencia de ADNc, con la misma estructura génica que el zcytor17lig humano. En la SEC ID N°: 10, se representa una secuencia de ADNc murina, y la secuencia polipeptídica correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 11.

10 B. Clonación de zcytor17lig de ratón a partir de una biblioteca de ADNc de testículo de ratón por PCR.

Basándose en la secuencia genómica (SEC ID N°: 76), se diseñaron dos cebadores de PCR y se usaron para identificar una fuente de ADNc de zcytor17lig de ratón por PCR. Estos cebadores ZC41498 (SEC ID N°: 86) y ZC41496 (SEC ID N°: 87) se diseñaron para las supuestas regiones no traducidas 5' y 3' de las secuencias de ratón (SEC ID N°: 76 y SEC ID N°: 10). Se exploraron varias fuentes de ADNc por PCR, incluyendo ADNc Marathon-ready (Clontech) y alícuotas de bibliotecas de ADNc fabricadas localmente. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1 %. Se observaron bandas del tamaño esperado en reacciones que usaban un molde de biblioteca de ADNc de testículo de ratón. Estas reacciones PCR se realizaron satisfactoriamente en volúmenes de aproximadamente 50 µl con o sin un 10 % de DMSO, usando pfu turbo polimerasa (Stratagene) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante; con una aplicación adicional de iniciador a temperaturas elevadas de cera, empleando inicio a temperatura elevada 50s (molecular Bioproducts, Inc. San Diego, CA). Los ciclos térmicos de PCR se realizaron con un solo ciclo de 94 °C durante 4 minutos; seguido de 40 ciclos de 94 °C: 30 segundos, 48 °C: 30 segundos, 72 °C: 50 segundos; con una extensión final adicional a 72 °C durante 7 minutos. Las dos reacciones PCR se reunieron y purificaron usando agarosa de bajo punto de fusión y la enzima de digestión de agarosa Gelasa (Epicenter, Inc. Madison, WI) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

25 La determinación de la secuencia de ADN de estos productos de PCR reveló una secuencia de ADNc de zcytor17 murino (SEC ID N°: 90) que comprendía una ORF idéntica a la SEC ID N°: 10, confirmando que la SEC ID N°: 10 codificaba el polipéptido zcytor17lig de ratón. Después se usaron cebadores de PCR ZC41583 (SEC ID N°: 88) y ZC41584 (SEC ID N°: 89), para añadir sitios de restricción Fsel y Ascl y una secuencia Kozak parcial al marco de lectura abierta de mcytor17lig y un codón de terminación (SEC ID N°: 92). Se usó un termociclador Robocycler 40 (Stratagene) para realizar un gradiente de temperaturas de templado y ciclos como se indica a continuación, se aplicó Pfu turbo polimerasa (Stratagene) como se ha descrito anteriormente, pero solo en DMSO al 10 %. Los ciclos se realizaron con un solo ciclo de 94 °C durante 4 min; seguido de 20 ciclos de 94 °C: 30 segundos, gradiente de 65 °C a 51 °C: 30 segundos, 72 °C: 1 minuto; y una sola extensión de 72 °C durante 7 minutos. El molde para esta segunda reacción de termociclado fue 1 µl del producto de PCR mcytor17lig purificado en gel inicial, indicado anteriormente. El producto de PCR resultante de las tres reacciones a la menor temperatura se reunió y se purificaron en gel usando el procedimiento de Gelasa (Epicenter) descrito anteriormente. Este mzytor17lig purificado se digirió con Fsel y Ascl y se ligó en un vector pZP7X modificado para tener sitios Fsel y Ascl en su sitio de clonación. El plásmido pZP7X es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de la metalotioneína-1 de ratón (MT-1), múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes, y un terminador de hormona de crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador de selección de mamífero que tiene un promotor, potenciador y origen de replicación de SV40, un gen de DHFR y el terminador de SV40. La secuencia de ADNc murina clonada se representa en la SEC ID N°: 90, y la secuencia polipeptídica correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 91 (que es idéntica a la SEC ID N°: 11).

45 Ejemplo 15Aislamiento del clon de ADNc de zcytor17lig de ratón a partir de una biblioteca de bazo de ratón activadaA. Fuente primaria murina usada para aislar zcytor17lig de ratón

50 Se recogen bazos de ratón procedentes de ratón Balb/C y se trituran entre portaobjetos de extremos esmerilados para crear una suspensión celular. Es de esperar que el rendimiento de células de ratón primarias aisladas sea de aproximadamente $6,4 \times 10^8$ células antes de la selección descrita más adelante.

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

55 Se prepara una columna VS+ (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La columna VS+ después se pone un campo magnético VarioMACS™ (Miltenyi). La columna se equilibra con 5 ml de tampón MACS. Las células de ratón primarias aisladas después se aplican a la columna. Las células negativas para CD90 se dejan pasar a su

través. La columna se aclara con 9 ml (3 X 3 ml) de tampón MACS. Después la columna se retira del imán y se pone sobre un tubo Falcon de 15 ml. Las células CD90+ se eluyen añadiendo 5 ml de tampón MACS a la columna y las células unidas fluyen usando el émbolo proporcionado por el fabricante. La incubación de las células con las perlas magnéticas CD90, los lavados y las etapas de la columna VS+ (incubación mediante elución) anteriores se repiten una vez más. Las fracciones de CD90+ resultantes de las 2 separaciones en columna se reúnen. Es de esperar que el rendimiento de células de bazo de ratón seleccionadas CD90+ sea aproximadamente 1×10^8 células en total.

Se retira una muestra de las células de ratón seleccionadas CD90+ reunidas para la tinción y clasificación en un separador de células con anticuerpos fluorescentes (FACS) para evaluar su pureza. Se usa un anticuerpo de hámster anti-CD3 ϵ de ratón conjugado con PE (PharMingen) para la tinción y separación de las células seleccionadas CD90+. Las células seleccionadas CD90+ de ratón deben ser células CD3+ en aproximadamente un 93 %, lo que sugiere que las células son linfocitos T en un 93 %.

Las células seleccionadas CD90+ murinas se activan por incubación de 3×10^6 células/ml en RPMI + FBS al 5 % + PMA 10 ng/ml e Ionomicina 0,5 μ g/ml (Calbiochem) durante una noche a 37 °C. El sobrenadante de estas células de ratón seleccionadas CD90+ activadas se ensaya con respecto a la actividad zcytor17lig como se describe más adelante. Además, las células de ratón seleccionadas CD90+ activadas se usan para preparar una biblioteca de ADNc, como se describe en el Ejemplo 16, mostrado a continuación.

Ejemplo 16

Clonación de zcytor17lig de ratón a partir de una biblioteca de células seleccionadas CD90+ de ratón

La exploración de una biblioteca de ADNc de células seleccionadas CD90+ activadas de ratón puede revelar ADNc aislado que es un nuevo miembro de la familia de citocinas de cuatro haces helicoidales que codificarían el ortólogo de ratón del zcytor17lig humano. El ADNc se identifica por exploración de hibridación.

A. El vector para la construcción de la biblioteca seleccionada del CD90+

Para la construcción de la biblioteca seleccionada de CD3+ se usa el vector pZP7N (véase el Ejemplo 6A).

B. Preparación de la biblioteca de ADNc de células seleccionadas CD90+ activadas de ratón primarias.

Se aíslan por centrifugación aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células seleccionadas CD90+ de ratón primarias estimuladas en ionomicina/PMA (Ejemplo 15). Se aísla el ARN total a partir del sedimento celular y se convierte en ADNc bicatenario como se describe en el Ejemplo 6B. Este ADN después se introduce por transfección en células BHK, como se describe en el Ejemplo 6B, y la proliferación se evalúa usando un ensayo de fluorescencia con "AlamarBlue" (Ejemplo 2B).

Para explorar la biblioteca por clonación de trampa de secreción, se necesita una forma amplificada, compleja, de la biblioteca para transfectar células COS-7. Se cultivan 4,8 millones de clones en 110 placas de LB-agar de 15 cm suplementadas con 100 μ g/ml de ampicilina, 10 μ g/ml metilicina. Después de cultivar las placas durante una noche a 37 °C las bacterias se recogen por raspado y se sedimentan. Se extrae ADN plasmídico de las bacterias sedimentadas usando un Nucleobond-giga™ (Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este plásmido después se usa para transfectar células COS-7 en portaobjetos y se explora usando la técnica de trampa de secreción descrita más adelante (Ejemplo 17).

C. Exploración de la biblioteca de ADNc de ratón activada

Se cultivan aproximadamente 5×10^5 clones en 10 placas LB/Amp Maxi. Las colonias se levantan, desnaturalizan, neutralizan y entrecruzan usando los procedimientos convencionales (Sambrook, J. y col. supra.). Cincuenta nanogramos del fragmento de PCR 5'-RACE de 300 pb 5' (Ejemplo 14) se marcan con 32 P usando el kit de marcaje de cebador aleatorio Prime-It[®] RmT (Stratagene). Los 10 filtros se hibridan con esta sonda marcada a 65 °C durante una noche usando solución de hibridación ExpressHyb™ (Clontech). Los filtros después se lavan secuencialmente a 60 °C durante 1 hora tres veces con SSC 0,2x (NaCl 30 mM, citrato sódico 3 mM, pH 7,0), SDS al 0,1 %; y después a 65 °C durante 1 hora. Los filtros se exponen a - 80 °C durante una noche y la película de rayos X se revela. Se extraen bloques de agar que contienen las colonias positivas y los clones se cultivan en placas LB/Amp de 10 cm. Las colonias después se levantan en filtros y se hibridan de nuevo siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se aíslan clones de ADN individuales y se secuencian usando procedimientos convencionales, para identificar el ADNc de ratón.

Ejemplo 17

zcytor17lig de ratón no se une al receptor soluble zcytor17 humano en el ensayo de trampa de secreción

El ADN para el clon de ratón mzcytor 17lig/pZP7 se introdujo por transfección en células COS, y la unión de receptores solubles que comprenden zcytor17 (receptor soluble zcytor17 humano zcytor17-Fc4 (Ejemplo 10), o heterodímeros de receptor soluble (zcytor17/WSX-1 o BaF3/zcytor17/OSMRbeta), a las células COS transfectadas

se ensayó por un ensayo de trampa de secreción (Ejemplo 12). El ensayo confirmó que zcytor17lig de ratón no se une al receptor soluble zcytor17 humano.

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

- 5 La trampa de secreción se realizó según el Ejemplo 12 usando, por ejemplo, 1 µg/ml de proteína de fusión de receptor soluble zcytor17 Fc4 (Ejemplo 10) (o heterodímeros de receptor soluble que comprendía zcytor17 como se describe en el presente documento) en TNB, e Ig-HRP de cabra anti-humana (específica de Fc) diluida 1:200 en TNB para el anticuerpo detectable. No se detectó unión positiva del receptor zcytor17 humano soluble a las células fijadas preparadas con el reactivo fluoresceína tiramida según el Ejemplo 12. Las células se conservaron y se visualizaron de acuerdo con el Ejemplo 12.

Los resultados indicaron que zcytor17lig de ratón no se une al receptor soluble zcytor17 humano (o heterodímeros del receptor soluble que comprende zcytor17 como se describe en el presente documento).

Ejemplo 18

Expresión de zcytor17lig en células de mamífero

- 15 Expresión en mamífero de zcytor17lig de ratón

Se cultivaron células BHK 570 (ATCC N° CRL-10314) en placas de cultivo de tejido de 10 cm y se dejaron crecer hasta una confluencia de aproximadamente el 20 % durante una noche a 37 °C, con un 5 % de CO₂ en medio DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL de Alto contenido de Glucosa; GibcoBRL, Gaithersburg, MD), suero bovino fetal al 5 % (Hyclone, Logan, UT), L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenexa, KS), piruvato sódico 1 mM (Gibco BRL). Las células después se transfectaron con el plásmido mzcycor17lig/pZP7X (Ejemplo 14) usando un kit de transfección de Lipofectamine (GibcoBRL) estable mamífero de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Un día después de la transfección, las células se dividieron 1:10 y 1:20 en el medio de selección (medio de DMEM/FBS con la adición de metotrexato 1 µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)) en placas de 150 mm. El medio de las células se reemplazó por medio de selección limpio el día 5 después de la transfección. Aproximadamente 10 días después de la transfección, se tripsinizaron las colonias resistentes a metotrexato y las células se reunieron y cultivaron en matraces de cultivo a gran escala. Una vez que las células se habían desarrollado hasta una confluencia de aproximadamente el 90 %, se aclararon con PBS tres veces y se cultivaron con medio ESTEP2 sin suero (medio acondicionado DMEM (Gibco BRL), 0,11 g/l de Na Piruvato, 3,7 g/l de NaHCO₃, 2,5 mg/l de insulina, 5 mg/l de transferrina, pH 7,0). El medio acondicionado se recogió tres días después, y se puso en un ensayo de proliferación de BaF3 usando AlamarBlue descrito en el Ejemplo 19 presentado a continuación.

Ejemplo 19

zcytor17lig de ratón no activa el receptor zcytor17 humano en ensayos de BaF3 usando AlamarBlue

La proliferación de células BaF3/zcytor17, BaF3/zcytor17/OSMRbeta y BaF3/zcytor17/WSX-1 (Ejemplo 4 y 5B) se evaluó usando medio acondicionado sin suero de células BHK que expresaban zcytor17lig de ratón (Ejemplo 18).

Se centrifugaron células BaF3/Zcytor17, BaF3/zcytor17/OSMRbeta y BaF3/zcytor17/WSX-1 se lavaron y se cultivaron en medio sin mL-3 como se describe en el Ejemplo 5B. Se diluyó medio acondicionado de células BHK que expresaban zcytor17lig de ratón (Ejemplo 18) con medio sin mL-3 hasta concentraciones del 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,5 %, 0,75 % y 0,375 %. El ensayo de proliferación se realizó según el Ejemplo 5B. Los resultados de este ensayo fueron negativos, indicando que zcytor17lig de ratón no activa complejos de receptor zcytor17, zcytor17/OSMRbeta o zcytor17/WSX-1 humanos.

Ejemplo 20

zcytor17lig humano activa al receptor zcytor17/OSMRbeta humano en el ensayo de luciferasa

A. Construcción de la línea celular BaF3/KZ134/zcytor17

45 El plásmido KZ134 se construyó con oligonucleótidos complementarios ZC12.749 (SEC ID N°: 44) y ZC12.748 (SEC ID N°: 45) que contienen elementos de unión al factor de transcripción STAT de 4 genes, que incluye un elemento inducible c-fos Sis modificado (m67SIE o hSIE) (Sadowski, H. y col., Science 261: 1739-1744, 1993), el p21 SIE1 del gen p21 WAF1 (Chin, Y. y col., Science 272: 719-722, 1996), el elemento de respuesta de glándula mamaria del gen de la β-caseína (Schmitt-Ney, M. y col., Mol. Cell. Biol. 11: 3745-3755, 1991), y un elemento inducible STAT del gen Fcg RI, (Seidel, H. y col., Proc. NatL Acad. Sci. 92:3041-3045, 1995). Estos oligonucleótidos contienen extremos compatibles con Asp718-XhoI y se ligaron, usando procedimientos convencionales, a un vector indicador de luciferasa de luciérnaga receptor con un promotor de c-fos (Poulsen, LK. y col., J. Biol. Chem. 273: 6229-6232,

1998) digerido con las mismas enzimas y que contenía un marcador de selección de neomicina. El plásmido KZ134 se usó para transfectar de forma estable células BaF3, usando procedimientos de transfección y selección convencionales para obtener la línea celular BaF3/KZ134.

5 Se construyó una línea celular indicadora de BaF3/KZ134 estable, que expresaba el receptor zcytor17 de longitud completa o el receptor zcytor17/OSMRbeta según el Ejemplo 4. Los clones se diluyeron, se cultivaron en placas y se seleccionaron usando técnicas convencionales. Los clones se exploraron por el ensayo de luciferasa (véase el Ejemplo 20B, indicado a continuación) usando el medio acondicionado de zcytor17lig humano o la proteína zcytor17lig purificada (véase el Ejemplo 35, indicado a continuación) como inductor. Se seleccionaron clones con la mayor respuesta a luciferasa (mediante luciferasa STAT) y el menor nivel de fondo. Se seleccionaron las líneas celulares transfectantes. Las líneas celulares se denominaron BaF3/KZ134/zcytor17 o BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta dependiendo de los receptores introducidos por transfección en la línea celular.

15 De forma similar, también se construyeron líneas celulares BHK usando el procedimiento descrito en el presente documento, y se usaron en ensayos de luciferasa descritos en el presente documento. Las líneas celulares se denominaron BHK/KZ134/zcytor17 o BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta dependiendo de los receptores introducidos por transfección en la línea celular.

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

20 Se centrifugaron células BaF3/KZ134/zcytor17 y BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta y se lavaron en medio sin mL-3. Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para asegurar la eliminación de mL-3. Después, las células se contaron en hemacitómetro. Las células se cultivaron en un formato de 96 pocillos a aproximadamente 30.000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando el medio sin mL-3. Se usó el mismo procedimiento para las células BaF3/KZ134 no transfectadas para uso como un control en el ensayo posterior. Se cultivaron células BHK/KZ134/zcytor17 o BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta en un formato de 96 pocillos a 15.000 células por pocillo en 100 µl de medio. Como control se usaron células BHK/KZ134 parentales.

25 La activación por STAT de las células BaF3/KZ134/Zcytor17, BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta, BHK/KZ134/zcytor17 o BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta se evaluó usando (1) medio acondicionado de células BHK570 transfectadas con el zcytor17lig humano (Ejemplo 7), (2) medio acondicionado de células BHK570 transfectadas con zcytor17lig de ratón (Ejemplo 18), (3) zcytor17lig humano purificado (Ejemplo 35), o (4) medio sin mL-3 para medir la respuesta de control solo con medio. El medio acondicionado se diluyó con medio RPMI sin mL-3 a concentraciones del 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,5 %, 0,75 % y 0,375 %. El zcytor17lig humano purificado se diluyó a una concentración de 1200, 600, 300, 150, 75, 37,5, 18,75 o 9,4 pM. Se añadieron 100 µl del medio acondicionado diluido o proteína a las células BaF3/KZ134/Zcytor17, BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta, BHK/KZ134/zcytor17 o BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta. El ensayo usando el medio acondicionado se realizó en paralelo en células de BaF3/KZ134 no transfectadas o BHK/KZ134 como control. El volumen total de ensayo fue de 30 35 200 µl. Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C, con un 5 % de CO₂ durante 24 horas, después de lo cual las células de BaF3 se sedimentaron por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min., y el medio se aspiró, y se añadieron 25 µl de tampón de lisis (Promega). Para las líneas celulares BHK, la etapa de centrifugación no fue necesaria ya que las células son adherentes. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, las placas se midieron con respecto a la activación de la construcción indicadora STAT leyéndolas en un luminómetro (Labsystems Luminoskan, model RS) que añadió 40 µl de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega) a un 40 integración de cinco segundos.

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

Ejemplo 21

zcytor17lig de ratón es activo en ensayo de médula ósea de ratón

50 A. Aislamiento de células de médula de baja densidad no adherentes:

Se obtiene aspirado de fémur de ratón reciente (médula) a partir de ratones Balb/C o c57BL/6 de 6-10 semanas de edad, macho. La médula después se lava con RPMI + FBS al 10 % (JRH, Lenexa KS; Hyclone, Logan UT) y se suspende en RPMI + FBS al 10 % como una suspensión de células de médula enteras. La suspensión de células de médula entera después se somete a un gradiente de densidad (Nycoprep, 1.077, Animal: Gibco BRL) para 55 enriquecer con respecto a las células de baja densidad, principalmente mononucleares, como se indica a continuación: la suspensión de células de médula entera (aproximadamente 8 ml) se pipetea cuidadosamente sobre aproximadamente 5 ml de solución en gradiente Nycoprep en un tubo cónico de 15 ml, y después se centrifuga a

600 X g durante 20 minutos. Después se retira la capa interfacial, que contiene las células mononucleares de baja densidad, se lava con exceso de RPMI + FBS al 10 % y se sedimenta por centrifugación a 400 X g durante 5-10 minutos. Este sedimento se resuspende en RPMI + FBS AL 10 % y se cultiva en un matraz T-75 aproximadamente 10⁶ células/ml, y se incuba a 37 °C, con un 5 % de CO₂ durante aproximadamente 2 horas. Las células resultantes en suspensión son Células de Médula de Baja Densidad No Adherentes (NA LD).

B. Ensayo de 96 pocillos

Se cultivan Células de Médula de Ratón NA LD de 25.000 a 45.000 células/pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos en RPMI + FBS al 10 % + 1 ng/ml de Factor de Células Madre de ratón (mSCF) (R&D Systems, Minneapolis, MN), más un 5 % de medio acondicionado de uno de lo siguiente: (1) células BHK 570 que expresan zcytor17lig de ratón (Ejemplo 18), (2) células BHK 570 que expresan zcytor17lig humano (Ejemplo 7), o (3) células BHK 570 de control que contienen vector y que no expresan ningún ligando. Estas células después se someten a diversos tratamientos con citocinas para ensayar la expansión o diferenciación de células hematopoyéticas de la médula. Para el ensayo, las células de médula de ratón NA LD cultivadas se someten a Interleucina-15 humana (hIL-15) (R&D Systems), o una de un panel de otras citocinas (R&D System). Se ensaya la dilución en serie de hIL-15; o las otras citocinas, con un dilución seriada dos veces desde una concentración de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 0,5 ng/ml. Después de 8 a 12 días los ensayos de 96 pocillos se puntúan con respecto a la proliferación celular por el ensayo de AlamarBlue como se describe en el Ejemplo 5B.

C. Resultados del ensayo de Médula de Ratón NA LD de 96 pocillos

El medio acondicionado de las células BHK que expresan zcytor17lig de ratón y humano puede promover la expansión de una población de células hematopoyéticas individualmente o en sinergia con otra citocina en la médula de ratón NA LD en comparación con medio acondicionado de BHK de control. La población de células hematopoyéticas expandidas por el zcytor17lig de ratón con o sin otras citocinas, y las células hematopoyéticas expandidas por el zcytor17lig humano con o sin otras citocinas, se propagan adicionalmente en cultivo celular. Estas células hematopoyéticas se tiñen con un anticuerpo anti-Pan célula NK marcado con ficoeritrina (PharMingen) y se someten a un análisis de citometría de flujo, que demostró que las células expandidas se tiñen positivamente para este marcador de células citolíticas naturales (NK). De forma similar, pueden usarse otros marcadores específicos de células hematopoyéticas para determinar la expansión de, por ejemplo, linfocitos T CD4+ o CD8+, otras poblaciones de linfocitos T, linfocitos B y otros marcadores de células inmunes.

El mismo ensayo de 96 pocillos se realiza usando células de médula humana reciente procedentes de mPoieticTechnologies, Gaithersburg, MD. De nuevo, un resultado positivo muestra que zcytor17lig solo o en sinergia con otras citocinas, el zcytor17lig de ratón y humano puede expandir una población de células hematopoyéticas que se tiñe positivamente por marcadores celulares específicos como se ha desvelado anteriormente.

Ejemplo 22

Construcciones para generar ratones transgénicos para zcytor 17lig

A. Construcción para expresar zcytor17lig humano a partir del promotor de MT-1

Se diseñaron oligonucleótidos para generar un fragmento de PCR que contenía una secuencia Kozak consenso y la región codificante de zcytor17lig humana. Estos oligonucleótidos se diseñaron con un sitio FseI en el extremo 5' y un sitio Ascl en el extremo 3' para facilitar la clonación en (a) pMT12-8, un vector transgénico convencional o (b) pKFO51, un vector transgénico específico del linaje linfóide (Ejemplo 22B).

Las reacciones PCR se realizan con aproximadamente 200 ng de molde de zcytor17lig humano (SEC ID N°: 1) y oligonucleótidos diseñados para amplificar la longitud completa o la parte activa del zcytor17lig. Las condiciones de reacción PCR se determinan usando procedimientos conocidos en la técnica. Los productos de PCR se separan por electroforesis en gel de agarosa y se purifican usando un kit de extracción de gel QiaQuick™ (Qiagen). El fragmento de ADN del tamaño correcto, aislado, se digiere con FseI y Ascl (Boehringer-Mannheim), se precipita con etanol y se digiere en pMT12-8 previamente digerido con FseI y Ascl. El plásmido pMT12-8, diseñado para la expresión de un gen de interés en hígado y otros tejidos en ratones transgénicos, contiene un casete de expresión flanqueado por 10 kb de ADN 5'-MT-1 y 7kb de ADN 3' MT-1. El casete de expresión comprende el promotor de MT-1, el intrón II de insulina de rata, un poliengarce para la inserción del clon deseado y la secuencia poli A de la hormona de crecimiento humana (hGH).

Aproximadamente 1 µl de cada de reacción de ligamiento se introduce por electroporación en células DH10B ElectroMax™ competentes (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cultiva en placas LB que contienen 100 µg/ml de ampicilina, y se incuban durante una noche. Se seleccionan las colonias y se cultivan en medio LB que contiene 100 µg/ml de ampicilina. Se prepara ADN Miniprep a partir de los clones seleccionados y se explora con respecto al inserto de zcytor17lig humano por digestión de restricción con EcoRI sola, o FseI y Ascl combinadas, y posteriormente electroforesis en gel de agarosa. Se realizan Maxipreps del pMT-zcytor17lig humano correcto. Se prepara un fragmento Sall que contiene las secuencias flanqueantes 5' y 3', el promotor de MT-1, el intrón II de insulina de rata, ADNc de zcytor17lig humano y la secuencia poli A de hGH para

usarse para microinyección en oocitos murinos fertilizados. La microinyección y la producción de ratones transgénicos se realiza como se describe en Hogan, B. y col. Manipulating the Mouse Embryo, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1994.

B. Construcción para la expresión de zcytor17lig humano a partir del promotor de EμLCK específico de linaje linfoide.

Se diseñan oligonucleótidos para generar un fragmento de PCR que contiene una secuencia Kozak consenso y la región codificante de zcytor17lig humano. Estos oligonucleótidos se diseñan con un sitio Fsel en el extremo 5' y un sitio Ascl en el extremo 3' para facilitar la clonación en pKFO51, un vector transgénico específico del linaje linfoide.

Las reacciones PCR se realizan con aproximadamente 200 ng de molde de zcytor17lig humano (SEC ID N°: 1) y oligonucleótidos diseñados para amplificar la longitud entera o la parte activa de zcytor17lig. Se realiza una reacción PCR usando procedimientos conocidos en la técnica. El fragmento de ADN de tamaño correcto aislado se digiere con Fsel y Ascl (Boehringer-Mannheim), se precipita con etanol y se liga a pKFO51 previamente digerido con Fsel y Ascl. El vector transgénico pKFO51 procede de p1026X (Iritani, B.M., y col., EMBO J. 16: 7019-31, 1997) y contiene el promotor próximo lck específico de linfocitos T, el potenciador de la cadena pesada μ de inmunoglobulina específica de linfocitos B/T, un poliengarce para la inserción del clon deseado y un gen de hGH mutado que codifica una hormona de crecimiento inactiva (que proporciona intrones 3' y una señal de poliadenilación).

Aproximadamente un microlitro de cada reacción de ligamiento se introduce por electroporación, se cultiva, se replican clones y se exploran con respecto al inserto de zcytor17lig humano por digestión de restricción como se ha descrito anteriormente. Un clon correcto de pKFO51 -zcytor17lig se verifica por secuenciación, y se realiza un Maxiprep de este clon. Se prepara un fragmento NotI que contiene el promotor proximal lck y el potenciador μ de inmunoglobulina (EμLCK), ADNc de zcytor17lig, y el gen de hGH mutado para usarse para la microinyección en oocitos murinos fertilizados.

C. Construcción para la expresión de zcytor17lig de ratón a partir del promotor de EF1 alfa

Se usaron cebadores ZC41.498 (SEC ID N°: 86) y ZC41.496 (SEC ID N°: 87) para amplificar por PCR un molde de biblioteca de ADNc de testículo de ratón. Estas reacciones PCR se realizaron satisfactoriamente en volúmenes de aproximadamente 50 μl con o sin un 10 % de DMSO, usando pfu turbo polimerasa (Stratagene) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante; con una aplicación adicional de un iniciador a alta temperatura de cera empleando inicio a alta temperatura 50s (Molecular Bioproducts, Inc. San Diego, CA). Los ciclos térmicos de PCR se realizaron con un solo ciclo de 94 °C durante 4 min; seguido de 40 ciclos de 94 °C: 30 segundos, 48 °C: 30 segundos, 72 °C: 50 segundos; con una extensión final adicional de 72 °C durante 7 minutos. Las dos reacciones PCR se reunieron y se purificaron usando agarosa de bajo punto de fusión y la enzima de digestión de agarosa Gelasa (Epicenter, Inc. Madison, WI) de acuerdo con la recomendaciones del fabricante.

Los productos de PCR con el ADN secuenciado revelaron una secuencia de ADNc de zcytor17 murino (SEC ID N°: 90) que comprendía una ORF idéntica a la SEC ID N°: 10, confirmando que la SEC ID N°: 10 codificaba el polipéptido zcytor17lig de ratón. Después se usaron cebadores de PCR, ZC41583 (SEC ID N°: 88) y ZC41584 (SEC ID N°: 89), para añadir sitios de restricción Fsel y Ascl y una secuencia Kozak parcial al marco de lectura abierta de mcytor17lig y codón de terminación (SEC ID N°: 92). Se usó un termociclador Robocycler 40 (Stratagene) para realizar un gradiente de temperaturas de templado y ciclos como se indica a continuación. Se aplicó Pfu turbo polimerasa (Stratagene) como se ha descrito anteriormente, pero solo en DMSO al 10 %. Los ciclos se realizaron con un solo ciclo de 94 °C durante 4 min; seguido de 20 ciclos de 94 °C: 30 segundos, gradiente de 65 °C a 51 °C: 30 segundos, 72 °C: 1 minuto; y una sola extensión a 72 °C durante 7 minutos. El molde para esta segunda reacción de ciclos térmicos fue 1 μl del producto de PCR mcytor17lig purificado en gel inicial, indicado anteriormente. El producto de PCR resultante de las tres reacciones a la menor temperatura se reunió y se purificaron en gel usando el procedimiento de Gelasa (Epicenter) descrito anteriormente. Este fragmento purificado después se dirigió con Fsel y Ascl y se ligó al vector pZP7X modificado para tener sitios Fsel y Ascl en su sitio de clonación. Esto se envió a secuenciación para confirmar la secuencia correcta. La secuencia de ADNc murina clonada se representa en la SEC ID N°: 90, y la secuencia polipeptídica correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 91 (que es idéntica a la SEC ID N°: 11).

El fragmento de ADN con el tamaño correcto, aislado, digerido con Fsel y Ascl (Boehringer-Mannheim) se subclonó en un plásmido que contenía el promotor de EF1 alfa previamente digerido con Fsel y Ascl. Se realizaron Maxipreps de EFlalfa zcytor17lig de ratón correcto. El casete de expresión contiene el promotor EF1 alfa (con un sitio Fsel delecionado), el intrón de EF1 alfa, un sitio similar a SUR IRES para facilitar la expresión, un poliengarce flanqueado con sitios de insulina II de rata en el extremo 5' que añade sitios Fsel, PmeI y Ascl para la inserción del clon deseado, y la secuencia poli A de la hormona de crecimiento humana (hGH). Se preparó un fragmento NotI de 7,5 kb que contenía el casete de expresión de promotor de EFlalfa y zcytor17lig de ratón para usarse para microinyección en oocitos murinos fertilizados. El plásmido EFlalfa se obtuvo de Louis-Marie del Laboratoire de Differentiation Cellulaire, como se describe en Taboit-Dameron y col., 1999, Transgenic Research 8: 223-235.

D. Construcción para la expresión de zcytor17lig de ratón a partir del promotor de EμLCK específico del linaje linfoide

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

5 El fragmento de ADN de *zcytor17lig* con el tamaño correcto, aislado, usado en las construcciones de EFlalfa, digerido con FseI y AseI (Boehringer-Mannheim), se subclonó en un plásmido que contenía pKFO51, un vector transgénico específico de linaje linfocitoide. El vector transgénico pKFO51 procede de p1026X (Iritani, B.M., y col., EMBO J. 16:7019-31, 1997) y contiene el promotor proximal *lck* específico de linfocitos T, el potenciador de la cadena pesada μ de inmunoglobulina específica de linfocitos B/T, un poliengarce para la inserción del clon deseado, y un gen de hGH mutado que codifica una proteína de hormona de crecimiento inactiva (proporcionando intrones 3' y una señal de poliadenilación). Se preparó un fragmento NotI de 6,5 kb, que contenía el promotor proximal *lck* y el potenciador μ de inmunoglobulina (E μ LCK), ADNc de *zcytor17lig* de ratón, y el gen de hGH mutado para usarse para la microinyección en oocitos murinos fertilizados (Ejemplo 41).

Ejemplo 23

Construcción de vectores de expresión de mamífero que expresan *zcytor 17lig*-CEE

15 A. Construcción de *zCyt17Lig*-CEE/pZMP21

Se construyó un plásmido de expresión que contenía todo o parte de un polinucleótido que codificaba *zCyt17lig* humano mediante recombinación homóloga. El plásmido se denominó *zCyt17Lig*-CEE/pZMP21.

20 La construcción de *zCyt17Lig*-CEE/pZMP21 se realizó generando un fragmento *zCyt17Lig*-CEE (SEC ID N°: 95) (su secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 96) usando amplificación por PCR. La plantilla de ADN usada para la producción del fragmento *zCyt17Lig*-CEE fue *zCyt17Lig*/pZP7nx. Los cebadores usados para la producción del fragmento *zCyt17Lig*-CEE fueron: (1) ZC41607 (SEC ID N°: 97) (secuencia con sentido), que incluye desde el extremo 5' al extremo 3': 28 pb de la secuencia flanqueante del vector (5' del inserto) y 21 pb que corresponden a la secuencia 5' de *zCyt17Lig*; y (2) ZC41605 (SEC ID N°: 98) (secuencia anti-sentido), que incluye desde el extremo 5' al extremo 3': 37 pb de la secuencia flanqueante del vector (3' del inserto), 3 pb del
25 codón de terminación, 21 pb que codifican un marcador EE C-terminal y 21 pb que corresponden al extremo 3' de la secuencia de *zCyt17Lig*. El fragmento resultante de la amplificación por PCR anterior es una copia del molde *zCyt17Lig* con la adición de un marcador EE C-terminal, produciendo un producto final *zCyt17Lig*-CEE.

30 Las reacciones PCR se realizaron como se indica a continuación: A un volumen final de 100 μ l se le añadieron: 10 μ l de Tampón de Reacción de Taq Polimerasa 10x con MgCl 15 mM (Gibco), 1 μ l de Taq ADN Polimerasa (5 unidades/ μ l, Gibco), 3 μ l de dNTP 10 mM, 78 μ l de dH₂O, 3 μ l de una solución de reserva de 20 pmol/ μ l de cebador ZC41607 (SEC ID N°: 97) 3 μ l de una solución de reserva de 20 pmol/ μ l de cebador ZC41605 (SEC ID N°: 98), y 2 μ l de una solución de reserva de 0,13 μ g/ μ l de ADN molde de *zCyt17lig*. Se añadió un volumen igual a 50 μ l de aceite mineral a la mezcla. La reacción se calentó a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 1 minuto; 55 °C durante 2 minutos; 72 °C durante 3 minutos; seguido de una extensión de 10 minutos a 72 °C y
35 mantenimiento a 4 °C hasta que se recogió la reacción.

40 El plásmido pZMP21 se digirió con enzima de restricción BglIII, se limpio con el Kit de Purificación de PCR QiaQuick (Qiagen) usando un protocolo de microcentrifuga, y se usó para la recombinación con el fragmento de PCR. El plásmido pZMP21 se construyó a partir de pZMP20 que se construyó a partir de pZP9 (depositado en la Colección Americana de Cultivo Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y se denomina N° 98668) con los elementos genéticos de levadura tomados de pRS316 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y denominado N° 77145), un elemento IRES de poliovirus, y el dominio extracelular de CD8, truncado en el extremo carboxilo terminal del dominio transmembrana. PZMP21 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de MPSV, un intrón de péptido señal de inmunoglobulina, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes, un
45 codón de terminación y un terminador de hormona de crecimiento humana. El plásmido también un origen de replicación de *E. coli* una unidad de expresión de un marcador de selección de mamífero que tiene un promotor, potenciador y origen de replicación de SV40, un gen de DHFR, el terminador de SV40, así como la secuencias URA3 y CEN-ARS necesarias para la selección y replicación en *S. cerevisiae*.

50 Se combinaron 50 μ l de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) independientemente con 100 ng de plásmido cortado, 5 μ l de mezcla de PCR descrita previamente, y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/ADN se sometió a electropulsos a 0,75 kV (5 kV/cm), infinitos ohmios, 25 μ F. A cada cubeta se le habían añadido 600 μ l de sorbitol 1,2 M y la levadura se cultivó en una alícuota de 100 μ l y una alícuota de 300 μ l en dos placas URA-D y se incubó a 30 °C. Después de aproximadamente 72 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una sola placa se resuspendieron en un 1 ml de H₂O y se centrifugaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 500 μ l de tampón de lisis (Tritón X-100 al 2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Los 500 μ l de la mezcla de
55 lisis se añadieron a un tubo Eppendorf que contenía 300 μ l de perlas de vidrio de 600 μ m lavadas con ácidos y 300

5 μ l de fenol cloroformo, se agitó vorticialmente durante intervalos de 1 minutos dos o tres veces, seguido de una centrifugación 5 minutos en una centrífuga Eppendorf a velocidad máxima. Trescientos microlitros de la fase acuosa se transfirieron a un tubo limpio, y el ADN se precipitó con 600 μ l de etanol al 100 % (EtOH), seguido de centrifugación durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento de ADN después se lavó con 500 μ l de EtOH al 70 %, seguido de centrifugación durante 1 minuto a 4 °C. El sedimento de ADN se resuspendió en 30 μ l de H₂O.

10 La transformación de células *E. coli* electrocompetentes (MC1061) se realizó con 5 μ l de la preparación de ADN de levadura y 50 μ l de células MC1061. Las células se sometieron a electropulsos a 2,0 kV, 25 μ F y 400 ohms (Ω). Después de la electroporación, se añadieron 600 μ l de SOC (Bacto Tryptone al 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM). Las células *E. coli* sometidas a electroporación se cultivaron en una alícuota de 200 μ l y 50 μ l en dos placas de LB AMP (caldo LB (Lennox), Bacto Agar al 1,8 % (Difco), 100 mg/l de Ampicilina). Las placas se incubaron en posición vertical durante aproximadamente 24 horas a 37 °C. Se seleccionaron tres colonias resistentes a ampicilina aleatoriamente y se enviaron para análisis de secuencia del inserto. Se aisló ADN plasmídico a gran escala a partir de un clon con la secuencia confirmada usando el kit Qiagen Maxi (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 B. Expresión en mamífero de zcytor 17lig humano

20 Se produjo proteína zCyt17Lig de longitud completa en células BHK transfectadas con zCyt17Lig-CEE/pZMP21 (Ejemplo 23A). Se cultivaron células BHK 570 (ATCC CRL-10314) en matraces de cultivo de tejido T75 y se dejaron crecer hasta una confluencia de aproximadamente el 50 al 70 % a 37 °C, con un 5 % de CO₂, en medio de crecimiento (SL7V4, FBS al 5 %, pen/strep al 1 %). Las células después se transfectaron con zCyt17Lig-CEE/pZMP21 por transfección mediada por liposomas (usando Lipofectamine™; Life Technologies), en medio sin suero (SF) (SL7V4). El plásmido (16 μ g) se diluyó en tubo de 1,5 ml hasta un volumen final total de 640 μ l con medio SF. Treinta cinco microlitros de la mezcla de lípido se mezclaron con 605 μ l de medio SF, y la mezcla resultante se dejó incubar aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 5 mililitros de medio SF a la mezcla de ADN:lípido. Las células se aclararon una vez con 10 ml de PBS, el PBS se decantó, y se añadió la mezcla de ADN:lípidos. Las células se incuban a 37 °C durante cinco horas, y después se añadieron 15 ml de medio (SL7V4, FBS al 5 %, pen/strep al 1 %) a cada placa. Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche y la mezcla de ADN:medio de lípidos se reemplazó por medio de selección (SL7V4, FBS al 5 %, pen/strep al 1 %, metotrexato 1 μ M) al día siguiente. Aproximadamente 10 días después de la transfección, se tripsinizaron colonias resistentes a metotrexato del matraz de transfección T75 y las células se reunieron y se cultivaron un matraz T = 162 y se transfirieron a un cultivo a gran escala.

Ejemplo 24

Expresión de receptor soluble zcytor17 en *E. coli*

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

35 Se construyó un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codificaba un receptor soluble zcytor17 fusionado en el extremo C a proteína de unión a maltosa (MBP) mediante recombinación homóloga. El polipéptido de fusión contiene una parte de MBP de aproximadamente 388 aminoácidos N-terminal fusionada a cualquiera de los receptores solubles zcytor17 descritos en el presente documento. Se aisló un fragmento de ADNc de zcytor17 (SEC ID N°: 4) usando PCR como se describe en el presente documento. Se usaron dos cebadores en la producción del fragmento de zcytor17 en una reacción PCR convencional: (1) uno que contiene aproximadamente 40 pb de la secuencia flanqueante del vector y aproximadamente 25 pb correspondientes al extremo amino del zcytor17, y (2) otro que contiene aproximadamente 40 pb del extremo 3' correspondiente a la secuencia flanqueante del vector y aproximadamente 25 pb correspondientes al extremo carboxilo del zcytor17. Dos μ l de la reacción PCR de 100 μ l se introdujeron en un gel de agarosa al 1,0 % con tampón TBE 1 x para el análisis, y se observó el fragmento aproximadamente esperado. La reacción PCR restante se combinó con el segundo tubo de PCR y se precipitó con 400 μ l de etanol absoluto. El ADN precipitado se usó para la recombinación en el vector pTAP170 receptor cortado con Smal para producir la construcción que codificaba la fusión MBP-zcytor17 como se describe más adelante.

50 Se obtuvo plásmido pTAP170 a partir de los plásmidos pRS316 y pMAL-c2. El plásmido pRS316 es un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae* (Hieter P. y Sikorski, R., Genetics 122:19-27, 1989). pMAL-C2 (NEB) es un plásmido de expresión de *E. coli*. Lleva el promotor *tac* que dirige *MalE* (gen que codifica MBP) seguido de un marcador His, un sitio de escisión por trombina, un sitio de clonación y el terminador *rmB*. El vector pTAP170 se construyó usando recombinación homóloga de la levadura. Se recombinaron 100 ng de pMAL-c2 cortado con EcoR1 con 1 μ g de pRS316 cortado con PvuI, 1 μ g de engarce y 1 μ g de pRS316 cortado con Scal/EcoRI. El engarce consistía en los oligos zc19,372 (SEC ID N°: 157) (100 pmol); zc19,351 (SEC ID N°: 158) (1 pmol); zc19,352 (SEC ID N°: 159) (1 pmol), y zc19,371 (SEC ID N°:160) (100 pmol) combinados en una reacción PCR. Las condiciones fueron las siguientes: 10 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos; seguido de inmersión a 4 °C. Los productos de PCR se concentraron mediante precipitación con etanol al 100 %.

5 Cien microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) se combinaron con 10 μ l de una mezcla que contenía aproximadamente 1 μ g del inserto de zcytor17 humano, y 100 ng de vector pTAP170 digerido con SmaI, y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/ADN se sometió a electropulsos a 0,75 kV (5 kV/cm), infinitos ohmios, 25 μ F. A cada cubeta se le añadieron 600 μ l de sorbitol 1,2 M. La levadura después se cultivó en dos alícuotas de 300 μ l sobre dos placas de -URA D y se incubaron a -30 °C.

Después de aproximadamente 48 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una sola placa se seleccionaron, se aisló el ADN y se usó para transformar células *E. coli* electrocompetentes (por ejemplo, MC1061, Casadaban et. al. J. Mol. Biol. 138, 179-207) y se cultivaron en placas con MM/CA+KAN a 25 μ g/l (Pryor y Leiting, Protein Expression y Purification 10:309-319, 1997) usando procedimientos convencionales. Las células se cultivaron en MM/CA con 25 μ g/ml de Kanamicina durante dos horas, con agitación a 37 °C. Un ml del cultivo se indujo con IPTG 1 mM. De dos a cuatro horas después, los 250 μ l de cada cultivo se mezclaron con 250 μ l de perlas de vidrio lavadas con ácido y 250 μ l de tampón Thomer con β ME al 5 % y colorante (urea 8 M, Tris 100 mM pH 7,0, glicerol al 10 %, EDTA 2 mM, SDS al 5 %). Las muestras se sometieron a agitación vorticial durante un minuto y se calentaron a 65 °C durante 10 minutos. Se cargaron 20 μ l por carril en un gel PAGE del 4 % al 12 % (NOVEX). Los geles se procesaron en tampón MES 1X. Los clones positivos se denominaron pCMH01 y se sometieron a análisis de secuencia.

Se usó un microlitro de ADN se secuenciación para transformar la cepa BL21. Las células se sometieron a electropulsos a 2,0 kV, 25 μ F y 400 ohm. Después de la electroporación, 0,6 ml de MM/CA con 25 μ g/l de Kanamicina. Las células se cultivaron en MM/CA y se indujeron con IPTG como se ha descrito anteriormente. Los clones positivos se usaron para crecer con respecto a la purificación de proteína de la proteína de fusión huzcytor17/MBP-6H usando técnicas convencionales.

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

25 A menos que se indique otra cosa, todas las operaciones se realizaron a 4 °C. El siguiente procedimiento se usó para la purificación del polipéptido receptor soluble huzcytor17/MBP-6H recombinante. Se construyeron células *E. coli* que contenían la construcción pCMH01 y que expresaban el polipéptido receptor soluble huzcytor17/MBP-6H usando procedimientos de biología molecular convencionales y se cultivaron en SuperBroth II (12 g/l de Casien, 24 g/l de Extracto de Levadura, 11,4 g/l de fosfato dipotásico, 1,7 g/l de fosfato monopotásico; Becton Dickenson, Cockeysville, MD). Las células resultantes se recogieron y se congelaron en glicerol al 0,5 %. Para la purificación de proteínas se usaron veinte gramos de células congeladas.

30 Las células descongeladas se resuspendieron en 500 ml de tampón de Equilibrio de Amilosa (Tris 20 nM, NaCl 100 mM, pH 8,0). Para lisar las células se usó un sistema de ruptura de células de Prensa French (Constant Systems Ltd., Warwick, UK) con un establecimiento de la temperatura de -7 °C a -10 °C y 206,79 MPa. Se comprobó la ruptura de las células resuspendidas por lecturas de A_{600} antes y después de los ciclos a través de la Prensa French. La suspensión de células lisadas se sedimentó a 10.000 G durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante del sedimento de deshecho para la purificación de proteínas.

35 Se vertieron veinticinco ml de resina de Amilosa (New England Biolabs, Beverly, MA) en una columna de vidrio Bio-Rad, de 2,5 cm de diámetro por 10 cm de altura. La columna se llenó y se equilibró por gravedad con 10 volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrio de Amilosa. El sobrenadante celular recogido se cargó por lotes en la resina de Amilosa, durante una noche con agitación. La resina cargada se devolvió a la columna de vidrio, se lavó con 10 VC de tampón de Equilibrio de Amilosa y se eluyó por gravedad con -2 VC de tampón de Elución de Amilosa (tampón de Equilibrio de Amilosa, Maltosa 10 mM, Fluka Biochemical, Suiza). Se recogieron diez fracciones de 5 ml a lo largo del perfil de elución y se ensayaron con respecto a la absorbancia a 280 y 320 nm. La resina de Amilosa se regeneró con 1 VC de H₂O destilada, 5 VC de SDS al 0,1 % (p/v) (Sigma), 5 VC de H₂O destilada, 5 VC de tampón de Equilibrio de Amilosa, y finalmente 1 VC de tampón de Almacenamiento de Amilosa (tampón de Equilibrio de Amilosa, Azida Sódica al 0,02 % (p/v)). La resina regenerada se almacenó a 4 °C.

40 Se reunieron las fracciones del perfil de elución de interés y se dializaron en una cámara de diálisis 10 K (Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemical) frente a 4 cambios de 4 l de PBS pH 7,4 (Sigma) durante un periodo de tiempo de 8 horas. Después de la diálisis, el material recogido representaba el polipéptido huzcytor17/MBP-6H purificado. El polipéptido huzcytor17/MBP-6H purificado se esterilizó por filtración y se analizó mediante tinción con Coomassie y SDS-PAGE obteniéndose un producto con el peso molecular apropiado. La concentración del polipéptido huzcytor17/MBP-6H se determinó por análisis BCA y fue de 0,76 mg/ml.

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

55 Ejemplo 25

Anticuerpo Policlonal de Receptor Soluble zcytor17 Humano

A. Preparación y Purificación

Se prepararon anticuerpos policlonales inmunizando 2 conejos blancos New Zealand hembra con la proteína recombinante purificada huzcytor17/MBP-6H (Ejemplo 24). Cada conejo recibió una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 200 µg de proteína purificada en Adyuvante Completo de Freund seguido de inyecciones IP de refuerzo de 100 µg de proteína en Adyuvante Incompleto de Freund cada tres semanas. De siete a diez días después de la administración de la segunda inyección de refuerzo (3 inyecciones en total), se extrajo sangre de los animales y se recogió el suero. Los animales después se sometieron a refuerzos y a extracciones de sangre cada tres semanas.

El suero de conejo específico para huzcytor17/MBP-6H se preadsorbió de anticuerpos anti-MBP usando una columna de proteína CNBr-SEPHAROSE 4B (Farmacia LKB) que se preparó usando 10 mg de proteína de fusión-MBP recombinante purificada no específica por gramo de CNBr-SEPHAROSE. Los anticuerpos policlonales específicos para huzcytor17/MBP-6H se purificaron por afinidad a partir del suero de conejo preadsorbido usando una columna de proteína CNBr-SEPHAROSE- 4B (Farmacia LKB) que se preparó usando 10 mg de la proteína recombinante purificada a partir del antígeno específico huzcytor17/MBP-6H. Después de la purificación, los anticuerpos policlonales se dializaron con 4 cambios de 20 veces el volumen de anticuerpo de PBS durante un periodo de tiempo de al menos 8 horas. Los anticuerpos específicos para Huzcytor17 se caracterizaron por ELISA usando 500 ng/ml de la proteína recombinante purificada huzcytor17/MBP-6H como diana de anticuerpo. El límite inferior de detección (LID) del anticuerpo purificado por afinidad anti-huzcytor17/MBP-6H de conejo fue 500 pg/ml en su antígeno recombinante purificado específico huzcytor17/MBP-6H.

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

Se ensayó anticuerpo de conejo anti-ZcytoR17 MBP-6H humano por SDS-PAGE (NuPage 4-12 %, Invitrogen, Carlsbad, CA) con el procedimiento de tinción con coomassie y transferencia de Western usando IgG de cabra anti-conejo-HRP. La proteína purificada (200-25 ng) o el medio acondicionado que contenía zcytor17 se sometieron a electroporación usando una mini-cell Xcell II de Novex de Invitrogen y se transfirieron a nitrocelulosa (0,2 mm; Invitrogen, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente usando el módulo de transferencia Xcell de Novex con agitación de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el manual del instrumento. La transferencia se realizó a 300 mA durante una hora en un tampón que contenía base Tris 25 mM, glicina 200 mM, y metanol al 20 %. El filtro después se bloqueó con tampón A de Western (local, Tris 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, pH 8,0, Igepal CA-630 al 0,05 %, NaCl 150 mM, y gelatina al 0,25 %) durante una noche con agitación suave a 4 °C. La nitrocelulosa se aclaró rápidamente y después se añadió el anticuerpo de conejo anti-zcytoR17 MBP-6H humano (1:1000) en tampón A de Western. La mancha de transferencia se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La mancha de transferencia se aclaró 3 veces durante 5 minutos cada vez en Western A, y después se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-HRP (1:1000) en tampón A de Western A. La mancha de transferencia se incubó durante 1,25 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La mancha de transferencia se aclaró 3 veces durante 5 minutos en Western A, y después se aclaró rápidamente en H₂O. La mancha de transferencia se reveló usando reactivos de sustratos quimioluminiscentes disponibles en el mercado, reactivos de detección de transferencia CLWestern 1 y 2 mezclados 1:1; reactivos obtenidos de Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) y la mancha de transferencia se expuso a una película de rayos X durante hasta 15 minutos.

El anticuerpo de conejo anti-zcytoR17 MBP-6H humano pudo detectar el zcytor17 humano presente en medios acondicionados así como la proteína zcytoR17 purificada como una banda a 120 kDa en condiciones reductoras.

Ejemplo 26Distribución Tisular de zcytor17 de ratón en Paneles de Tejidos Usando PCR

Se exploró un panel de ADNc de tejidos murinos con respecto a la expresión de zcytor17 de ratón usando PCR. El panel se realizó internamente y contenía 94 ADNc marathon y muestras de ADNc de diversas líneas celulares y tejidos murinos normales y cancerosos como se muestra en la Tabla 6 proporcionada a continuación. Los ADNc procedían de bibliotecas internas o ADNc marathon de preps de ARN internas, ARN Clontech o ARN de Invitrogen. Los ADNc marathon de ratón se fabricaron usando el kit marathon Ready™ (Clontech, Palo Alto, CA) y se ensayaron QC con cebadores de receptor de transferrina de ratón ZC10.651 (SEC ID N°: 46) y ZC10.565 (SEC ID N°: 47) y después se diluyeron basándose en la intensidad de la banda de transferrina. Para asegurar la calidad de las muestras de biblioteca amplificadas en el panel, se realizaron tres ensayos de control de calidad (QC): (1) para evaluar la calidad del ARN usado para las bibliotecas, los ADNc internos se ensayaron con respecto al tamaño medio del inserto por PCR con oligos del vector que eran específicos para las secuencias de vector para una biblioteca de ADNc individual; (2) la estandarización de la concentración del ADNc en las muestras del panel se consiguió usando procedimientos de PCR convencionales para amplificar la alfa tubulina de longitud completa o el ADNc de G3PDH usando un oligo de vector 5': ZC14.063 (SEC ID N°: 48) y un cebador de oligo específico de alfa tubulina 3' ZC17.574 (SEC ID N°: 49) o cebador de oligo específico de G3PDH 3' ZC17.600 (SEC ID N°: 50); y (3) se envió una muestra a secuenciación para comprobar la posible contaminación del ADN ribosómico o mitocondrial. El panel se estableció en un formato de 96 pocillos que incluía una muestra de control positiva para ADN genómico de ratón (Clontech, Palo Alto, CA). Cada pocillo contenía aproximadamente 0,2-100 pg/µl de ADNc. La PCR se preparó

ES 2 377 188 T3

- 5 usando oligos ZC38.065 (SEC ID N°: 51) y ZC38.068 (SEC ID N°: 52), TaKaRa Ex Taq™ (TAKARA Shuzo Co LTD, Biomedicals Group, Japón), y colorante Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). La amplificación se realizó como se indica a continuación: 1 ciclo a 94 °C durante 5 minutos; 5 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 30 segundos; 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, seguido de 1 ciclo a 72 °C durante 5 minutos. Aproximadamente 10 µl del producto de reacción de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa convencional usando un gel de agarosa al 4 %. El tamaño correcto del fragmento de ADN previsto se observó en cerebro, células CD90+, dendríticas, embriones, MEWt#2, línea celular de próstata Tuvak, glándula salivar, piel y testículo.
- 10 El fragmento de ADN para piel y testículo se escindió y se purificó usando un Kit de Extracción de Gel (Qiagen, Chatsworth, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se confirmaron por secuenciación para demostrar que efectivamente eran zcytor17 de ratón.

Tabla 6

Tejido/Línea celular	Nº de muestras		Tejido/Línea celular	Nº de muestras
229	1			
7F2	1			
Adipocitos-Amplificados	1			
aTC1.9	1			
Cerebro	4			
CCC4	1			
CD90+ Amplificado	1			
OC10B	1			
Dendrítica	1			
Embrión	1			
Corazón	2			
Riñón	3			
Hígado	2			
Pulmón	2			
MEWt#2	1			
P388D1	1			
Páncreas	1			
Placenta	2			
Línea celular de Próstata-Jakotay	1			
Línea celular de Próstata-Nelix	1			
Línea celular de Próstata-Paris	1			
Línea celular de Próstata-Torres	1			
Línea celular de Próstata-Tuvak	1			
Glándula Salivar	2			
Músculo Esquelético	1			
Piel	2			
Intestino Delgado	1			
Músculo Liso	2			
Bazo	2			

ES 2 377 188 T3

Tejido/Línea celular	Nº de muestras		Tejido/Línea celular	Nº de muestras
Estómago	1			
Testículo	3			
Timo	1			

Ejemplo 27Expresión de zcytor17 Humano en Diversos Tejidos Usando RT/PCR Cuantitativa en Tiempo RealA. Cebadores y Sondas para zcytor17 humano, OSMRbeta y Zcytor17lig para RT-PCR Convencional y Cuantitativa

Previamente se ha descrito la RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM 7900 (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) (Véase, Heid, C.A. y col., Genome Research 6:986-994, 1996; Gibson, U.E.M. y col., Genome Research 6:995-1001, 1996; Sundaresan, S. y col., Endocrinology 139:4756-4764, 1998). Este procedimiento incorpora el uso de una sonda específica de gen que contiene colorantes fluorescentes indicadores e inactivadores. Cuando la sonda está intacta, la emisión de colorante indicador se anula debido a la proximidad del colorante inactivador. Durante la extensión de PCR usando cebadores directos e inversos específicos de genes adicionales, la sonda se escinde por la actividad nucleasa 5' de la Taq polimerasa que libera el colorante indicador de la sonda dando como resultado un aumento en la emisión de fluorescencia.

Los cebadores y sondas usados para los análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real de la expresión de Zcytor17 humano, OSMRbeta y Zcytor17lig se diseñaron usando el software de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Se diseñaron cebadores para Zcytor17 humano que incluían una unión intrón-exón para eliminar la posible amplificación del ADN genómico. El cebador directo, ZC37.877 (SEC ID N°: 53) y el cebador inverso, ZC37.876 (SEC ID N°: 54) se usaron en una reacción PCR a una concentración 200 nM para sintetizar un producto de 73 pb. La sonda Zcytor17TaqMan® correspondiente, denominada ZC37.776 (SEC ID N°: 55) se sintetizó y marcó por PE Applied Biosystems y se usó en cada reacción PCR a una concentración de 200 nM. La sonda ZC37.776 (SEC ID N°: 55) se marcó en el extremo 5' con un colorante fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un colorante indicador fluorescente (6-carboxi-tetrametilrodamina) (TAMRA) (Epoch Biosciences, Bothell, WA).

Se diseñaron cebadores para OSMRbeta humana que incluían una unión intrón-exón para eliminar la posible amplificación del ADN genómico. El cebador directo, ZC43.891 (SEC ID N°: 122) y el cebador inverso ZC43.900 (SEC ID N°: 123) se usaron en una reacción PCR (indicada a continuación) a una concentración 200 nM. La sonda TaqMan® de OSMRbeta correspondiente, denominada ZC43.896 (SEC ID N°: 124) se sintetizó y marcó por PE Applied Biosystems y se usó en cada reacción PCR a una concentración de 200 nM. La sonda ZC43.896 (SEC ID N°: 124) se marcó en el extremo 5' con un colorante fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un colorante inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences).

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

Como control para ensayar la integridad y calidad de las muestras de ARN ensayadas, todas las muestras de ARN se exploraron con respecto al ARNr o GUS usando series de cebador y sonda pedidas a PE Applied Biosystems (kit de ARNr) o diseñadas internamente (GUS). El kit de ARNr contenía el cebador directo (SEC ID N°: 56), el cebador inverso de ARNr (SEC ID N°: 57), y la sonda TaqMan® de ARNr (SEC ID N°: 58). La sonda de ARNr se marcó en el extremo 5' con un colorante fluorescente indicador VIC (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con el colorante fluorescente inactivador TAMRA (PE Applied Biosystems). Los cebadores y sonda de GUS se generaron internamente y se usaron en cada reacción PCR a 200 nM y 100 nM, respectivamente. El cebador directo fue ZC40.574 (SEC ID N°: 128) y el cebador inverso fue ZC40.575 (SEC ID N°: 129). La sonda de GUS ZC43.017 (SEC ID N°: 130) se marcó en el extremo 5' con un colorante fluorescente indicador (Yakima-Yellow) (Epoch Biosciences) y en el extremo 3' con un colorante inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). Los resultados del ARNr y GUS también sirven como control endógeno y permiten la normalización de los resultados de expresión de ARNm de Zcytor17 vistos en las muestras de ensayo.

Para la RT-PCR no cuantitativa convencional, se diseñaron cebadores usando el software de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores de zcytor17 humano generan un producto de aproximadamente 1000 pares de bases y son los siguientes: cebador directo ZC28.917 (SEC ID N°: 83), y cebador inverso ZC28.480 (SEC ID N°: 131). Los cebadores de OSMRbeta humano generan un producto de 202 pares de bases y son los siguientes: cebador directo ZC41.653 (SEC ID N°: 132) y cebador inverso ZC41.655 (SEC ID N°: 133). Los cebadores de Zcytor17lig humano generan un producto de 305 pares de bases y son los siguientes: cebador directo ZC41.703 (SEC ID N°: 134) y cebador inverso ZC41.704 (SEC ID N°: 135).

B. Cebadores y Sondas para Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig murinos para RT-PCR Convencional y Cuantitativa

Los cebadores y sondas usados para los análisis de RT-PCR cuantitativa de tiempo real de la expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig se diseñaron usando el software de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores para Zcytor17 murino se diseñaron de forma que incluyeran una unión intrón-exón para eliminar la posible amplificación del ADN genómico. El cebador directo, ZC43.272 (SEC ID N°: 136) y el cebador inverso, ZC43.273 (SEC ID N°: 137) se usaron en las reacciones PCR (indicadas a continuación) a una concentración 300 nM. La sonda TaqMan® de Zcytor17 correspondiente, denominada ZC43.478 (SEC ID N°: 138) se sintetizó y marcó por PE Applied Biosystems. La sonda ZC43.478 (SEC ID N°: 138) se marcó en el extremo 5' con un colorante fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un colorante fluorescente inactivador (6-carboxi-tetrametilrodamina) (TAMRA) (PE Applied Biosystems). La sonda ZC43.478 (SEC ID N°: 138) se usó en las reacciones PCR a una concentración de 100 nM.

Los cebadores para Zcytor17lig murino se diseñaron de manera que incluyeran una unión intrón-exón para eliminar la posible amplificación del ADN genómico. El cebador directo, ZC43.278 (SEC ID N°: 139) y el cebador inverso ZC43.279 (SEC ID N°: 140) se usaron en las reacciones PCR a una concentración 500 nM. La sonda TaqMan® de Zcytor17lig correspondiente, denominada ZC43.276 (SEC ID N°: 141) se sintetizó y marcó por PE Applied Biosystems. La sonda ZC43.478 (SEC ID N°: 138) se marcó en el extremo 5' con el colorante fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un colorante inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). La sonda ZC43.276 (SEC ID N°: 141) se usó en las reacciones PCR (indicadas a continuación) a una concentración de 200 nM.

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

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

Para la RT-PCR semicuantitativa convencional, se diseñaron cebadores usando el software de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems). Los cebadores de Zcytor17 murino generan un producto de 276 pares de bases y son los siguientes: cebador directo ZC43.140 (SEC ID N°: 151), y cebador inverso ZC43.139 (SEC ID N°: 152). Los cebadores de OSMRbeta murino generan un producto de 575 pares de bases y son los siguientes: cebador directo ZC41.608 (SEC ID N°: 153) y cebador inverso ZC41.609 (SEC ID N°: 154). Los cebadores de Zcytor17lig murino generan un producto de 657 pb y son los siguientes: cebador directo ZC41.502 (SEC ID N°: 155) y cebador inverso ZC41.500 (SEC ID N°: 156).

C. Protocolos para RT-PCR Cuantitativa en Tiempo Real y RT-PCR Semicuantitativa Convencional

Los niveles relativos de ARNm de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig se determinaron analizando muestras de ARN total usando el procedimiento de RT-PCR de una etapa (PE Applied Biosystems). Se aisló ARN total de células BHK (murinas) o células BAF (humanas) transfectadas con Zcytor17 y OSMRbeta por procedimientos convencionales y se usaron para generar una curva patrón usada para la cuantificación de Zcytor17 y OSMRbeta. La curva consistía en diluciones seriadas de 10 veces que variaban de 100 a 0,01 ng/μl analizándose cada punto de la curva patrón por triplicado. De forma similar, para Zcytor17lig, se usó ARN de linfocitos T CD4+ activados (que se ha demostrado previamente que fabrican Zcytor17lig) para generar una curva patrón en el mismo intervalo de 100 a 0,01 ng/μl. El ARN total de las células humanas o murinas se analizó por triplicado con respecto a los niveles de transcrito de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig humanos o murinos y con respecto a uno de los siguientes genes de control

endógenos: ARNr, GUS o receptor de transferrina. En un volumen total de 10 µl, cada muestra de ARN se sometió a una reacción de RT-PCR de una etapa que contenía: aproximadamente 50-100 ng de ARN total en mezcla maestra 2X preformulada que contenía un colorante de control interno (ROX) (carboxi-x-rodamina) y ADN Polimerasa Thermo-Start® (Abgene, Surrey, RU); cebadores apropiados para el gen de interés (véanse las partes A y B del presente ejemplo); la sonda apropiada (véanse las partes A y B para la concentración); transcriptasa inversa Superscript® (50 U/µl) (PE Applied Biosystems), y un volumen apropiado de agua sin RNasa. Las condiciones de los ciclos térmicos de PCR fueron las siguientes: una etapa inicial de transcripción inversa (RT) de un ciclo a 48 °C durante 30 minutos; seguido de una etapa de activación enzimática Thermo-Start® de un ciclo a 95 °C durante 10 minutos; seguido de 40 ciclos de amplificación a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los niveles relativos de ARN de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig se determinaron usando el procedimiento de curva patrón como se describe por el fabricante, PE Biosystems (User Bulletin n° 2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation de Gene Expression, 11 de diciembre de 1997) Las mediciones de ARNr, GUS o Receptor de Transferrina se usaron para normalizar los niveles del gen de interés.

Las reacciones de RT-PCR semicuantitativas usaron el "Superscript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq" (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada reacción de 25 µl consistía en lo siguiente: 12,5 µl de Tampón de Reacción 2X, 0,5 µl (20 pmol/µl) de cebador directo, 0,5 µl (20 pmol/µl) de cebador inverso, 0,4 µl de mezcla de RT/Taq polimerasa, 5,0 µl de Tampón de Carga de Gel Rediload (Invitrogen), 5,1 µl de agua sin RNasa y 1,0 µl de ARN total (100 ng/µl). La amplificación se realizó como se indica a continuación: un ciclo a 45 °C durante 30 minutos seguido de 35-38 ciclos de 94 °C, 20 segundos; temperatura de templado variable (véase la Tabla 7 mostrada a continuación), 20 segundos; 72 °C, 45 segundos; y después terminando con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. De ocho a diez microlitros del producto de reacción PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa convencional usando un gel de agarosa al 2 %

Tabla 7

Zcytor17 murino	Temperatura de templado 58 °C
OSMRbeta murino	Temperatura de templado 60 °C
Zcytor 17lig murino	Temperatura de templado 52 °C
Zcytor17 humano	Temperatura de templado 55 °C
OSMRbeta humano	Temperatura de templado 59 °C
Zcytor17lig humano	Temperatura de templado 59 °C

25 D. Aislamiento de ARN a partir de Líneas Celulares y Subseries de PBMC Humanas y Murinas

Se extrajo sangre de varios donantes anónimos y se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando la metodología de gradiente de Ficoll. Después se aislaron los monocitos usando el Kit de Aislamiento de Monocitos y el Sistema Magnético de Separación de Células (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Los monocitos después se cultivaron en placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja en medio sin endotoxina. Se estimularon o se trataron con IFN γ humano recombinante (R&D Systems Inc.) a 10 ng/ml. Las células se recogieron a 24 y 48 horas. De una manera similar, se aislaron linfocitos T CD4+ y CD8+ a partir de PBMC usando las perlas magnéticas anti-CD4 o anti-CD8 de Miltenyi Biotec. Las células después se activaron durante 4 o 16 horas en placas de cultivo de tejidos revestidas con 0,5 µg/ml de anticuerpos anti-CD3 en medio que contenía 5 µg/ml de anticuerpos anti-CD28. También se aislaron células NK a partir de PBMC usando perlas magnéticas revestidas con anti-CD5 de Miltenyi. Algunas de las células NK se recogieron a tiempo cero para el ARN y otras se cultivaron en medios que contenían Forbol Miristato Acetato (PMA) (5 ng/ml) e ionomicina (0,5 µg/ml) durante 24 horas. Además, se recogieron varias líneas celulares parecidas a monocitos humanos, U937, THP-1 y HL-60 en estado de reposo o activado. Las células U937 se activaron durante una noche con PMA (100 ng/ml). Las HL-60 se activaron durante una noche con PMA (10 ng/ml) o durante 72 y 96 horas con IFN γ (10 ng/ml) para dirigir las a una ruta monocítica. Las células THP-1 se activaron durante una noche con una combinación de LPS (10 ng/ml) e IFN γ (10 ng/ml). Se preparó ARN a partir de todas las células primarias usando el Kit RNeasy Midiprep™ (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Se retiró el ADN restante usando el kit DNA-Free™ (Ambion, Inc., Austin, TX). La concentración de ARN se determinó usando espectrofotometría convencional y la calidad del ARN se determinó usando el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

45 Se recogió ARN de linfocitos T murinos usando diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Se aislaron linfocitos T CD4+ y CD8+ esplénicos primarios a partir de los bazo de ratones C57B1/6 usando perlas magnéticas revestidas de anticuerpo y el Sistema Magnético de Separación de Células de Miltenyi Biotec. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ después se activaron cultivando las células en placas de 24 pocillos revestidas con anticuerpos anti-CD3 (500 ng/ml) en medio que contenía anticuerpos anti-CD28 a 5 µg/ml. Las células se recogieron para el ARN a 0, 4 y 50 16 horas. De forma similar, se aislaron linfocitos T CD4+ y después se desviaron hacia un fenotipo Th1 o Th2

usando el siguiente protocolo. Como los linfocitos T C57B1/6 ya se están desviados en la dirección Th1, todo lo que se necesitaba era activar durante 6 horas con 0,5 µg/ml de PMA y 10 ng/ml de ionomicina. La desviación a "Th2" se obtuvo cultivando linfocitos T CD4+ vírgenes con 2,5 µg/ml de anti-CD28, 10 ng/ml de mIL-2 (R&D Systems Inc.) y 25 ng/ml de mIL-4 (R&D Systems) en placas revestidas con 0,5 µg/ml de anti-CD3. Después de dos días en cultivo, las células se resuspendieron en medio que contenía 10 ng/ml de mIL-2 (R&D Systems) y 25 ng/ml de mIL-4. Las células se cultivaron durante tres días más y después se activaron con PMA e ionomicina durante 6 horas.

Se obtuvo una serie adicional de linfocitos T desviados a Th1 y Th2 usando la línea de linfocitos T DO11.10 transgénica para el Receptor de Linfocitos T. Todas las células se cultivaron en placas revestidas con anti-CD3 y anti-CD28. Las células "Th-1" se cultivaron en medio que contenía mIL-12 (1 ng/ml) y anti-IL-4 (10 µg/ml). Las células "Th2" se cultivaron en medio que contenía mIL-4 (10 ng/ml) y anti-IFNγ (10 µg/ml). Después de 24 horas, todos los cultivos recibieron mIL-2 (10 ng/ml). Después de dos días más, se cambió el medio de las células y se añadió nuevo medio que contenía las citocinas mencionadas anteriormente y las células se cultivaron 4 días más antes de recogerse.

Todo el ARN de linfocitos T murinos se preparó usando el Kit RNeasy Midiprep™ (Qiagen) y se retiró el ADN contaminante usando el kit DNA-free™ kit de Ambion.

E. Aislamiento de ARN a partir de Modelos Murinos de Pancreatitis y Enfermedad de Intestino Irritable

Para inducir un estado similar a la Enfermedad de Intestino Irritable (EII) humana, se usó la cepa de ratón híbrida C57B16/129S6F1. Se dividieron ratones en 4 grupos con un tamaño medio de seis ratones por grupo. El grupo 1 no recibió Dextran Sulfato Sódico (DSS) y se sacrificó el día 14. El grupo 2 recibió DSS al 2 % durante dos días antes del sacrificio. El grupo 3 recibió DSS al 2 % durante siete días antes del sacrificio. El grupo 4 recibió DSS al 2 % durante siete días, después se dejó que los ratones se recuperaran durante siete días y se sacrificaron el día 14. El día del sacrificio, se retiraron secciones de colon distal y se pusieron en RNA^{later}™ (Ambion). Las secciones de colon se homogeneizaron usando técnicas convencionales y el ARN se aisló usando el Kit RNeasy Midiprep™ (Qiagen). El ADN contaminante se retiró por tratamiento con DNA-free™ (Ambion) según las instrucciones del fabricante.

En un estudio diferente, se indujo pancreatitis aguda en ratones CD-1 macho por inyección de caeruleína. Los ratones se dividieron en tres grupos (n = 8 ratones/grupo). Los animales del grupo 1 recibieron siete inyecciones i.p. (1 inyección por hora) de vehículo (solución salina) y después se sacrificaron 12 y 24 horas después de la primera inyección. Los grupos 2 y 3 recibieron siete inyecciones i.p. de caeruleína (Sigma) (nº de catálogo C-9026) a una dosis de 50 µg/kg/h durante seis horas (1 inyección por hora). El grupo 2 se sacrificó 12 horas después de la primera inyección y el grupo 3 se sacrificó 24 horas después de la primera inyección. Se retiraron los páncreas en el momento del sacrificio y se congelaron inmediatamente para el aislamiento del ARN. Los tejidos se homogeneizaron y el ARN se aisló usando el Kit RNeasy Midiprep™ de Qiagen.

En otro estudio, se generaron ratones transgénicos para Zcytor17lig murino y se observaron los cambios fenotípicos (véase el Ejemplo 41). Se observó una piloerección y pérdida de pelo en muchos de los ratones transgénicos. Se sacrificaron cuatro ratones transgénicos y se retiraron muestras de piel de áreas normales y sin pelo y se congelaron inmediatamente para un aislamiento posterior del ARN. También se recogieron secciones de piel de dos ratones de control no transgénicos. Las muestras de piel se homogeneizaron y después se digirieron con Proteinasa K (Qiagen) (nº de catálogo 19133) durante 20 minutos a 60 °C. Después se aisló el ARN usando el Kit RNeasy Midiprep™ de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN sobrante se retiró usando el kit DNA-free™ de Ambion.

F. Resultados de RT-PCR Cuantitativa y Semicuantitativa para Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig Humanos

La expresión de Zcytor17 y OSMRbeta se examinó por RT-PCR cuantitativa en cuatro series de monocitos humanos primarios que estaban en estado de reposo o activados con IFNγ durante 24 o 48 horas. La expresión de Zcytor17 estaba por debajo de la detección en las células infraestimuladas, pero aumentaba espectacularmente después de la activación de 24 horas con IFNγ, y era máxima después de 48 horas de activación. En todos los casos, OSMRbeta estaba por debajo de la detección. En estas muestras no se ensayó Zcytor17lig.

En los linfocitos T primarios, Zcytor17 estaba por debajo de la detección en las subseries de CD4+ y CD8+ en reposo. Después de una activación de cuatro horas, sin embargo, la expresión de Zcytor17 se elevó en las dos subseries y después se redujo a un nivel ligeramente menor en el punto de tiempo de 16 horas. OSMRbeta estuvo por debajo de la detección en estas muestras. La expresión de Zcytor17lig se examinó usando RT-PCR semicuantitativa. No se detectó expresión en los linfocitos CD4+ y CD8+ no estimulados. Sin embargo, después de la activación de cuatro horas, se detectaron altos niveles de Zcytor17lig. Este nivel se redujo en alguna medida en el punto de tiempo de 16 horas.

No se examinó la expresión de Zcytor17 en células NK. OSMRb estaba por debajo de la detección en estas muestras. La expresión de Zcytor17lig estaba por debajo de la detección en las células NK en reposo, sin embargo hubo una débil señal generada por las células NK activadas que sugería que estas células pueden fabricar Zcytor17lig en ciertas condiciones.

5 En las líneas celulares similares a monocitos humanos, U937, THP-1 y HL-60, la expresión de OSMRbeta estaba por debajo de la detección en todas las muestras en reposo y activadas con la excepción de las muestras de THP-1 activadas en las que se detectó una señal débil. La expresión de Zcytor17 fue alta en las líneas celulares en reposo U937 y THP-1 y mostró una fuerte regulación positiva después de la activación. La expresión en las células U937 fue la mayor de cualquier tipo celular. En las células HL-60, Zcytor17 se expresaba a niveles moderados en las células no estimuladas y se redujo después de la estimulación con PMA. Sin embargo, la expresión de Zcytor17 estaba regulada positivamente de forma espectacular en las células HL-60 cuando se estimulaban con IFNg durante 72 y 96 horas. Todos los datos de expresión en humanos se resumen en la Tabla 8 proporcionada a continuación.

Tabla 8

Monocitos Humanos Primarios	Estado de Activación	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17lig
Monocitos Humanos	No estim.	-	-	
Monocitos Humanos	Act. 24 h IFNg	+	-	
Monocitos Humanos	Act. 48 h IFNg	++	-	
CD4+ Humana	No estim.	-	-	-
CD4+ Humana	Act. 4 h	++	-	++
CD4+ Humana	Act. 16 h	+	-	+
CD8+ Humana	No estim	-	-	-
CD8+ Humana	Act. 4 h	++	-	++
CD8+ Humana	Act. 16 h	+	-	+
Células NK Humanas	No estim.		-	-
Células NK Humanas	Act. 24 h		-	+
U937	No estim.	++	-	-
U937	Act. 16 h	+++	-	-
THP-1	No estim.	++	-	-
THP-1	Act. 16 h	+++	+	-
HL-60	No estim.	++	-	-
HL-60	Act. 16 h PMA	+	-	-
HL-60	Act. 72 h IFNg	+++	-	-
HL-60	Act 96 h IFNg	+++	-	-

10

G. Resultados de RT-PCR Cuantitativa y Semicuantitativa para Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig Murinos

15 Se examinaron los niveles de expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig murinos en varias poblaciones de linfocitos T murinos y los resultados se resumen en la Tabla 9 proporcionada a continuación. La expresión de Zcytor17 murino se ensayó por RT-PCR semicuantitativa y mostró estar a bajos niveles en linfocitos T CD4+ primarios activados y en reposo. La expresión de Zcytor17 se detectó en linfocitos T CD8+ en reposo y después parecía reducirse tras la activación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en los puntos de tiempo de 4 y 16 horas. La expresión de OSMRbeta se midió por RT-PCR cuantitativa y mostró expresarse en linfocitos T CD4+ y CD8+ activados y en reposo. La expresión de OSMRbeta se elevó después de una activación de 4 horas y después volvió a los niveles no estimulados a las 16 horas en los linfocitos T CD4+ y CD8+. Se detectó Zcytor17lig por RT-PCR

20 cuantitativa y mostró expresarse a niveles muy bajos en linfocitos T CD4+ no estimulados. Sin embargo, después de una activación de 4 horas, la expresión de Zcytor17lig se reguló positivamente de forma espectacular y después se redujo ligeramente en el punto de tiempo de 16 horas. En linfocitos T CD8+, no se detectó Zcytor17lig en las células no estimuladas. Hubo alguna expresión de Zcytor17lig en el punto de tiempo de 4 horas, pero a las 16 horas los niveles de expresión se habían reducido por debajo de la detección.

25 En los linfocitos T DO11.10, se detectó expresión de Zcytor17 en las células vírgenes y desviadas a Th2, pero no en las células desviadas a Th1. La expresión de OSMRbeta estaba a bajos niveles en las células DO11.10 vírgenes. Hubo un aumento espectacular en los niveles de expresión de OSMRbeta en las células desviadas a Th1 y un aumento moderado de la expresión en las células desviadas a Th2. La expresión de Zcytor17lig en estas células mostró ser predominantemente por la subserie desviada Th2. Se detectaron bajos niveles en la subserie Th1 y no se

30 detectó expresión en las células vírgenes. Estos resultados se resumen en la Tabla 9 proporcionada a continuación.

En los linfocitos T CD4+ primarios que se desviaron en la dirección Th1 o Th2, no se examinó Zcytor17. Se detectó expresión de OSMRbeta en las tres muestras, encontrándose los mayores niveles en la muestra Th2. De forma similar a los resultados de DO11.10, se detectó expresión de Zcytor17lig a altos niveles en la subserie desviada a Th2, detectándose una pequeña cantidad en la subserie Th1 y los niveles estaban por debajo de la detección en las células no estimuladas. Estos resultados se resumen en la Tabla 9 proporcionada a continuación.

5

Tabla 9

Linfocitos T Murinos	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17lig
Linfocitos T CD4+ No estimulados	+	+	+/-
Linfocitos T CD4+ 4 h de Activación	+	++	++
Linfocitos T CD4+ 16 h de Activación	+	+	+
Linfocitos T CD8+ No estimulados	+	+	-
Linfocitos T CD8+ 4 h de Activación	+/-	++	+
Linfocitos T CD8+ 16 h de Activación	-	+	-
DO11.10 Virgen	+	+	-
DO11.10 Th1	-	+++	+
DO11.11 Th2	+	++	++
Linfocitos T CD4+ No estimulados		++	-
Linfocitos T CD4+ Desviados Th1		+++	+
Linfocitos T CD4+ Desviados Th2		++	+++

En las muestras de piel transgénica de Zcytor17lig, los niveles de expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig se determinaron usando RT-PCR cuantitativa. Se mostró que Zcytor17 estaba presente en todas las muestras a niveles aproximadamente equivalentes. Hubo niveles espectacularmente superiores de expresión de OSMRbeta en los animales de control no transgénicos en comparación con las muestras transgénicas. La expresión de Zcytor17lig estaba por debajo de la detección en los animales de control no transgénicos con niveles de expresión de moderados a elevados en los animales transgénicos. Los resultados se resumen en la Tabla 10 proporcionada a continuación.

10

15

Tabla 10

Zcytor17lig Murino Piel Transgénica	Fenotipo de piel	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17lig
Ratón de Tipo Silvestre	Normal	+	+++	-
Ratón de Tipo Silvestre	Normal	+	+++	-
Transgénico nº 1	Normal	+	+	+
Transgénico nº 1	Pérdida de Pelo	+	+	+
Transgénico nº 2	Normal	+	+	+
Transgénico nº 2	Pérdida de Pelo	+	+	+
Transgénico nº 3	Normal	+	+	+
Transgénico nº 3	Pérdida de Pelo	+	+	+
Transgénico nº 4	Normal	+	+	+++
Transgénico nº 4	Pérdida de Pelo	+	+	+++

En un experimento diferente, se midieron los niveles de expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig por RT-PCR cuantitativa en el páncreas de ratones sometidos a pancreatitis aguda. La expresión de Zcytor17 estaba por debajo de la detección en todas las muestras. Se observó expresión de OSMRbeta a bajos niveles en las muestras de control normales (Grupo 1), pero mostró una fuerte regulación positiva en punto de tiempo de 12 horas (Grupo 2) y niveles ligeramente menores en el punto de tiempo de 24 horas (Grupo 3). La expresión de Zcytor17lig estaba por debajo de la detección en los animales de control, pero mostró altos niveles en los dos grupos inyectados con caeruleína. Los datos se resumen en la Tabla 11 proporcionada a continuación.

20

25

Tabla 11

Modelo de Pancreatitis	Descripción	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17lig
Grupo 1	Control Normal	-	+	-
Grupo 2	12 h Después de la Inyección	-	+++	++
Grupo 3	24 h Después de la Inyección	-	++	++

En otro experimento, se examinaron los niveles de expresión de Zcytor17 y OSMRbeta en el colon distal de ratones sometidos a tratamiento con DSS. En este modelo murino de enfermedad inflamatoria intestinal, los niveles de expresión de los dos genes se determinaron por RT-PCR cuantitativa y se resumen en la Tabla 12 proporcionada a continuación. Los niveles de expresión de Zcytor17 aumentaron con la gravedad de la enfermedad, con bajos niveles de expresión en los animales normales del Grupo 1 y cantidades crecientes en los Grupos 2 y 3. En los animales del Grupo 4, los niveles de Zcytor17 habían vuelto a niveles más normales. A diferencia de la expresión de Zcytor17, los niveles de OSMRbeta fueron los máximos en los animales de control y los niveles realmente se redujeron en los tres grupos tratados con DSS.

Tabla 12

MODELO EII	Descripción	Día SAC	Zcytor17	OSMRbeta
Grupo 1	Control Normal	14	+	++
Grupo 2	Tratados con DSS 2 días	2	++	+
Grupo 3	Tratados con DSS 7 días	7	+++	+
Grupo 4	Tratados con DSS 7 días	14	+	+

Ejemplo 28

Expresión de Distribución Tisular de Zcytor17lig Humano basada en el Análisis RT-PCR de ADNc de Primera Cadena de Múltiples Tejidos

La expresión génica de zcytor17lig se examinó usando paneles de ADNc de primera cadena de múltiples tejidos normalizados disponibles en el mercado (OriGene Technologies, Inc. Rockville, MD; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Estos incluían el panel "Human Tissue Rapid-Scan™ Panel" de OriGene (nº de cat CHSCA-101, que contiene 22 tejidos diferentes, médula ósea y leucocitos de sangre y plasma) y el panel "Human Blood Fractions MTC™ Panel" de BD Biosciences Clontech (nº de cat. K1428-1, que contiene 9 fracciones de sangre diferentes).

Las reacciones PCR se establecieron usando los cebadores oligo específicos de zcytor17lig ZC41.458 (SEC ID Nº: 60) y ZC41.457 (SEC ID Nº: 61), que produjeron un producto de 139 pb, y ZC41.459 (SEC ID Nº: 62) y ZC41.460 (SEC ID Nº: 63), que produjeron un producto de 92 pb, HotStarTaq ADN polimerasa de Quiagen y tampón (Qiagen, Inc., Valencia, CA), dH₂O, y colorante RediLoad™ (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). Las condiciones de los ciclos de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de 15 minutos de desnaturalización a 95 °C, 35 ciclos de desnaturalización de 45 segundos a 95 °C, 1 minuto de templado a 53 °C o 56 °C y 1 minuto y 15 segundos de extensión a 72 °C, seguido de un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72 °C. Las reacciones se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (EM Science, Gibbstown, NJ) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

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

Se observó un fragmento de AND del tamaño correcto en las siguientes fracciones de sangre humana usando el panel "Human Blood Fractions MTC™+ Panel" de BD Biosciences Clontech: células mononucleares activadas (linfocitos B y T y monocitos), células CD8+ activadas (T-supresor/citotóxico), células CD4+ activadas (T-auxiliar/inductor) y débilmente en las células CD8+ en reposo.

Ejemplo 29

Clonación del receptor de la Oncostatina M humano

El receptor de la Oncostatina M beta (OSMRbeta) es un receptor de citocina de tipo I con similitud estructural a IL-12R-B2. ZcytoR17 tiene similitud estructural con IL12R - B1. Los receptores OSMRbeta y zcytor17 se ensayaron para ver si podían interactuar como subunidades en un complejo de señalización de citocinas, y si conjuntamente podrían actuar como receptor de señalización, o antagonista de receptor soluble, para zcytor17lig.

Para aislar OSMRbeta, se diseñaron cebadores de PCR oligonucleotídicos ZC39982 (SEC ID Nº: 64) y ZC39983

(SEC ID N°: 65) para amplificar la región codificante de longitud completa de la secuencia de ADNc de la Oncostatina M beta humana (SEC ID N°: 6) (Genbank, N° de Acceso U60805; Mosley B, JBC Volumen 271, Número 50, Edición de 20 de diciembre de 1996, páginas 32635-32643).

5 Se realizaron reacciones PCR en una serie de moldes de biblioteca de ADNc usando una polimerasa sólida, Advantage II (Clontech, PaloAlto, CA), para identificar una fuente del ADNc. El ADN molde usado procedía de bibliotecas de plásmidos de ADNc amplificadas que contenían, cada una, 5 millones de clones de ADNc independientes. Las reacciones se realizaron siguiendo las instrucciones de fabricante usando 400 fmol/ μ l de cada oligonucleótido y 2-20 ng/ μ l de ADN de biblioteca de plásmido purificado como molde. Las bibliotecas de ADNc procedían de los siguientes tejidos y líneas celulares humanas: cerebro fetal, músculo liso de próstata, médula ósea, RPMI1588, tiroides, WI-38, testículo, células mononucleares de sangre periférica estimuladas, células CD3+ estimuladas, THP-1, amígdala activada, HACAT e hígado fetal. Las reacciones se realizaron en una máquina de ciclos térmicos usando las siguientes condiciones: 30 ciclos de 95 °C durante 20 segundos, 68 °C durante 3 minutos. Al final de los 30 ciclos, se realizó un ciclo de extensión individual adicional de 8 minutos a 68 °C. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de TAE agarosa en presencia de bromuro de etidio seguido de iluminación UV. Se observó que el producto más abundante procedía de una biblioteca de ADNc de músculo liso de próstata. La reacción PCR usando molde de músculo liso de próstata y oligonucleótidos ZC39982 (SEC ID N°: 64) y ZC39983 (SEC ID N°: 65) se repitió usando una ADN polimerasa termoestable menos sólida pero de mayor fidelidad "turboPfu" (Stratagene, La Jolla, CA). Se realizaron treinta ciclos de amplificación con las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C, 30 segundos, templado a 63 °C 45 segundos, extensión a 72 °C 3,5 minutos. Se purificó en gel una sola banda de producto en un gel de TAE, agarosa al 0,8 %.

Este ADN después se amplificó de nuevo usando cebadores ZC39980 (SEC ID N°: 66) y ZC39981 (SEC ID N°: 67) diseñados para incluir secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción para permitir la clonación de este ADNc en un vector de expresión de mamífero.

25 La reacción PCR se realizó usando "TurboPfu" y el producto de PCR purificado durante 15 ciclos de 95 °C 1 minuto, 64 °C 1 minuto 20 segundos, 72 °C 4,5 minutos. La reacción PCR después se digirió con EcoRI y XhoI (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se purificó en gel como se ha descrito anteriormente. Se preparó un vector de expresión de mamífero, pZ7NX por digestión con EcoRI y XhoI y el producto de PCR se ligó a este vector y se introdujo por electroporación en células *E. coli* DH10b. Se aislaron varias colonias bacterianas y se secuenciaron. Un clon era correcto con la excepción de una sola mutación no conservativa. Para cambiar esta base para que correspondiera a la secuencia esperada, se usó mutación de sustitución de un oligonucleótido y un sitio de restricción PstI extraño en una reacción PCR con "TurboPfu" usando el plásmido pZP7Nx-h de Oncostatina M R previamente secuenciado como molde. El ADN amplificado por PCR se digirió con PstI y XhoI y se clonó de nuevo en el plásmido pZP7Nx-h de Oncostatina M R en lugar del fragmento PstI/XhoI que contenía la mutación ofensiva. Este nuevo plásmido se secuenció en la región PstI a XhoI recientemente amplificada para confirmar la corrección y asegurarse de que no se creaban otros errores en el proceso de amplificación. Este análisis confirmó la secuencia de que correspondía a la secuencia esperada en la región codificante. La secuencia se muestra en la SEC ID N°: 6 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 7.

Ejemplo 30

Construcciones para Generar un Heterodímero de Zcytor17/receptor de Oncostatina M (OSMRbeta) Humano

40 En la técnica se conoce un sistema para la construcción, expresión y purificación de dichos receptores heterodiméricos solubles y se ha adaptado al par de receptores receptor de oncostatina M humano (OSMRbeta) y zcytor17 humano. Para esta construcción, el polinucleótido para el receptor soluble OSMRbeta se muestra en la SEC ID N°: 68 y el polipéptido correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 69; y el polinucleótido para el receptor soluble zcytor17 humano se muestra en la SEC ID N°: 70 y el polipéptido correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 71.

50 Para construir una línea celular que expresa un heterodímero hzcytor17 soluble/OSMRbeta humano secretado, se realizó una construcción de forma que el receptor soluble heterodimérico resultante comprendiera el dominio extracelular de OSMRbeta humano fusionado a la cadena pesada de la IgG gamma1 (Fc4) (SEC ID N°: 37) con un marcador Glu-Glu (SEC ID N°: 35) en el extremo C; mientras que el dominio extracelular de zcytoR17 se fusionó a Fc4 (SEC ID N°: 37) con un marcador His (SEC ID N°: 72) en el extremo C. Para los dos brazos de hzcytor17 y OSMRbeta humano del heterodímero, se obtuvo por ingeniería genética un espaciador Gly-Ser de 12 aminoácidos (SEC ID N°: 73) entre la parte extracelular del receptor y el extremo N de Fc4.

A. Construcción de OSMRbeta/Fc4-CEE soluble humano

55 Para la construcción de la parte OSMRbeta/Fc4-CEE soluble humana del heterodímero, se aisló la parte extracelular de OSMRbeta humano usando PCR con oligos ZC14063 (SEC ID N°: 48) y ZC41557 (SEC ID N°: 74) en las condiciones de reacción PCR siguientes: 30 ciclos de 95 °C durante 60 seg, 57 °C durante 30 seg y 72 °C durante 100 seg; y 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR se purificaron usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick (Qiagen), se digirieron con EcoRI y BglIII (Boehringer-Mannheim), se separaron por electroforesis en gel y se

purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen).

El casete de expresión, el esqueleto del plásmido y la parte del marcador Fc4-GluGlu de la quimera estaban contenidos dentro de un vector plasmídico interno fabricado previamente. El vector plasmídico se digirió con EcoRI y BamHI (Boehringer-Mannheim), los fragmentos se separaron por electroforesis en gel y se purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). Los fragmentos digeridos y purificados del plásmido que contenía OSMRbeta humano y Fc4-cEE se ligaron entre sí usando ADN ligasa de T4 (Life Technologies, Bethesda, MD) usando procedimientos de ligamiento convencionales. Se exploraron minipreps del ligamiento resultante con respecto a una inserción EcoRI/SmaI del tamaño correcto (772 pb) para el OSMRbeta soluble y las minipreps positivas se secuenciaron para confirmar con exactitud la reacción PCR. Esta nueva construcción de plásmido se denomina ZP9-ONCOMR-Fc4CEE.

B. Construcción de Zcytor17/Fc4-CHIS soluble humano

Para la construcción de la parte hzcytor17/Fc4-CHIS del heterodímero, la parte extracelular de zcytor17 humano se aisló por digestión de un plásmido que contenía previamente el receptor soluble Zcytor17-Fc4. El plásmido primero se digirió con Sall (New England Biolabs, Beverly, MA), después de lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN digerido después se trató con ADN Polimerasa de T4 (Boehringer-Mannheim), para rellenar los salientes 5' creados por la digestión con Sall, dejando romos los extremos de ADN, después de lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN de extremos romos después se digirió adicionalmente con BglII para cortar en el extremo 3', se separó por electroforesis en gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN resultante que contenía la secuencia codificante del dominio extracelular de zcytoR17 se ligó a un vector de expresión de mamífero que contenía el marcador Fc4-CHIS, preparado como se indica a continuación.

El casete de expresión, el esqueleto del plásmido y la parte del marcador Fc4-CHIS de la quimera estaban contenidos dentro de un vector plasmídico interno fabricado previamente. Este vector plasmídico se digirió con EcoRI (Boehringer-Mannheim), después de lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN digerido después se trató con ADN Polimerasa de T4 (Boehringer-Mannheim), para rellenar los salientes 5' creados por la digestión con EcoRI, dejando romos los extremos del ADN, después de lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN de extremos romos después se digirió adicionalmente con BamHI (Boehringer-Mannheim) para cortar el extremo 3', se separó por electroforesis en gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). Los fragmentos digeridos y purificados del plásmido que contenía zcytor17 y Fc4-CHIS se ligaron entre sí usando ADN Ligasa de T4 (Life Technologies, Bethesda, MD) usando procedimientos de ligamiento convencionales.

Se exploraron minipreps del ligamiento resultante por PCR usando el cebador con sentido específico de zcytor17 ZC29180 (SEC ID N°: 22) y el cebador antisentido específico de Fc4 ZC29232 (SEC ID N°: 75) con las siguientes condiciones de las reacciones PCR: 30 ciclos de 94 °C durante 60 seg, 68 °C durante 150 seg; y 72 °C durante 7 min. Un tamaño esperado del producto de 846 pb confirmó el montaje correcto del plásmido denominado pZEM228 hzcytor17/Fc4HIS.

Se creó una segunda construcción zcytor17-Fc4 para su uso en la generación de la proteína homodimérica en células COS. En resumen, la región codificante de la proteína de fusión completa se aisló por digestión de un plásmido que previamente contenía receptor soluble Zcytor17-Fc4 con Sall (Boehringer-Mannheim). La reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN digerido después se trató con ADN Polimerasa de T4 (Boehringer-Mannheim) para rellenar los salientes 5' creados por la digestión con EcoRI, dejando romos los extremos del ADN, después de lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN de extremos romos después se digirió adicionalmente con NotI (Boehringer-Mannheim) para cortar en el extremo 3', se separó por electroforesis en gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). Un vector de expresión de mamífero que contenía un casete de expresión dirigido por CMV se digirió para generar extremos compatibles y los dos fragmentos se ligaron entre sí. Se exploraron minipreps del ligamiento resultante por PCR usando el cebador con sentido específico del vector ZC14063 (SEC ID N°: 48) y el cebador antisentido específico de zcytor17 ZC27899 (SEC ID N°: 19) con las siguientes condiciones de reacción PCR: 30 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 64 °C durante 30 seg; 70 °C durante 90 seg; y 72 °C durante 7 min. Un tamaño de producto esperado de aproximadamente 1000 pb confirmó el ensamblaje correcto del plásmido denominado pZP7NX-hzcytor17-Fc4. Este plásmido posteriormente se introdujo por transfección en células COS usando Lipofectamine (Gibco/BRL) según las instrucciones del fabricante. Las células se acondicionaron durante 60 horas en DMEM + FBS al 5 % (Gibco/BRL), después de lo cual la proteína se purificó sobre una columna de cromatografía de proteína G-sepharose 4B y se puso a disposición de los bioensayos *in vitro*, por ejemplo, tales como los descritos en la presente memoria.

C. Generación del receptor Zcytor17 Oncostatina M (OsmRbeta) humano

Se introdujeron por cotransfección aproximadamente 16 µg de pZP9-ONCOMR=Fc4CEE y pZEM228 hzcytor17/Fc4HIS en células BHK-570 (ATCC N° CRL-10314) usando lipofectamine (Gibco/BRL) según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron durante 10 días en DMEM + FBS al 5 %

(Gibco/BRL) que contenía 0,5 mg/ml de G418 (Gibco/BRL) y metiltrexato (MTX) 250 nM (Sigma, St. Louis, MO) durante 10 días.

5 El grupo resultante de células doblemente seleccionadas se usó para generar la proteína heterodimérica. Se usaron tres fábricas celulares (Nunc, Dinamarca) de este grupo para generar 10 l de medio acondicionado sin suero. Este medio acondicionado se pasó en una columna de 1 ml de proteína A y se eluyó en (10) fracciones de 750 microlitros. Se descubrió que cuatro de estas fracciones tenían la mayor concentración y se reunieron y dializaron (límite de PM 10 kD) frente a PBS. El complejo de proteína heterodimérico zcytor17/OSMRbeta soluble se aisló a partir de otros componentes del medio pasando el grupo sobre una columna de níquel y lavando la columna con diversas concentraciones de imidazol. La proteína zcytor17/OSMRbeta soluble eluyó a concentraciones intermedias de imidazol, mientras que el homodímero hzcytor17/Fc4HIS eluyó a mayores concentraciones de imidazol.

Ejemplo 31

Distribución Tisular de zcytor17 Humano en Paneles de Tejido Usando Transferencia de Northern y PCR

A. Distribución Tisular de zcytor17 Humano Usando Transferencia de Northern

15 Se sondaron manchas de transferencia de Northern de múltiples tejidos humanos (manchas de transferencia I y II de MTN de carril 12 humano y mancha de transferencia II de MTN de sistema inmune humano; MTN de tejido endocrino humano, transferencia II de MTN de tejido fetal humano, matriz de múltiples tejidos humanos) (Clontech) así como manchas de transferencia internas que contenían diversos tejidos, para determinar la distribución tisular de la expresión de zcytor17 humano. Las manchas de transferencia preparadas internamente incluían los siguientes ARNm de tejidos y líneas celulares: células SK-Hep-1, células THP1, Glándula suprarrenal (Clontech); Riñón (Clontech), Hígado (Clontech e Invitrogen); Médula espinal (Clontech), Testículo (Clontech), Linfocitos T CD4+ humanos, Linfocitos T CD8+ humanos, linfocitos T CD19+ humanos, reacción mixta de linfocitos humanos (MLR), línea celular THP1 (ATCC N° TIB-202), línea celular U937, línea celular de linfoblastos de ratón p388DI (ATCC N° CCL-46) con o sin estimulación por ionomicina; y línea celular de pulmón embrionario humano WI-38 (ATCC N° CRL-2221) con o sin estimulación por ionomicina.

25 Se amplificó una sonda obtenida por PCR de aproximadamente 500 pb para zcytor17 (SEC ID N°: 4) usando oligonucleótidos ZC28.575 (SEC ID N°: 77) y ZC27.899 (SEC ID N°: 19) como cebadores. La amplificación por PCR se realizó como se indica a continuación: 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante un minuto y 72 °C durante un minuto; seguido de un ciclo a 72 °C durante 7 minutos. El producto de PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa y el producto de PCR de aproximadamente 500 pb se purificó en gel como se describe en el presente documento. La sonda se marcó radiactivamente usando el kit de marcaje de cebador aleatorio PRIME IT II™ (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna de presión NUCTRAP™ (Stratagene). Se usó solución EXPRESSHYB™ (Clontech) para la prehibridación y como solución de hibridación para las transferencias de Northern. La prehibridación se realizó a 68 °C durante 2 horas. La hibridación se realizó durante una noche a 68 °C con aproximadamente 1,5X10⁶ cpm/ml de sonda marcada. Las manchas de transferencia se lavaron tres veces a temperatura ambiente en SSC 2X, SDS al 0,05 % seguido de un lavado durante 10 minutos en SSC 2X, SDS al 0,1 % a 50 °C. Se observaron varias bandas débiles después de una exposición de varios días. Se observó un transcrito de aproximadamente 9 kb en tráquea, músculo esquelético y timo; se observó un transcrito de aproximadamente 2 kb en células PBL, HPV, U937 y THP-1; y se observó un transcrito de aproximadamente 1,2 kb en placenta, médula ósea y tiroides, y en células HPV y U937. En todos los tejidos indicados anteriormente, la intensidad de la señal fue débil. Parecía haber poca expresión en la mayoría de los tejidos normales, lo que sugiere que la expresión de zcytor17 puede ser dependiente de la activación de las células o tejidos en los que se expresa.

B. Distribución Tisular en paneles de tejidos usando PCR

45 Se exploró un panel de ADNc de tejidos humanos con respecto a la expresión de zcytor17 usando PCR. El panel se realizó internamente y contenía 94 muestras de ADNc marathon y muestras de ADNc de diversas líneas celulares y tejidos humanos normales y cancerosos y se muestra en la Tabla 13 presentada a continuación. Los ADNc procedían de bibliotecas internas o de ADNc marathon procedente de preparaciones de ARN internas, ARN de Clontech o ARN de Invitrogen. Los ADNc marathon se fabricaron usando el kit marathon-Ready™ (Clontech, Palo Alto, CA), se sometieron a ensayos de CC con cebadores de clatrina ZC21195 (SEC ID N°: 78) y ZC21196 (SEC ID N°: 79) y después se diluyeron basándose en la intensidad de la banda de clatrina. Para asegurar la calidad de las muestras del panel, se realizaron tres ensayos de control de calidad (CC): (1) para evaluar la calidad del ARN usado para las bibliotecas, los ADNc internos se ensayaron con respecto al tamaño medio del inserto por PCR con oligos del vector que eran específicos para las secuencias de vector para una biblioteca de ADNc individual; (2) la estandarización de la concentración del ADNc en las muestras del panel se consiguió usando procedimientos de PCR convencionales para amplificar la alfa tubulina de longitud completa o ADNc de G3PDH usando un oligo de vector 5' ZC14.063 (SEC ID N°: 48) y un cebador oligo específico de alfa tubulina 3' ZC17.574 (SEC ID N°: 49) o el cebador oligo específico de G3PDH 3' ZC17.600 (SEC ID N°: 50); y (3) se envió una muestra a secuenciación para comprobar la posible contaminación con ADN ribosómico o mitocondrial. El panel se preparó en un formato de 96 pocillos que incluía una muestra de control positivo de ADN genómico humano (Clontech, Palo Alto, CA). Cada

- 5 pocillo contenía aproximadamente 0,2-100 pg/μl de ADNc. Las reacciones de PCR se prepararon usando oligos ZC26.358 (SEC ID N°: 80) y ZC26.359 (SEC ID N°: 81), TaKaRa Ex Taq™ (TAKARA Shuzo Co LTD, Biomedicals Group, Japón), y colorante Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). La amplificación se realizó como se indica a continuación: un ciclo a 94 °C durante 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 66,3 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, seguido de un ciclo a 72 °C durante 5 minutos. Aproximadamente 10 μl del producto de reacción de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa convencional usando un gel de agarosa al 4 %. Se observó el tamaño del fragmento de ADN previsto correcto en ganglio linfático, próstata, tiroides, HPV (epitelio de próstata), HPVS (epitelio de próstata, seleccionado), tumor de pulmón, reacciones de tumor de útero, junto con la reacción de ADN genómico.
- 10 Los fragmentos de ADN para el tejido de próstata (2 muestras), HPV (epitelio de próstata), HPVS (epitelio de próstata, seleccionado), y genómico se escindieron y purificaron usando un kit de extracción en gel (Qiagen, atsworth, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se confirmaron por secuenciación para mostrar que efectivamente eran zcytor17.

Tabla 13

Tejido/ línea celular	Nº de muestras	Tejido/ línea celular	Nº de muestras
Glándula suprarrenal	1	Médula ósea	3
Vejiga	1	Cerebro fetal	3
Médula ósea	1	Islote	2
Cerebro	1	Próstata	3
Cuello del útero	1	RPMI N° 1788 (ATCC N° CCL-156)	2
Colon	1	Testículo	4
Cerebro fetal	1	Tiroides	2
Corazón fetal	1	WI38 (ATCC N° CCL-75)	2
Riñón fetal	1	ARIP (ATCC N° CRL-1674 - rata)	1
Hígado fetal	1	HaCat - queratinocitos humanos	1
Pulmón fetal	1	HPV (ATCC N° CRL-2221)	1
Músculo fetal	1	Glándula suprarrenal	1
Piel fetal	1	SM de próstata	2
Corazón	2	PBMC seleccionadas CD3+ estimuladas con ionomicina + PMA	1
K562(ATCC N° CCL-243)	1	HPVS (ATCC N° CRL-2221) - seleccionadas	1
Riñón	1	Corazón	1
Hígado	1	Pituitaria	1
Pulmón	1	Placenta	2
Ganglio linfático	1	Glándula salivar	1
Melanoma	1	HL60 (ATCC N° CCL-240)	3
Páncreas	1	Plaqueta	1
Pituitaria	1	HBL-100	1
Placenta	1	Mesangial renal	1

(continuación)

Tejido/ línea celular	Nº de muestras		Tejido/ línea celular	Nº de muestras
Próstata	1		Linfocito T	1
Recto	1		Neutrófilo	1
Glándula salivar	1		MPC	1
Músculo esquelético	1		Hut-102 (ATCC N° TIB-162)	1
Intestino delgado	1		Endotelial	1
Médula espinal	1		HepG2 (ATCC N° HB-8065)	1
Bazo	1		Fibroblasto	1
Estómago	1		E. Histo	1
Testículo	2			
Timo	1			
Tiroides	1			
Tráquea	1			
Útero	1			
Tumor esofágico	1			
Tumor gástrico	1			
Tumor renal	1			
Tumor hepático	1			
Tumor de pulmón	1			
Tumor de ovario	1			
Tumor rectal	1			
Tumor de útero	1			

C. Análisis de expresión de zcytor17 por PCR y Northern

- 5 La anotación de los tipos celulares y las condiciones de crecimiento que afectan a la expresión del receptor es un medio útil para esclarecer su función y predecir una fuente de ligando. Para este fin, se inspeccionaron una amplia diversidad de tejidos y tipos celulares por PCR. Se usó la polimerasa termoestable Advantage II™ (Clontech, La Jolla, CA) con los cebadores oligonucleotídicos ZC29.180 (SEC ID N°: 22) y ZC29.179 (SEC ID N°: 82) y 1-10 ng de los diversos moldes de ADNc indicados más adelante para 30 ciclos de amplificación de (94 °C, 30 seg.; 66 °C, 20 seg.; 68 °C, 1 min. 30 seg.). Después de esto, se realizó un 20 % de cada reacción en geles de agarosa al 0,8 %, TAE/ bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. Después, las muestras se evaluaron basándose en la intensidad de las bandas. Véase la Tabla 14 mostrada a continuación.
- 10

Tabla 14

Células y Condiciones	Puntuación 0-5
Hel estimulada con PMA	0
U937	3
MCF-7	0
HuH7	1
Folículo humano	0
HT-29	0
HEPG2	0
HepG2 estimulada con IL6	0
Endotelio dérmico humano	0
Endotelio venoso humano	0
CD4+ humana	0
BEWO	0
CD19+ humana	1
PBMC humana estimulada con PHA, PMA, Ionomicina, IL2, IL4, TNF α 24horas	0
PBMC humana estimulada con LPS, PWM, IFN γ , TNF α , 24 horas	0
Todas las PBMC humana de las condiciones anteriores durante 48 horas	4
HUVEC p.2	4
RPN1788	0
TF1	0
Linfocitos T de bazo de mono estimulados con PMA, Ionomicina	0
Epitelio de próstata humana transformada con HPV	5
Amígdala humana inflamada	0
HACAT	0
Condrocito humano	1
Sinoviocito humano	1
THP1	5
REH	0

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

- 5 Estas dos líneas celulares junto con una línea de epitelio de próstata se seleccionaron para análisis adicionales por transferencia de Northern. Los intentos previos de visualizar un transcrito por análisis de Northern usando ARNm de diversos tejidos produjeron señales débiles y difusas en el intervalo de tamaño sorprendentemente grande de 7-10 kb, haciendo que este dato sea difícil de interpretar. Se preparó un gel desnaturante de formaldehído/MOPS/agarosa al 0,8 % (RNA Methodologies, Farrell, RE Academic Press) y se pusieron 2 μ g de

polyA+ ARNm para cada muestra junto con una escalera de ARN (Life Technologies, Bethesda, MD). El gel después se transfirió a nylon Hybond (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), se sometió a entrecruzamiento UV y se hibridó en solución ExpressHyb (Clontech, La Jolla, CA) a 68 °C durante una noche usando una sonda para zcytoR17 humano generada por PCR con los oligos ZC28.575 (SEC ID N°: 77), y ZC27.899 (SEC ID N°: 19) y se marcó con el kit Megaprime ³²P (Amersham). La mancha de transferencia de Northern posteriormente se lavó con SSC 4,2X + SDS al 0,1 % a 65 °C durante 15 minutos y se expuso a la película durante 7 días con pantallas de intensificación. Se observó una banda prominente de 8 kb tanto en el epitelio de próstata como en los carriles de U937 mientras que estaba presente una banda más débil en el carril de THP1.

Para optimizar el ADNc usado como sonda de hibridación, se amplificaron cuatro regiones diferentes de la secuencia de zcytoR17 humano de longitud completa por PCR, se marcaron y se hibridaron como se ha descrito anteriormente con manchas de transferencia de southern que contenían ADN de la biblioteca de ADNc genómica y amplificadas. Las cuatro sondas, denominadas en el presente documento sondas A-D, se amplificaron usando los siguientes pares de cebadores: (A) ZC28.575 (SEC ID N°: 77), ZC27.899 (SEC ID N°: 19); (B) ZC27.895 (SEC ID N°: 20), ZC28.917 (SEC ID N°: 83); (C) ZC28.916 (SEC ID N°: 84), ZC28.918 (SEC ID N°: : 85); y (D) ZC28.916 (SEC ID N°: 84), ZC29.122 (SEC ID N°: 21). El ADN genómico humano junto con las bibliotecas de ADNc amplificadas demostraron contener zcytoR17 por PCR y se digirieron con EcoR1 y Xho1 para liberar insertos y se procesaron en geles de TAE/agarosa al 0,8 %, por duplicado, se desnaturalizaron con NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M, se transfirieron a Hybond, se sometieron a entrecruzamiento UV y cada uno hibridó con una sonda distinta. Se observó que la sonda B tenía la menor unión no específica y la señal más fuerte. De esta manera, la sonda B se usó para todas las hibridaciones posteriores.

Dado que las células THP1 son un excelente modelo de monocitos circulantes y expresaban zcytoR17 a bajos niveles, se trataron con diversos compuestos con la intención de aumentar la expresión de zcytoR17. Las células se cultivaron a una densidad de 2X10⁵/ml, se lavaron y se resuspendieron en diversos medios de estimulación, se cultivaron durante cuatro o treinta horas y se recogieron para las preparaciones de ARN. Cada medio se suplementó con uno de los siguientes fármacos o pares de citocinas: LPS 2 ug/ml (Sigma Chemicals, St. Louis, MO), hTNFa2 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hGM-CSF 2 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hIFN γ 50 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hMCSF 1 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hIL6 1 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hIL1 β 2 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hIFN γ 50 ng/ml + hIL4 0,5 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), hIFN γ 50 ng/ml + hIL10 1 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), PMA 10 ng/ml (Calbiochem, SanDiego, CA) y un control no tratado. Al final del periodo de cultivo se preparó ARN total usando un kit RNAeasy Midi (Qiagen, Valencia, CA). Se seleccionó el ARN poli A+ a partir del ARN total usando un kit MPG (CPG, Lincoln Park, NJ). Dos ug de ARN poli A+ de cada condición se procesaron en geles de formaldehído/MOPS/agarosa, se transfirieron a nylon y se sometieron a entrecruzamiento UV como se ha descrito anteriormente. Estas manchas de transferencia de Northern después se hibridaron, como se ha indicado anteriormente, con la sonda B a 68 °C durante una noche, se lavaron a alta rigurosidad con SSC 0,2X, SDS al 0,1 % a 65 °C, se expusieron a una película durante una noche y después se expusieron a pantallas de fósforo para la cuantificación de la señal. En todos los carriles se observó un ARNm de 8 kb dominante así como una banda de 2,8 kb relativamente más débil. Se observó un aumento de 20 veces en el ARNm de zcytoR17 en el ARN de las células tratadas con hIFN γ durante 30 horas, y este efecto se mutó ligeramente con tratamiento simultáneo con IL4. Se observaron aumentos minoritarios de 3 veces en el ARNm en el ARN procedente de células tratadas con LPS, TNF α y GM-CSF, mientras que el MCSF, IL6 e IL1 β no tuvieron ningún efecto sobre los niveles de ARNm de zcytoR17. Estos datos sugieren un papel para el receptor zcytoR17 y su ligando en la biología de los monocitos y macrófagos y, por extensión, en varios procesos de enfermedad en los que participan estas células.

Ejemplo 32

Distribución Tisular de zcytor17lig humano en Paneles de Tejidos Usando Transferencia de Northern y PCR

Se obtuvo un fragmento de ADNc de zcytor17lig humano usando PCR con cebadores específicos de genes: cebador con sentido ZC41438 (SEC ID N°: 93) y cebador antisentido ZC41438 (SEC ID N°: 93) y ADNc de zcytor17lig humano molde (SEC ID N°: 90). Este fragmento se purificó usando procedimientos convencionales y aproximadamente 25 ng se marcaron con ³²P alfa dCTP usando el kit de marcaje de cebadores aleatorio Prime-It RmT (Stratagene) y se hicieron hibridar en Ultrahyb, (Ambion) y se usaron para exponer la película Biomax/pantallas de intensificación según las recomendaciones del fabricante en cada caso. Se hicieron hibridar manchas de transferencia nuevas, no usadas previamente, incluyendo MTN de carril 12 humano de Clontech, MTN II de cerebro humano, y la mancha de transferencia IV de MTN de cerebro humano, MTN II de sistema inmune humano, y la matriz II de MTE humana, de Clontech, durante una noche a 42 °C según el procedimiento Ambion ultrahyb. Se eliminaron las cantidades radiactivas no específicas usando SSC 0,1/SDS al 0,5 % a 55 °C. Las manchas de transferencia positivas incluían MTN de carril 12 humano (Clontech). De los 12 tejidos examinados, sólo la placenta fue positiva para un transcrito de aproximadamente 1,2 kb.

Ejemplo 33

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

A. Construcción de zCyt17Lig-CEE/pZMP21

Se construyó un plásmido de expresión que contenía todo o parte de un polinucleótido que codificaba zcytor17Lig-CEE (SEC ID N°: 95) mediante recombinación homóloga. El plásmido se denominó zCyt17Lig-CEE/pZMP21.

5 La construcción de zCyt17Lig-CEE/pZMP21 se realizó generando un fragmento zCyt17Lig-CEE usando
amplificación por PCR. El molde de ADN usado para la producción del fragmento zCyt17Lig-CEE fue
zCyt17Lig/pZP7nx. Los cebadores usados para la producción del fragmento zCyt17Lig-CEE fueron: (1)
10 ZC41.607 (SEC ID N°: 97) (secuencia con sentido), que incluye desde el extremo 5' al extremo 3': 28 pb de la
secuencia flanqueante del vector (5' del inserto) y 21 pb correspondientes a la secuencia 5' de zCyt17Lig; y (2)
ZC41.605 (SEC ID N°: 98) (secuencia antisentido), que incluye desde el extremo 5' al extremo 3': 37 pb de la
15 secuencia flanqueante del vector (3' del inserto), 3 pb del codón de terminación, 21 pb que codifican un marcador EE
C-terminal, y 21 pb que corresponden al extremo 3' de la secuencia de zCyt17Lig. El fragmento resultante de la
amplificación por PCR anterior fue una copia del zCyt17Lig molde con la adición de un marcador EE C-terminal,
produciendo un producto final zCyt17Lig-CEE.

15 Las reacciones PCR se realizaron como se indica a continuación: A un volumen final de 100 µl se le añadieron: 10 µl
de tampón de reacción de Taq Polimerasa 10X con MgCl 15 mM (Gibco), 1 µl de Taq ADN polimerasa (5
unidades/µl (Gibco), 3 µl de dNTP 10 mM, 78 µl de dH₂O, 3 µl de una solución de reserva de 20 pmol/µl de cebador
ZC41.607 (SEC ID N°: 97), 3 µl de una solución de reserva de 20 pmol/µl de cebador ZC41.605 (SEC ID N°: 98) y 2
20 µl de una solución de reserva de 0,13 µg/µl de ADN molde de zCyt17lig. Se añadió un volumen igual a 50 µl de
aceite mineral a la mezcla. La reacción se calentó a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante
un minuto; 55 °C durante 2 minutos; 72 °C durante 3 minutos; seguido de una extensión de 10 minutos a 72 °C y
mantenimiento a 4 °C hasta que se recogió la reacción.

25 El plásmido pZMP21 se sometió a digestión de restricción con enzima BglII, se limpió con kit de purificación de PCR
QiaQuick (Qiagen) usando un protocolo de microcentrifuga y se usó para recombinación con el fragmento de PCR.
El plásmido pZMP21 se construyó a partir de pZMP20, que se construyó a partir de pZp9 (depositado en la
Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y se denomina N°
98668) con los elementos genéticos de levadura de pRS316 (depositado en la Colección Americana de Cultivos
30 Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y denominado N° 77145), un elemento IRES de
poliovirus y el dominio extracelular de CD8, truncado en el extremo carboxilo terminal del dominio transmembrana.
PZMP21 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de
MPSV, intrón de péptido señal de inmunoglobulina, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias
codificantes, un codón de terminación y un terminador de hormona de crecimiento humana. El plásmido también
tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador de selección de mamífero que tiene
un promotor, potenciador y origen de replicación de SV40, un gen de DHFR, el terminador de SV40, así como las
secuencias de URA3 y CEN-ARS necesarias para la selección y replicación en *S. cerevisiae*.

35 Se combinaron independientemente 50 µl de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con 100 ng de
plásmido de corte, 5 µl de mezcla de PCR descrita previamente, y se transfirieron a una cubeta de electroporación
de 0,2 cm. La mezcla de levadura/ADN se sometió a electropulsos a 0,75 kV (5 kV/cm) ∞ ohms, 25 µF. A cada
cubeta se le habían añadido 600 µl de sorbitol 1,2 M y la levadura se cultivó en un alícuota de 100 µl y una alícuota
40 de 300 µl sobre dos placas URA-D y se incubó a 30 °C. Después de aproximadamente 72 horas, los transformantes
de levadura URA+ de una sola placa se resuspendieron en 1 ml de H₂O y se centrifugaron brevemente para
sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 500 µl de tampón de lisis (Tritón X-100 al
2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Los 500 µl de la mezcla de lisis se añadieron a
un tubo Eppendorf que contenía 300 µl de perlas de vidrio de 600 µm lavadas con ácido y 300 µl de fenol-
45 cloroformo, se agitaron con vórtice durante intervalos de 1 minuto dos o tres veces, seguido de una centrifugación de
5 minutos en una centrífuga de Eppendorf a velocidad máxima. Trescientos microlitros de la fase acuosa se
transfirieron a un tubo limpio y el ADN se hizo precipitar con 600 µl de etanol (EtOH) al 100 % seguido de
centrifugación durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento de ADN después se lavó con 500 µl de EtOH al 70 %,
seguido de centrifugación durante 1 minuto a 4 °C. El sedimento de ADN se resuspendió en 30 µl de H₂O.

50 La transformación de células *E. coli* electrocompetentes (MC1061) se realizó con 5 µl de la preparación de ADN de
levadura y 50 µl de células MC1061. Las células se sometieron a electropulsos a 2,0 kV, 25 µF y 400 ohms (Ω).
Después de la electroporación, se añadieron 600 µl de SOC (Bacto Tryptone al 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de
levadura al 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM). Las células *E.*
coli sometidas a electroporación se cultivaron en una alícuota de 200 µl y 50 µl en dos placas de LB AMP (caldo LB
55 (Lennox), Bacto Agar al 1,8 % (Difco), 100 mg/l de Ampicilina). Las placas se incubaron en posición vertical durante
aproximadamente 24 horas a 37 °C. Se seleccionaron tres colonias resistentes a ampicilina aleatoriamente y se
enviaron para análisis de secuencia del inserto. Se aisló ADN plasmídico a gran escala a partir de un clon con la
secuencia confirmada usando el kit Qiagen Maxi (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

También se construyó un plásmido de expresión que contenía el polinucleótido entero que codificaba zCyt17Lig-CEE murino (SEC ID N°: 104 y SEC ID N°: 105) mediante recombinación homóloga usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 33A anterior. Los cebadores usados fueron: (1) ZC41643 (SEC ID N°: 105) (directo, 5' a 3', con sentido), que tenía un vector de 28 pb solapante en posición 5' del punto de inserción; 21 pb del extremo 5' de zcytor17lig(m) y (2) ZC41641 (SEC ID N°: 107) (inverso, 5' a 3', antisentido) que tenía un vector de 33 pb solapante en posición 3' del punto de inserción; codón de terminación de 3 pb; 21 pb de marcador EE C-terminal; 24 pb del extremo 3' de zCyt17Lig(m)-CEE. El plásmido se denominó zcytor17lig(m)-CEE/pZMP21. La secuencia polinucleotídica de zcytor17lig(m)-CEE se muestra en la SEC ID N°: 104 y la secuencia polipeptídica correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 105.

10 Ejemplo 34

Transfección y Expresión de Polipéptidos zcytor17lig-CEE

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

15 Se expresó ZCyt17lig-CEE de forma transitoria en células 293T (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, ATCC (SD-3515)) para generar la proteína purificada inicial. El día antes de la transfección, se sembraron células 293T a $6,5 \times 10^4$ células/cm² en 30 matraces de cultivo T162 con un volumen total de 30 ml de medio de cultivo (SL7V4 + FBS al 5 % + Pen/Estrep al 1 %) por matraz. Las células se dejaron incubar durante 24 horas a 37 °C.

20 Se preparó una mezcla de ADN/Liposomas como se indica a continuación: se rellenaron dos tubos cónicos de 50 ml con 25 ml de medio de transfección (SL7V4 + Pen/Estrep al 1 %) y se añadieron 1,13 mg de zCyt17Lig-CEE/pZMP21 (Ejemplo 33) a cada uno. Una serie separada de dos tubos cónicos de 50 ml se rellenó con 22 ml de medio de transfección (anterior) y se añadieron a cada uno 3 ml de liposomas (Lipofectamine, (Gibco)). Para cada serie de tubos, se añadió un tubo de ADN a un tubo de liposomas y la mezcla de ADN/liposomas se incubó durante 30 minutos. Los dos tubos cónicos de 50 ml que contenían las mezclas de AND/liposomas se reunieron (aproximadamente 100 ml) y se añadieron 300 ml de medio de transfección.

25 Los 30 matraces de las células 293T se decantaron, se lavaron una vez con aproximadamente 15 ml de PBS y se añadieron 12,5 ml de la mezcla de ADN/liposomas diluida a cada matraz. Los matraces se incubaron durante 3 horas a 37 °C. Después del periodo de incubación, se añadieron 25 ml de medio de cultivo (anterior) a cada matraz T162. El medio de transfección se recogió después de aproximadamente 96 horas y se usó para la purificación de proteínas (Ejemplo 35).

30 B. Expresión de zcytor17lig-CEE/pZMP21 humano en células BHK

35 Se produjo proteína zCyt17Lig de longitud completa en células BHK transfectadas con zCyt17Lig-CEE/pZMP21 (véase el Ejemplo 33 anterior). Se cultivaron células BHK 570 (ATCC CRL-10314) en matraces de cultivo de tejido T75 y se dejaron crecer hasta una confluencia de aproximadamente el 50 al 70 % a 37 °C, con un 5 % de CO₂, en medio de crecimiento (SL7V4, FBS al 5 %, pen/estrep al 1 %). Las células después se transfectaron con zCyt17Lig-CEE/pZMP21 por transfección mediada por liposomas (usando Lipofectamine™; Life Technologies), en medio sin suero (SF) (SL7V4). El plásmido (16 µg) se diluyó en tubos de 1,5 ml hasta un volumen final total de 640 µl con medio SF. Treinta y cinco microlitros de la mezcla de lípido se mezclaron con 605 µl de medio SF, y la mezcla resultante se dejó incubar aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 5 mililitros de medio SF a la mezcla de ADN:lípido. Las células se aclararon una vez con 10 ml de PBS, el PBS se decantó, y se añadió la mezcla de ADN:lípidos. Las células se incubaron a 37 °C durante cinco horas, y después se añadieron 40 15 ml de medio (SL7V4, FBS al 5 %, pen/estrep al 1 %) a cada placa. Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche y la mezcla de ADN:medio de lípidos se reemplazó por medio de selección (SL7V4, FBS al 5 %, pen/estrep al 1 %, metotrexato 1 µM) al día siguiente. Aproximadamente 10 días después de la transfección, se tripsinizaron colonias resistentes a metotrexato del matraz de transfección T75 y las células se reunieron y se cultivaron un matraz T-162 y se transfirieron a un cultivo a gran escala.

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

Se expresó zcytor17lig(m)-CEE de ratón de forma transitoria en células 293T como se describe en el Ejemplo 34A y se usó medio cultivado para la purificación de proteínas (Ejemplo 35).

Ejemplo 35

50 Purificación de Zcytor17lig-CEE a partir de células 293T

A menos que se indique otra cosa, todas las operaciones se realizaron a 4 °C. Se usó el siguiente procedimiento para purificar Zcytor17lig humano y de ratón que contenía marcadores Glu-Glu (EE) C-terminales (SEC ID N°: 103). Se purificó medio acondicionado a partir de células 293T que expresaban Zcytor17lig-CEE (Ejemplo 34). Las concentraciones totales de proteína diana del medio acondicionado se determinaron mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western con el anticuerpo anti-EE.

Se vertió una columna de 5,5 ml de anti-EE Poros 50 A (PE Biosystems), (Framingham, MA) (preparada como se describe más adelante) en una columna de vidrio Waters AP-1, 1 cm x 7cm (Waters, Milford MA). La columna se llenó y equilibró en un BioCad Sprint (PE BioSystems, Framingham, MA) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4. El medio acondicionado se ajustó con NaCl a 0,3 M y el pH se ajustó a 7,2. El medio acondicionado después se cargó en la columna durante una noche con un caudal de aproximadamente 3 ml/minuto. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna (VC) de PBS pH 7,4 y de nuevo se lavó con 3 VC de Sigma PBS 5X pH 7,4. Se eluyó por etapas con acetato 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 2,5 a 3 ml/minuto. Los tubos de las fracciones contenían 1 ml de base Tris (sin ajuste de pH) para neutralizar la elución inmediatamente. La columna se lavó de nuevo con 2 VC con Sigma PBS 5X, pH 7,4, para neutralizar la columna y después se equilibró en PBS (pH 7,4). Se recogieron fracciones de 2 ml durante la cromatografía de elución entera y se supervisó la absorbancia a 280 y 215 nm; también se guardaron la reserva de eluciones y la reserva de lavado y se analizaron. El PBS 5X y las fracciones pico de elución ácida se analizaron con respecto a la proteína diana por tinción con plata de SDS-PAGE y transferencia de Western con el anticuerpo primario anti-EE y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP. Las fracciones de elución ácida de interés se reunieron y se concentraron de 38 ml a 0,8 ml usando un concentrador de centrifugación de membrana con un límite de peso molecular de 5.000 Dalton (Millipore, Bedford, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para separar Zcytor7lig-CEE del material agregado y cualquier otra proteína de copurificación contaminante, las fracciones concentradas reunidas se sometieron a cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 75 (120 ml) (Farmacia, Piscataway, NJ) de 1,6 x 60 cm equilibrada y cargada en PBS a un caudal de 1,0 ml/min usando un BioCad Sprint. Se recogieron fracciones de 3 ml a lo largo de toda la cromatografía y se supervisó la absorbancia a 280 y 215 nm. Las fracciones pico se caracterizaron por tinción con plata de SDS-PAGE y sólo se reunieron las fracciones más puras. Este material representaba la proteína Zcytor7lig-CEE purificada.

En los geles de SDS-PAGE sometidos a transferencia de Western, tinción con azul de Coomassie y tinción con plata, el Zcytor7lig-CEE era una banda principal. La concentración de proteínas del material purificado se realizó por análisis BCA ((Pierce, Rockford, IL) y la proteína se repartió en alícuotas y se almacenó a -80 °C de acuerdo con procedimientos convencionales.

Para preparar anti-EE Poros A50, se lavó un volumen de lecho de 65 ml de Poros A50 (PE Biosystems) con 100 ml de agua y después trietanolamina 0,1 M, pH 8,2 (TEA, ICN, Aurora, Ohio), Na₂SO₄ 1 M, pH 8,8 que contenía azida sódica al 0,02 % usando una unidad de filtro de matraz al vacío. La solución de anticuerpo monoclonal EE, a una concentración de 2 mg/ml en un volumen de 300 ml, se mezcló con la resina lavada en un volumen de 250 ml. Después de una incubación durante una noche a temperatura ambiente, se retiró el anticuerpo no unido lavando la resina con 5 volúmenes de TEA 200 mM, Na₂SO₄ 1M, pH 8,8 que contenía azida sódica al 0,02 % como se ha descrito anteriormente. La resina se resuspendió en 2 volúmenes de TEA, Na₂SO₄ 1 M, pH 8,8 que contenía azida sódica al 0,02 % y se transfirió a un recipiente adecuado. Se añadieron 3 ml de Didisuccinimidil suberato a 25 mg/ml (68 mM) (en DMSO suministrado por Pierce, Rockford, IL) y la solución se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Después, los sitios no específicos en la resina se bloquearon por incubación durante 10 min a temperatura ambiente con 5 volúmenes de etanolamina 20 mM (Sigma, St. Louis, MO) en TEA 200 mM , pH 8,8 usando la unidad de filtro de matraz al vacío. La resina se lavó con PBS, pH 7,4, seguido de glicina 0,1 M, pH 3 y después se neutralizó con PBS 10X. Después de lavar con agua destilada, la resina anti-EE Poros-A 50 acoplada a final se almacenó a 4 °C en Etanol al 20 %.

Ejemplo 36

Secuenciación N-terminal de Zcytor17lig humano y de ratón

A. Secuenciación N-terminal de Zcytor17lig humano

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

Se suministró una muestra de Zcytor7lig-CEE purificada (Ejemplo 35). La muestra se cargó en un filtro de fibra de vidrio preparado para la secuenciación N-terminal. El filtro de fibra de vidrio se preparó por precipitado con Biobrene[™].

El análisis de la secuencia N-terminal del polipéptido Zcytor7lig humano secretado no verificaba el sitio de escisión previsto de la secuencia señal, pero dió como resultado un inicio maduro en el resto 27 (Leu) en la SEC ID N°: 2 de la secuencia precursora de zcytor17lig humano.

B. Secuenciación N-terminal de Zcytor17lig de ratón

Se realizó la secuenciación del polipéptido N-terminal automático convencional (degradación de Edman) usando reactivos de Applied Biosystems. El análisis de la secuencia N-terminal se realizó en un Sistema Secuenciador de Proteínas Modelo 494 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). El análisis de los datos se realizó con el Sistema

de Análisis de Datos Modelo 610A para Secuenciación de Proteínas, 2.1a (Applied Biosystems).

- Se suministró una muestra de zcytor17lig-CEE de ratón purificada según se capturó en perlas de Proteína G Sepharose/anti-EE (Ejemplo 35). Las perlas se pusieron en tampón de muestra de SDS PAGE reductor y en un baño de agua hirviendo antes de procesarse en SDS PAGE, usando un sistema SDS PAGE de Novex (Bis-Tris MES NuPAGE 4-12 %; Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El gel se electrotransfirió a una membrana Novex PVDF (Invitrogen), y se tiñó con azul de Coomassie (Sigma, St. Louis, MO) usando procedimientos convencionales. Se realizaron transferencias de Western anti-EE correspondientes para identificar la banda de Zcytor17lig para la secuenciación de la proteína N-Terminal. El anticuerpo de ratón anti-IgG EE conjugado con HRP usado se produjo internamente.
- 10 El análisis de la secuencia N-terminal del polipéptido zcytor17lig de ratón secretado verificó el sitio de escisión previsto de la secuencia señal, dando como resultado un inicio maduro a 31 (A1a) en referencia a las SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 91 de la secuencia precursora de zcytor17lig de ratón.

Ejemplo 37

Ensayo de unión a células Cos

- 15 Se usó un ensayo de unión para ensayar la unión de zcytor17lig a receptores que comprenden el receptor zcytor17, tales como el receptor zcytor17 o heterodímeros y trímeros del receptor que comprenden receptor zcytor17 (por ejemplo, zcytor17/OSMR, zcytor17/WSX-1, o zcytor17/OSMR/fVSX-1, u otras subunidades receptoras de citocinas de Clase I). Se introdujo por trasfección ADN plasmídico del receptor zcytor17 en células COS y las células COS transfectadas se usaron para evaluar la unión de zcytor17lig a receptores que comprenden el receptor zcytor17 como se describe más adelante.

A. Transfecciones de células COS

- La transfección de células COS se realizó como se indica a continuación: mezclar 800 ng de ADN plasmídico de receptor en las siguientes combinaciones: pZp7pX/zcytor17 solo; pZp7Z/WSX-1 solo; pZp7NX/OSMR solo; pZp7pX/zcytor17 + pZp7NX/OSMR; pZp7pX/zcytor17 + pZp7Z/WSX-1; pZp7NX/OSMR + pZp7Z/WSX-1; pZp7pX/zcytor17 + pZp7NX/OSMR + pZp7Z/WSX-1) y 4 μ l de Lipofectamine™ en 80 μ l de medio DMEM sin suero (55 mg de piruvato sódico, 146 mg de L-glutamina, 5 mg de Transferrina, 2,5 mg insulina, 1 μ g de selenio y 5 mg de fetuína en 500 ml DMEM), incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y después añadir 320 μ l de medio DMEM sin suero. Añadir estos 400 μ l de mezcla sobre 2×10^5 células COS/pocillo cultivadas en placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos (revestidas con fibronectina) e incubar durante 5 horas a 37 °C. Añadir 500 μ l de medio FBS DMEM al 20 % (100 ml de FBS, 55 mg de piruvato sódico y 146 mg de L-glutamina en 500 ml de DMEM) e incubar durante una noche.

B. Ensayo de unión

- El ensayo de unión se realizó como se indica a continuación: se retiró el medio de las células con PBS + BSA al 0,1 % y después las células se bloquearon durante 60 minutos con la misma solución. Las células después se incubaron durante 1 hora en PBS + BSA al 0,1 % con proteína purificada zcytor17ligCEE a 1,0 μ g/ml. Las células después se lavaron con PBS + BSA al 0,1 % y se incubaron durante otra hora con anticuerpo de ratón anti-GluGlu diluido 1:1000. De nuevo, las células se lavaron con PBS + BSA al 0,1 %, después se incubaron durante 1 hora con anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP diluido 1:200.

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

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

Ejemplo 38

Zcytor17lig de ratón activa al receptor zcytor17/OSMRbeta de ratón en el ensayo de luciferasa

A. Clonación de zcytor17 de ratón de longitud completa y OSMRbeta de ratón para la expresión

- 50 Se exploró una biblioteca de ADNc de testículo de ratón con respecto a un clon de longitud completa de zcytor17 de ratón. La biblioteca se cultivó a 65.500 ufc/placa en 24 placas de LB + Amp. Se prepararon elevaciones de filtro usando Hybond N (Amersham-Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) sobre un total de aproximadamente 1,6 millones de colonias. Los filtros se marcaron con una aguja caliente para la orientación y después se

desnaturalizaron durante 6 minutos en NaOH 0,5 M y Tris-HCl 1,5 M, pH 7,2. Los filtros después se neutralizaron en NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M, pH 7,2 durante 6 minutos. El ADN se fijó a los filtros usando un agente de entrecruzamiento UV (Stratalinker®, Stratagene, La Jolla, CA) a 1200 julios. Los filtros después se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente.

- 5 Al día siguiente, los filtros se prelavaron a 65 °C en tampón de prelavado que consistía en SSC 0,25X, SDS al 0,25 % y EDTA 1 mM. Los residuos celulares se retiraron manualmente usando Kimwipes® (Kimberly-Clark) y la solución se cambió 3 veces durante un periodo de 1 hora. Los filtros se secaron al aire y se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se necesitaron. Los filtros después se prehibridaron durante aproximadamente 3 horas a 63 °C en 20 ml de solución de hibridación ExpressHyb™ (Clontech, Palo Alto, CA).
- 10 La sonda B (Ejemplo 31) se generó por PCR a partir de molde de *zcytoR17* humano usando cebadores oligonucleotídicos ZC27.895 (SEC ID N°: 20) y ZC28.917 (SEC ID N°: 83) y se marcó radiactivamente con ³²P usando un kit disponible en el mercado (Megaprime DNA Labeling System; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna de presión Stratagene™ (columna NucTrap®; Stratagene, La Jolla, CA). La sonda se desnaturalizó a 100 °C durante 15 min y se añadió a ExpressHyb™. Los filtros se hibridaron en 15 ml de solución de hibridación que contenía 1,6 x 10⁶ cpm/ml de sonda a 63 °C durante una noche. Los filtros se lavaron a 55 °C en SSC 2X, SDS al 0,1 % y EDTA 1 mM y se expusieron a una película de rayos X a -80 °C durante 4 días y medio. Se seleccionaron 13 positivos de las placas como bloques y se pusieron en 1 ml de LB + amp en tubos de 1,7 ml. Los tubos se pusieron a 4 °C durante una noche. Estos 13 positivos se sometieron a dos vueltas más de purificación. Las placas terciarias se cultivaron a 37 °C, después se realizaron elevaciones de filtro y se seleccionaron colonias individuales y se enviaron a la secuenciación. Se determinó que tres de éstas contenían la secuencia del ortólogo de ratón de *zcytoR17*.

- Además, se generó un producto de PCR usando ADNc de CTLL-2 como molde y oligonucleótidos ZC38.239 (SEC ID N°: 108) y ZC38.245 (SEC ID N°: 109) como cebadores. CTLL-2 es una línea celular de linfocitos T citotóxicos de ratón (ATCC N° TTB-214). Esta reacción PCR se realizó como se indica a continuación: un ciclo a 95 °C durante 1 minuto, 30 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 68 °C durante 3 minutos, y después 68 °C durante 10 minutos; inmersión a 4 °C. La reacción PCR usó aproximadamente 0,5 ng de ADNc, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 µl de mezcla de polimerasa Advantage II (ClonTech). Aproximadamente un 6 % del producto de PCR se usó como molde en una nueva reacción PCR, como se ha indicado anteriormente, con la excepción de que se usaron los oligonucleótidos ZC38.239 (SEC ID N°: 108) y ZC38.238 (SEC ID N°: 110). Esta reacción PCR se realizó como se indica a continuación: 30 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 65 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 1 minuto, y después 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 10 °C. La mayor parte de la reacción PCR se cargó en un gel de agarosa al 1,0 % y se escindió la banda predominante a aproximadamente 360 pb, se eluyó el fragmento de ADN y se realizó la secuenciación de ADN.

- La secuencia del polinucleótido *zcytoR17* de ratón se muestra en la SEC ID N°: 111 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 112. Además, se muestra una forma soluble truncada del polinucleótido *zcytoR17* de ratón en la SEC ID N°: 113 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 114.

- Para obtener un ADNc de OSMRbeta de ratón de longitud completa, se aislaron productos de PCR 5' y 3' y se unieron usando un sitio BamHI interno. Los cebadores de PCR se diseñaron usando la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 119 e incluyen sitios de restricción EcoRI y XbaI para la clonación. La secuencia de ácido nucleico de OSMRbeta de ratón genómica se muestra en la SEC ID N°: 119, en la que la secuencia codificante incluye los restos 780 a 3692 que codifican un polipéptido de 970 aminoácidos OSMRbeta de ratón, que se muestra en la SEC ID N°: 120. En la SEC ID N°: 121 se muestra una secuencia de ácido nucleico degenerada que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 120.

- 45 Se generó un producto de PCR 5' usando una biblioteca de ADNc de 3T3-L1 (adipocito de ratón diferenciado) interna como molde y los oligonucleótidos ZC41.764 (SEC ID N°: 115) y ZC41.598 (SEC ID N°: 116) como cebadores. Esta reacción PCR 5' se realizó como se indica a continuación: 30 ciclos a 95 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 1 minuto y 30 segundos, y después 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 4 °C. La reacción PCR usó aproximadamente 3 µg de plásmido preparado a partir de la biblioteca de ADNc, 20 pmoles de cada oligonucleótido y cinco unidades de ADN polimerasa de *Pwo* (Roche). Aproximadamente un 90 % del producto de PCR 5' se digirió con EcoRI y BamHI y se purificó en un gel de agarosa al 1,0 %. La banda de aproximadamente 1446 pb se escindió y se usó para el ligamiento (véase más adelante).

- 55 Se generó un producto de PCR 3' usando una biblioteca de ADNc interna de placenta de ratón como molde y los oligonucleótidos ZC41.948 (SEC ID N°: 117) y ZC41.766 (SEC ID N°: 118) como cebadores. Esta reacción PCR 3' se realizó como se indica a continuación: 30 ciclos a 95 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 1 minuto y 30 segundos, y después 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 4 °C. La reacción de PCR usó aproximadamente 3 µg de plásmido preparado a partir de la biblioteca de ADNc, 20 pmoles de cada oligonucleótido y cinco unidades de ADN polimerasa de *Pwo* (Roche). Aproximadamente un 90 % del producto de PCR 3' se digirió con BamHI y XbaI y se purificó en un gel de agarosa al 1,0 %. La banda de aproximadamente 2200 pb se escindió y se usó para el ligamiento junto con el producto de PCR 5' (descrito anteriormente) al vector de expresión pZP-5Z

digerido con EcoRI y XbaI. El ligamiento de tres partes se realizó con el fragmento EcoRI a BamHI 5' anterior, el fragmento BamHI a XbaI 3' y el vector de expresión pZP-5Z digerido con EcoRI y XbaI. Esto generó un plásmido pZP-5Z que contenía un ADNc de longitud completa para OSMRbeta de ratón (nucleótidos 780 a 3692 de la SEC ID N°: 119), denominado pZP-5Z/OSMRbeta. El ADNc de OSMRbeta de ratón de longitud completa en pZP5Z/OSMRbeta tiene dos inserciones de aminoácidos de la SEC ID N°: 120. Hay una duplicación del aminoácido glicina en la posición 370 y una duplicación del aminoácido ácido Glutámico en la posición 526. El plásmido pZP-5Z es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de CMV, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes y un terminador de hormona de crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador de selección de mamífero que tiene un promotor, potenciador y origen de replicación de SV40, un gen de resistencia a zeocina y el terminador de SV40.

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

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

Se transfectaron líneas celulares BaF3/KZ134 and BHK/KZ134 estables (Ejemplo 20) con un plásmido de expresión que codificaba zcytor17 de ratón de longitud completa, pZP-7P/zcytor17m (Ejemplo 38A), para crear células BaF3/KZ134/zcytor17m y BHK/KZ134/zcytor17m, respectivamente. El plásmido de expresión de OSMRbeta de ratón, pZP-5Z/OSMRbetam (Ejemplo 38A), después se introdujo por transfección en estas células para crear líneas celulares BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam y BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam, respectivamente. Los procedimientos fueron como se describe en el Ejemplo 4 con la excepción de que BaF3/KZ134/zcytor17m y BHK/KZ134/zcytor17m se seleccionaron con, además de Geneticina, 2 ug/ml de puromicina mientras que BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam y BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam se seleccionaron con, además de Geneticina, 2 ug/ml de puromicina y 200 ug/ml de zeocina.

Los clones se diluyeron, se cultivaron y se seleccionaron usando técnicas convencionales. Los clones se seleccionaron por ensayo de luciferasa (véase el Ejemplo 20, anterior) usando el medio acondicionado de zcytor17lig de ratón o proteína zcytor17lig de ratón purificada (Ejemplo 35) como inductor. Se seleccionaron clones con la máxima respuesta de luciferasa (mediante luciferasa STAT) y el menor nivel de fondo. Se seleccionaron líneas celulares transfectantes adecuadas.

C. Zcytor17lig de ratón activa al receptor zcytor17 de ratón en el ensayo de luciferasa de BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam o BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam

Se cultivaron líneas celulares para ensayos de luciferasa como se describe en el Ejemplo 20 anterior. La activación STAT de las células BaF3/KZ134/Zcytor17m, BaF3/KZ13/zcytor17m/OSMRbetam, BHK/KZ134/zcytor17m, o BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbetam se evaluó usando (1) medio acondicionado de células BHK570 transfectadas con zcytor17lig humano (Ejemplo 7), (2) medio acondicionado de células BHK570 transfectadas con el zcytor17lig de ratón (Ejemplo 18), (3) zcytor17lig de ratón y humano purificado (Ejemplo 35), y (4) medio sin mL-3 para medir la respuesta del control con medio solo. Los ensayos de luciferasa se realizaron como se describe en el Ejemplo 20.

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

Ejemplo 39

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

La biotinylation de zcytor17L humano se realizó como se indica a continuación: se combinaron 100 µl de zcytor17 a 5,26 mg/ml con 30 µl de EZ-link Sulfo-NHS-LC-biotina a 10 mg/ml (Pierce, Rockford, IL) disuelto en ddH₂O. Esta solución se incubó en un agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la biotinylation, la solución se dializó en PBS usando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer.

Para ensayar las propiedades de unión de zcytor17lig humano a diferentes combinaciones de receptores, se transfectaron células BHK y BAF3 con plásmidos de expresión usando técnicas convencionales bien conocidas en este campo. Estos plásmidos se introdujeron por transfección en las dos líneas celulares en las siguientes combinaciones: zcytor17 solo, OSMRbeta solo y tanto zcytor17 como OSMRbeta. La transfección se realizó como se ha detallado anteriormente. Como controles se usaron células BHK y BAF3 no transfectadas. Las células se tiñeron por FACS como se indica a continuación: las células 2E5 se tiñeron con: 2,0 µg/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1,0 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml o 1,0 pg/ml de zcytor17L biotinilado o se dejaron sin teñir durante 30 minutos en hielo en tampón FACS (PBS + BSA al 2 % + NHS al 2 % (Gemini) + NGS al 2 %). Las células se lavaron 1,5 veces y después se tiñeron con SA-PE (Jackson Immuno Laboratories) a 1:250 durante 30 minutos en hielo. Después, las

células se lavaron 1,5 veces con tampón FACS y se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron por FACS en un BD FACSCaliber usando el software CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

- 5 Tanto las células BHK como las células BAF3 mostraron que zcytor17lig se unía a zcytor17 solo y en combinación con OSMRbeta, siendo la unión al heterodímero zcytor17/OSMRbeta ligeramente más fuerte. No se observó unión en líneas celulares que expresaban OSMRbeta solo. El zcytor17lig se unió de una manera dependiente de la concentración. Los valores de intensidad fluorescente media (MFI) para la unión a BHK se muestran a continuación en la Tabla 15.

Tabla 15

zcytor17 µg/ml	2,0	0,100	0,010	0,001	0,0001	0,00001	0,000001	0,0
BHK C17+OSMRbeta	3780	2126	328	53	17	15	14	13
BHK-C17	3032	1600	244	39	16	15	14	15
BHK-OSMRbeta	13	X	X	X	X	X	X	0
BHK-WT	15	14	13	X	X	X	X	13
zcytor17 µg/ml		10,0	3,33	1,11	0,37	0,12	0,04	0,00
BAF3 C17+OSMRbeta		531	508	489	441	364	247	7
BAF3-C17		6	5	5	5	5	5	11
BAF3-WT		13	13	12	12	12	12	13
zcytor17 ng/ml		100,0	10,0		1,0		0,0	
BAF3-C17		347		72		17		7

10 Ejemplo 40

Análisis de Matriz de Expresión Génica de Células Tratadas con Zcytor17lig Humano

Se aisló ARN a partir de células A549 tratadas con zcytor17lig humano, células SK-LU-1 tratadas con zcytor17lig y células de control no tratadas usando un kit RNeasy Midi (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 15 El perfil de expresión génica de las células tratadas con zcytor17lig y las células de control respectivas se realizó usando matrices de expresión de ADNc de la serie GEArray Q (SuperArray Inc., Bethesda, MD). Las matrices de expresión de ADNc de la serie Q contienen hasta 96 fragmentos de ADNc asociados con una ruta biológica específica, o genes con funciones o características estructurales similares. La comparación de matrices de células tratadas y de control permite la determinación de la regulación positiva y negativa de genes específicos. El marcaje de sondas, la hibridación y la detección se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La detección de la señal quimioluminiscente y la adquisición de datos se realizó en una estación de trabajo Lumi-Imager (Roche, Indianapolis, IN). Los datos de imágenes resultantes se analizaron usando ImageQuant 5.2 (Amersham Biosciences, inc., Piscataway, NJ) y el software GEArray Analyzer 1.2 (SuperArray Inc., Bethesda, MD).

- 25 El análisis de los resultados de las matrices HS-014N serie Q de Receptor e Interleucina humana, mostró, después de la normalización, un aumento de aproximadamente 4,7 veces en la señal de IL13RA2 en las células SK-LU-1 humanas tratadas con zcytor17lig y un aumento de aproximadamente 2,2 veces de la señal de IL13RA2 en las células A549 humanas tratadas con zcytor17lig.

- 30 Estos resultados indican que zcytor17lig regulaba positivamente de una forma significativa IL13RA2 en las células SK-LU-1 y A549. Estas dos líneas son líneas celulares establecidas derivadas de carcinomas de pulmón humano (Blobel y col., Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol., 1984; 45(4): 407-29). Más específicamente, A549 se caracteriza como una línea celular de epitelio pulmonar humano (Lin, y col., J Pharm Pharmacol., Septiembre de 2002; 54(9): 1271-8; Martínez y col., Toxicol Sci., 2002 Oct; 69(2): 409-23).

Se ha demostrado que la interleucina-13 (IL-13), una citocina secretada por linfocitos T activados, es necesaria y

- suficiente para la expresión del asma alérgica y para su uso en modelos experimentales de asma, que incluyen hiperrespuesta de las vías respiratorias, reclutamiento de eosinófilos y superproducción de moco (Wills-Karp y col., Science, 1998; 282: 2258-2261). Se ha mostrado que la neutralización selectiva de la IL13 mejorará el fenotipo del asma (Grunig y col., Science, 1998; 282: 2261-2263). También se ha notificado que la IL13 está implicada en la regulación positiva de la expresión del gen de mucina MUC8 en epitelio de pólipo nasal humano y epitelio nasal cultivado (Kimm y col., Acta Otolaryngol., 2002; Sep; 122(6): 638-643; Seong y col., Acta Otolaryngol., 2002; Jun; 122(4): 401-407). MUC8, una glicoproteína de mucina de las vías respiratorias importante, está implicada en la patogénesis de la hipersecreción de moco en la sinusitis crónica con pólipos (Seong y col., Acta Otolaryngol., 2002; Jun; 122(4): 401-407).
- Funcionalmente, IL13 señala a través de un complejo de receptor que consiste en la cadena alfa-1 del receptor de interleucina-13 (IL13RA1) y el receptor alfa de IL-4 (IL4RA) (Daines y Hershey, J Biol Chem., 2002; 22(12): 10387-10393). También se ha mostrado que el receptor alfa-2 de interleucina-13 (IL13RA2) se une a IL13 con alta afinidad, pero por sí mismo (Daines y Hershey, J Biol Chem., 2002; 22(12): 10387-10393). Sin embargo, este receptor carece del dominio citoplásmico necesario para la señalización y, por lo tanto, se considera un receptor señuelo. Se ha mostrado que IL13RA2 es predominantemente una molécula intracelular que puede movilizarse rápidamente desde depósitos intracelulares y expresarse en la superficie después del tratamiento celular con interferón (IFN)-gamma. La expresión en la superficie de IL13RA2 después del tratamiento con IFN-gamma no implica la síntesis de proteínas y da como resultado una señalización de IL13 disminuida (Daines y Hershey, J Biol Chem., 2002; 22(12): 10387-10393).
- Los resultados del análisis de la matriz de expresión génica para zcytor17lig indican que la acción zcytor17lig es nueva con respecto a la del IFN-gamma, ya que el tratamiento con zcytor17lig de líneas celulares derivadas de epitelio pulmonar dio como resultado un aumento significativo de la expresión del gen de IL13RA2. De esta manera, el tratamiento con zcytor17lig puede ser beneficioso en casos en los que se desea la regulación positiva a largo plazo de la expresión de IL13RA2 y la regulación negativa de IL13, tales como en casos de asma, hiperactividad de las vías respiratorias (HVR) y regulación de mucina, incluyendo sinusitis crónica con pólipos.

Ejemplo 41

Ratón Transgénico para zcytor17lig Murino

- Para evaluar los efectos *in vivo* de la sobreexpresión de zcytor17lig, se generaron múltiples fundadores de ratones transgénicos que expresaban la forma murina del gen, dirigido por dos promotores diferentes: el promotor específico de linfocitos E μ /Ick, y el promotor ubicuo EF1 α (Ejemplo 22). Los niveles séricos de proteína varían de aproximadamente 200 a 300 ng/ml. El promotor E μ /Ick generó ratones con mayores niveles de proteína en suero que los observados en los ratones transgénicos con EF1 α -zcytor17lig.

- Los ratones transgénicos con zcytor17lig desarrollaron un fenotipo de piel aproximadamente a las 4-8 semanas de edad. El pelo de los ratones transgénicos se "erizaba", mostrando una piloerección evidente y una pérdida de pelo de leve a severa, normalmente en sus lomos, los lados del torso, y alrededor de sus ojos. Este fenotipo se encontró sistemáticamente en ratones con niveles detectables de proteína zcytor17lig en su suero. Entre los fundadores, se observó una tasa de incidencia del 100 % entre los ratones que expresaban el gen dirigido por E μ /Ick y una incidencia del 50 % en los ratones transgénicos EF1 α -zcytor17lig, que se correlacionaba bien con los niveles relativos de zcytor17lig que se detectaron en su suero. La piel transgénica parecía tener prurito, como se demuestra por el comportamiento de rascado de los ratones, algunas veces tan intenso que producía escoriación y lesiones en la piel que normalmente se infectaban (con al menos *Staphylococcus aureus*). Los ratones se identificaron originalmente con etiquetas metálicas en la oreja, pero en la mayoría de los casos, las etiquetas metálicas se retiraban por la fuerza por los propios ratones. Esto con frecuencia produjo lesiones severas en el oído externo. Estas orejas heridas con frecuencia no se curaban apropiadamente, como se refleja por la presencia de pústulas y costras de larga duración, y una herida supurante en expansión que se desarrolló en muchos de los animales, detrás y entre sus orejas. Algunos de los ratones transgénicos también desarrollaron heridas con costras en sus hombros y cuello. Se observaron lesiones cutáneas en una subserie de los animales, que generalmente aparecían en áreas de la piel en las que ya se había producido una pérdida de pelo, y con frecuencia se exacerbaban por el comportamiento de rascado del ratón.

- Se usó RT-PCR cuantitativa en Tiempo Real para detectar transcritos de ARN de zcytor17lig en muestras de piel transgénicas (pero no no transgénicas), expresando la piel transgénica con E μ /Ick más ARN de zcytor17lig que la piel de ratones transgénicos EF1 α -zcytor17lig. Los genes que codificaban las subunidades del receptor zcytor17, zcytor17 y OSM-Rbeta, se expresaron en la piel de ratones no transgénicos y transgénicos para zcytor17lig.

- Un examen de los tejidos linfoides de una subserie de fundadores transgénicos con E μ /Ick por citometría de flujo reveló un aumento significativo en la proporción de linfocitos T activados en el bazo y ganglios linfáticos de estos ratones. Dos de los cuatro ratones analizados tuvieron ganglios linfáticos cervicales muy agrandados, posiblemente debido a la presencia de lesiones en sus cuellos. Se observó un ligero aumento en el peso del bazo y un ligero aumento en los monocitos y neutrófilos circulantes en la sangre de los ratones transgénicos. No hubo aumento en diversas citocinas ensayadas, ni tampoco hubo cambios en los niveles de amiloide A en suero circulante en estos

ratones. Los efectos sobre las células inmunes en los ratones transgénicos pueden ser un resultado directo o indirecto de zcytor17lig, o son efectos secundarios de las lesiones cutáneas.

Se realizó histopatología en muchos tejidos distintos de piel, incluyendo hígado, timo, bazo, riñón y testículo, y no se detectaron anomalías significativas en estos órganos. Sin embargo, el análisis de la piel transgénica reveló varias alteraciones que variaban en gran medida dependiendo de la fuente y localización de la piel (por ejemplo, normal, sin pelo o lesional). En muchos casos, las orejas de los ratones transgénicos tenían una epidermis engrosada en comparación con los controles no transgénicos (por ejemplo, aproximadamente 4 capas frente a 2 capas), y los tejidos subyacentes contenían números de bajos a moderados de células inflamatorias, que eran principalmente mononucleares con neutrófilos ocasionales. La epidermis sobre el abdomen parecía multifocalmente ligeramente más gruesa en los ratones transgénicos, pero no hubo un aumento evidente de células inflamatorias en la dermis subyacente o subcutis. En las partes de piel sin pelo de estos ratones había folículos pilosos dilatados que contenían algunos residuos pero no tallos pilosos (por ejemplo, los pelos se caían por la raíz). En las áreas lesionadas había un engrosamiento severo de la epidermis (acantosis), aumento de queratina en la superficie de la piel (hiperqueratosis), úlceras esparcidas de tamaño variable y números significativos de células inflamatorias en la dermis (principalmente neutrófilos, con números variables de macrófagos y linfocitos). La dermis también contenía numerosos mastocitos que bordeaban las lesiones. Algunos de los tallos pilosos de las áreas lesionadas de la piel transgénica estaban en fase activa (anágena), a diferencia de muchos de los tallos pilosos en áreas "normales" que estaban en la fase de involución (catágena) o inactiva (telógena).

El fenotipo del ratón transgénico con zcytor17lig se parece mucho al de pacientes con dermatitis atópica (DA) y de modelos de ratón de DA. La DA es una enfermedad inflamatoria crónica común que se caracteriza por citocinas hiperactivadas de la subserie de linfocitos T auxiliares 2 (Th2). Zcytor17lig se expresa preferentemente por células Th2 frente a Th1, lo cual da más credibilidad a esta comparación. Aunque se desconoce la etiología exacta de la DA, se han implicado múltiples factores incluyendo respuestas inmunes Th2 hiperactivas, autoinmunidad, infección, alérgenos y predisposición genética. Los factores clave de la enfermedad incluyen xerosis (sequedad de la piel), prurito (picor de la piel), conjuntivitis, lesiones cutáneas inflamatorias, infección por *Staphylococcus aureus*, elevación de eosinofilia en sangre, elevación de los niveles séricos de IgE e IgG1 y dermatitis crónica con infiltración de linfocitos T, mastocitos, macrófagos y eosinófilos. Se ha reconocido que la colonización o infección con *S. aureus* exacerba la DA y perpetua la cronicidad de esta enfermedad cutánea.

La DA se encuentra con frecuencia en pacientes con asma y rinitis alérgica, y frecuentemente es la manifestación inicial de la enfermedad alérgica. Aproximadamente un 20 % de la población en los países occidentales padece estas enfermedades alérgicas, y la incidencia de DA en países desarrollados está aumentando por razones desconocidas. La DA normalmente empieza en la infancia y con frecuencia puede persistir hasta la adolescencia y la edad adulta. Los tratamientos actuales para la DA incluyen corticosteroides tópicos, ciclosporina A oral, inmunosupresores no corticosteroides tales como tacrolimus (FK506 en forma de pomada) e interferón gamma. A pesar de la diversidad de tratamientos para la DA, muchos síntomas del paciente no mejoran o tienen reacciones adversas a las medicaciones, necesitando la búsqueda de otros agentes terapéuticos más eficaces.

Las células epiteliales que expresan el receptor heterodimérico para zcytor17lig (zcytorR17 y OSM-Rbeta) se localizan en sitios (por ejemplo, piel, intestino, pulmón, etc.) de entrada del alérgeno en el cuerpo e interactúan estrechamente con las células dendríticas (células presentadoras de antígeno profesionales) *in situ*. Las células dendríticas desempeñan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades alérgicas, y zcytor17lig puede interactuar con su receptor sobre células epiteliales en la piel y pulmón e influir sobre respuestas inmunes en estos órganos. Por lo tanto, zcytor17lig y sus receptores pueden contribuir a la patogénesis de enfermedades alérgicas tales como AD y asma. Además, el fenotipo del ratón transgénico zcytor17lig sugiere que este ligando puede desempeñar un papel en la curación de heridas, ya que los ratones parecen incapaces de reparar las lesiones en sus orejas, y con frecuencia tienen lesiones de larga duración en sus lomos y costados. Por lo tanto, un antagonista de zcytor17lig podría representar una terapia viable para estas y otras indicaciones.

Ejemplo 42

Ensayo de Luciferasa en Líneas de Células Epiteliales Transformadas Humanas mediante Infección Transitoria con Gen Indicador STAT/SER Adenovírico

Se sembró una amplia diversidad de líneas de células epiteliales transformadas humanas (véase la Tabla 16 mostrada a continuación) en placas de 96 pocillos de fondo plano a 10.000 células/pocillo en medio de crecimiento regular como se especifica para cada tipo celular. Al día siguiente, las células se infectaron con una construcción indicadora de adenovirus, KZ136, a una multiplicidad de infección de 5000. El indicador KZ136 contiene los elementos STAT además de un elemento de respuesta sérico. El volumen total fue de 100 μ l/pocillo usando DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM (GibcoBRL), Piruvato Sódico 1 mM (GibcoBRL) y suplemento de Insulina-Transferrina-Selenio 1x (GibcoBRL) (denominado en lo sucesivo medio sin suero). Las células se cultivaron durante una noche.

Al día siguiente se retiró el medio y se reemplazó por 100 μ l de medio de inducción. El medio de inducción era zcytor17lig humano diluido en medio sin suero a 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml y

1,56 ng/ml. Se usó un control positivo de FBS al 20 % para validar el ensayo y para asegurar que la infección por el adenovirus era satisfactoria. Las células se indujeron durante 5 horas, después de lo cual se aspiró el medio. Las células después se lavaron en 50 µl/pocillo de PBS y posteriormente se lisaron en 30 µl/pocillo de tampón de lisis de células 1X (Promega). Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, se transfirieron 25 µl/pocillo de lisado a placas blancas opacas de 96 pocillos. Las placas después se leyeron en el Luminómetro usando una integración de 5 segundos con la inyección 40 µl/pocillo de sustrato de luciferasa (Promega).

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

Tabla 16

Línea Celular	Especie	Tejido	Morfología	Enfermedad	Inducción en veces
A549	Humana	Pulmón	Epitelial	Carcinoma	2x
Sk-Lu-1	Humana	Pulmón	Epitelial	Adenocarcinoma	6x
WI-38	Humana	Pulmón embrionario	Fibroblasto		Negativo
MRC-5	Humana	Pulmón	Fibroblasto		Negativo
DU 145	Humana	Próstata	Epitelial	Carcinoma	10x
PZ-HPV-7	Humana	Próstata	Epitelial	Transformado con VHP	5x
PC-3	Humana	Próstata	Epitelial	Adenocarcinoma	Negativo
U2OS	Humana	Hueso	Epitelial	Osteosarcoma	15,5x
SaOS2	Humana	Hueso	Epitelial	Osteosarcoma	22x
MG-63	Humana	Hueso	Fibroblasto	Osteosarcoma	Negativo
143B	Humana	Hueso	Fibroblasto	Osteosarcoma	3,5x
HOS	Humana	Hueso	Fibroblasto y Epitelial		8x
TRBMeC	Humana	Hueso, Médula ósea	Epitelial		2x
HT144	Humana	Piel	Fibroblasto	Melanoma	5x
C32	Humana	Piel		Melanoma	Negativo
Sk-Mel-2	Humana	Piel	Poligonal	Melanoma	2,7x
WM-115	Humana	Piel	Epitelial	Melanoma	2x
HCT-116	Humana	Colon	Epitelial	Carcinoma	Negativo
HT-29	Humana	Colon	Epitelial	Carcinoma	Negativo
CaCo2	Humana	Colon	Epitelial	Adenocarcinoma	3x
HBL-100	Humana	Mama	Epitelial		1,5x
ME-180	Humana	Cuello del útero	Epitelial	Carcinoma	Negativo
HeLa 299	Humana	Cuello del útero	Epitelial	Adenocarcinoma	Negativo
SK-N-SH	Humana	Cerebro	Epitelial	Neuroblastoma	Negativo
U138 MG	Humana	Cerebro	Poligonal	Glioblastoma	Negativo
HepG2	Humana	Hígado	Epitelial	Carcinoma	Negativo
Hígado Chang	Humana	Hígado	Epitelial		Negativo
Sk-Hep-1	Humana	Hígado	Epitelial	Adenocarcinoma	4x
Int 407	Humana	Intestino	Epitelial		Negativo
3a-Sub-E	Humana	Placenta			Negativo

10

Ejemplo 43

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

Se exploraron líneas de células epiteliales con patologías humanas (A549, carcinoma de epitelio pulmonar humano; SkLu1, adenocarcinoma de epitelio pulmonar humano; DU145, carcinoma epitelial de próstata humano; PZ-HPV-7, HPV epitelial de próstata humana transformada; U20S, osteosarcoma epitelial de hueso humano) con respecto a la producción de citocinas en respuesta a zcytor17lig *in vitro*. Estas líneas celulares tienen zcytor17 y OSMR-beta, identificados por RT-PCR, y responden a zcytor17lig humano cuando se ensayan con la construcción indicadora de luciferasa adenovírica KZ136 (Ejemplo 42). La producción de citocinas por estas líneas celulares se determinó en respuesta a zcytor17lig humano en una serie de tres experimentos.

A. Producción de citocinas por líneas de células epiteliales con patologías humanas cultivadas con zcytor17lig humano

Las células se cultivaron a una densidad de $4,5 \times 10^5$ células por pocillo en una placa de 6 pocillos (Costar) y se cultivaron en medio de crecimiento respectivo. Las células se cultivaron con reactivos de ensayo: 100 ng/ml de

5 zcytor17lig, 10 ng/ml de Interferón gamma (IFN gamma) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF alfa) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml de IL-1beta (R&D Systems, Minneapolis, MN) o 100 ug/ml de Lipopolisacárido (LPS) (Sigma). Se recogieron los sobrenadantes a las 24 y 48 horas y se ensayaron con respecto a las citocinas; GM-CSF (Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos-Macrófagos), IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1 (Proteína-1 Quimioatrayente de Macrófagos) y TNFa. Se usaron kits Multiplex Antibody Bead de BioSource International (Camarillo, CA) para medir las citocinas en las muestras. Los ensayos se leyeron en un instrumento Luminex-100 (Luminex, Austin, TX) y los datos se analizaron usando un software MasterPlex (MiraiBio, Alameda, CA). La producción de citocinas (pg/ml) para cada línea celular en las muestras de 24 horas se muestra a continuación en la Tabla 17.

10

Tabla 17

GM-CSF pg/ml					
	A549	SkLu1	DU145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytor17L	18,80	10,26	16,19	13,26	14,10
IFN-g	16,19	13,36	11,56	16,26	11,81
IL-1b	104,60	126,44	76,77	338,25	27,32
TNFa	106,67	33,20	58,50	107,09	33,79
LPS	1764	10,62	11,81	25,47	18,34
control	14,81	8,56	13,26	21,67	13,96
IL-1b pg/ml					
	A549	SkLu1	DU145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytor17L	26,90	30,17	28,77	29,07	28,00
IFN-g	29,07	35,33	21,96	26,90	26,73
IL-1b	1332,88	1256,17	979,02	1107,35	998,60
TNFa	31,11	33,28	35,33	31,24	25,66
LPS	33,28	28,77	29,07	31,11	31,24
control	28,77	28,77	26,73	31,24	29,07
IL-6 pg/ml					
	A549	SkLu1	DU145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytor17L	20,09	26,89	193,05	19,37	17,30
IFN-g	17,52	33,64	217,58	27,02	17,63
IL-1b	175,44	5920,19	2375,29	304,08	18,44
TNFa	354,16	1002,51	1612,17	103,58	18,33
LPS	18,06	35,65	162,18	22,42	17,30
control	17,63	27,80	71,23	19,32	17,19
IL-8 pg/ml					
	A549	SkLu1	DU145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytor17L	86,33	150,81	150,61	45,92	6,81
IFN-g	24,07	72,82	163,31	81,78	1,35
IL-1b	1726,24	4083,12	4407,79	5308,83	124,17
TNFa	3068,68	3811,75	2539,39	3324,02	69,65
LPS	20,28	167,13	230,39	115,08	7,95
control	14,92	109,78	107,27	93,44	9,49
MCP-1 pg/ml					
	A549	SkLu1	DU145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytor17L	8,97	187,29	26,84	105,15	7,20
IFN-g	7,30	267,99	17,05	88,68	7,71
IL-1b	8,11	8039,84	88,78	3723,81	4,70
TNFa	8,50	7100,37	153,26	3826,80	2,80
LPS	9,40	185,83	22,65	61,62	5,61
control	8,16	167,93	13,68	47,78	5,61
TNFa pg/ml					
	A549	SkLu1	DU145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytor17L	16,23	17,52	16,67	15,80	17,09
IFN-g	15,80	17,09	15,80	16,65	15,80
IL-1b	16,66	17,09	15,80	17,95	16,23
TNFa	1639,92	1648,83	2975,07	1348,33	3554,82
LPS	16,87	15,80	15,37	17,09	17,52
control	16,23	15,80	15,80	17,09	16,66

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

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

10 Además de las líneas de células epiteliales humanas, también se ensayaron células de epitelio bronquial humano normal (NHBE, Clonetics). Las células se cultivaron a una densidad de 1×10^5 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se cultivaron con reactivos de ensayo; 1000 ng/ml, 100 ng/ml y 10 ng/ml de zcytor17lig (A760F), 10 ng/ml de TNFa, 10 ng/ml de OSM, 10 ng/ml de IFNa, 10 ng/ml de TGFb o 10 ng/ml de linfotaxina. Se recogieron los sobrenadantes a las 24 y 48 horas y se ensayaron con respecto a las citocinas; IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-a, RANTES y Eotaxina. Las citocinas se ensayaron como se ha descrito previamente. La producción de citocinas (pg/ml) para cada línea celular en las muestras de 48 horas se muestra a continuación en la Tabla 18.

15 Tabla 18

IL-6 pg/ml					
	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000 ng/ml	24,5	56,3	32,1	25,2	64,5
r17L 100 ng/ml	25,0	65,0	31,0	25,4	50,2
r17L 10 ng/ml	24,8	51,8	30,2	25,3	54,3
TNFa	272,9	355,4	437,5	36,1	299,3
OSM	26,4	73,5	112,4	25,6	80,4
IFNa	24,6	109,3	33,7	26,4	52,4
TGFa	24,4	102,6	42,7	27,8	268,9
control	24,5	36,3	29,9	25,2	47,9
IL-8 pg/ml					
	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000 ng/ml	35,0	243,3	45,6	18,6	402,0
r17L 100 ng/ml	31,0	290,7	40,1	21,3	296,0
r17L 10 ng/ml	30,4	240,4	33,4	18,9	361,8
TNFa	2809,3	2520,9	1385,2	2784,9	1486,3
OSM	37,8	60,6	68,0	22,5	494,6
IFNa	18,9	315,3	39,5	33,1	231,6
TGFa	9,9	77,5	19,6	88,9	246,9
control	10,9	238,0	38,0	39,7	315,8
MCP-1 pg/ml					
	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000 ng/ml	nd	nd	149,1	81,0	nd
r17L 100 ng/ml	nd	nd	130,6	81,9	nd
r17L 10 ng/ml	nd	nd	111,7	49,1	nd
TNFa	nd	22,1	2862,6	1104,7	nd
OSM	nd	17,2	448,2	85,8	nd
IFNa	nd	nd	131,7	10,5	nd
TGFa	nd	1,7	54,5	27,6	nd
control	nd	nd	113,0	1,7	nd
nd = no detectado					

20 Las células DU145 produjeron IL-6 en respuesta a zcytor17lig, repitiendo los resultados previos en el Ejemplo 43A. Sin embargo, sólo A549 y U2OS tuvieron respuestas de IL-8 similares a las observadas en el Ejemplo 43A. Tanto las células SkLu1 como las células U2OS produjeron MCP-1 en respuesta a zcytor17lig. La producción de citocinas por células NHBE fue marginal en comparación con los controles.

C. Producción de citocinas por líneas de células epiteliales con patologías humanas co-cultivadas con zcytor17lig humano e IFN gamma

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

Tabla 19

		IL-8 pg/ml	MCP-1 pg/ml
A549	10 ng/ml IFNg+100 ng/ml r17L	86,7	nd
	10 ng/ml IFNg+10 ng/ml r17L	75,1	nd
	10 ng/ml IFNg+1 ng/ml r17L	63,6	nd
	10 ng/ml IFNg	35,4	nd
	control	36,6	nd
DU145	10 ng/ml IFNg+100 ng/ml r17L	102,3	nd
	10 ng/ml IFNg+10 ng/ml r17L	92,9	nd
	10 ng/ml IFNg+1 ng/ml r17L	79,9	nd
	10 ng/ml IFNg	70,7	nd
	control	79,4	nd
SkLu1	10 ng/ml IFNg+100 ng/ml r17L	152,2	604,9
	10 ng/ml IFNg+10 ng/ml r17L	194,4	870,7
	10 ng/ml IFNg+1 ng/ml r17L	138,7	585,4
	10 ng/ml IFNg		652,6
	control	203,0	292,3
U2OS	10 ng/ml IFNg+100 ng/ml r17L	106,8	357,0
	10 ng/ml IFNg+10 ng/ml r17L	198,2	347,7
	10 ng/ml IFNg+1 ng/ml r17L	109,9	293,3
	10 ng/ml IFNg	118,8	159,8
	control	146,8	7,0

5 Las células A549 produjeron IL-8 en respuesta a zcytor17lig, sin embargo no hubo ningún efecto del co-cultivo de las células con la adición de IFN gamma. Las células U2OS fabricaron 20 veces más MCP-1 cuando se cultivaron con IFNg y 50 veces más MCP-1 cuando se cultivaron con IFN gamma + zcytor17lig.

Ejemplo 44

Zcytor17lig Afecta a la Incorporación de ^3H -TdR en Células de Carcinoma Epitelial de Próstata DU145

10 Se sembraron células en grupos de tejidos de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de 25.000/pocillo en medio de crecimiento MEM (Life Technologies) suplementado con glutamina, piruvato, aminoácidos no esenciales (Life Technologies) y suero bovino fetal al 10 % (Hyclone). Cuando se alcanzó la confluencia (24 horas después), las células se cambiaron a un medio de detención del crecimiento sustituyendo el suero por BSA al 0,1 % (Life Technologies). Después de 48 horas para conseguir la sincronización celular, el medio de detención del crecimiento se reemplazó por medio nuevo. Después, se añadió zcytor17lig recombinante humano (reactivo de ensayo) a 15 diversas concentraciones (de 0,24 a 60 ng/ml) (véase la Tabla 16 mostrada a continuación) para ensayar el efecto de la proteína sobre la replicación del ADN basal. Algunos pocillos recibieron FBS al 2,5 % (Hyclone) además de zcytor17lig, para ensayar el efecto de la proteína sobre los niveles elevados de la incorporación de TdR. Como controles positivos se usaron FBS al 10 % y 20 ng/ml de Factor-BB de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF-BB) (R&D).

20 Dieciocho horas después de la adición de zcytor17lig y el resto de los reactivos de ensayo, las células se sometieron a pulsos con 250 nCi/ml de [^3H]-timidina (NEN) durante 4 horas. Después del pulso de 4 horas, se desechó el medio y se añadieron 100 μl de solución de tripsina (Life Technologies) a cada pocillo para separar las células. La radiactividad incorporada por DU145 se determinó recogiendo las células con un recolector de células Packard Filtermate 196 y contando el marcador incorporado usando un contador de centelleo de microplacas Packard TopCount NXT.

25 Como puede verse en la Tabla 20 mostrada a continuación, zcytor17lig indujo la incorporación de timidina en las células quiescentes (en BSA al 0,1 %) de una manera dependiente de la concentración. Este efecto alcanzó 2,5 veces el del control con BSA a la mayor concentración usada, 60 ng/ml. Además, este efecto de zcytor17lig también fue detectable cuando la incorporación basal se elevó por la adición de FBS al 2,5 % (en esta serie un mitógeno tan potente como FBS al 10 %). Estos resultados, por lo tanto, indican que tanto en las condiciones basales como en las 30 condiciones estimuladas, zcytor17lig puede actuar como factor mitogénico para las células de carcinoma DU145.

La Tabla 16 muestra los efectos de zcytor17lig sobre la incorporación de timidina por células DU145. Los resultados se expresan en cpm/pocillo y los números son la media \pm desviación típica de pocillos por triplicado.

Tabla 20

	<u>BSA al 0,1 %</u>	<u>FBS al 1,5 %</u>
Zcytor17lig (0,24 ng/ml)	1139 ± 336	4228 ± 600
Zcytor17lig (0,24 ng/ml)	1430 ± 136	4894 ± 1037
Zcytor17lig (0,74 ng/ml)	1657 ± 32	5038 ± 810
Zcytor17lig (2,22 ng/ml)	1646 ± 57	5162 ± 808
Zcytor17lig (6,67 ng/ml)	2226 ± 189	6385 ± 1613
Zcytor17lig (20 ng/ml)	2168 ± 108	5880 ± 1085
Zcytor17lig (60 ng/ml)	2512 ± 111	6165 ± 417
PDGF-BB (20 ng/ml)	4090 ± 202	5927 ± 360

Ejemplo 45Expresión de huzcytor17lig en *E. coli*5 A. Construcción de vector de expresión pRPS01 que expresa el polipéptido de fusión huzcytor17Lig/MBP-6H

Se construyó un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codificaba huzcytor17lig fusionado por el extremo C-terminal a Proteína de Unión a Maltosa (MBP) mediante recombinación homóloga. El polipéptido de fusión contiene una parte de MBP de aproximadamente 388 aminoácidos N-terminal fusionada al huzcytor17Lig descrito en el presente documento. Se aisló un fragmento de ADNc de huzcytor17lig usando el procedimiento de PCR como se describe en el presente documento. Se usaron dos cebadores en la producción del fragmento de zcytor17lig en una reacción PCR convencional: (1) uno que contiene 40 pb de la secuencia flanqueante del vector y 20 pb correspondientes al extremo amino de huzcytor17lig, y (2) otro que contiene 40 pb del extremo 3' correspondiente a la secuencia flanqueante del vector y 20 pb correspondientes al extremo carboxilo de huzcytor17lig. Dos microlitros de los 100 µl de reacción PCR se procesaron en un gel de agarosa al 1,0 % con tampón TBE 1 x para el análisis, y se observó el fragmento del peso molecular esperado. El resto de la reacción PCR se combinó con el segundo tubo de PCR y se precipitó con 400 µl de etanol absoluto. El ADN precipitado se usó para recombinación en el vector receptor pTAP98 cortado con SmaI para producir la construcción que codificaba la fusión MBP-huzcytor17lig, como se describe más adelante.

El vector pTAP98 se construyó usando recombinación homóloga de levadura. Cien nanogramos de pMAL-c2 cortado con EcoR se recombinaron con 1 µg de pRS316 cortado con Pvu1, 1 µg de engarce y 1 µg de pRS316 cortado con Sca1/EcoR1 en una reacción PCR. Los productos de PCR se concentraron mediante precipitación con etanol al 100 %. La cepa de células de levadura competente (*S. cerevisiae*), SF838-9Dα, se combinó con 10 µl de una mezcla que contenía aproximadamente 1 µg del producto de PCR huzcytor17lig (anterior) y 100 ng del vector pTAP98 digerido con SmaI, y se sometió a electroporación a 0,75 kV, 25 µF y ∞ ohms. La mezcla de reacción resultante se cultivó en placas URA-D y se incubó a 30 °C.

Después de 48 horas, se seleccionaron los transformantes de levadura Ura+ de una sola placa. Se aisló el ADN y se usó para transformar células *E. coli* electrocompetentes (por ejemplo, MC1061, Casadaban y col. J. Mol. Biol. 138, 179-207). Las células *E. coli* resultantes se cultivaron en placas MM/CA + AMP a 100 mg/l (Pryor y Leiting, Protein Expression and Purification 10: 309-319, 1997) usando procedimientos convencionales. Se recogieron cuatro clones individuales a partir de las placas y se inocularon en MM/CA con 100 µg/ml de Ampicilina durante dos horas a 37 °C. Un mililitro de cada cultivo se indujo con IPTG 1 mM. Aproximadamente 2-4 horas después, 250 µl de cada cultivo inducido se mezclaron con 250 µl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 250 µl de tampón Thorner con βME al 5 % y colorante (urea 8 M, Tris 100 mM pH 7,0, glicerol al 10 %, EDTA 2 mM, SDS al 5 %). Las muestras se sometieron a agitación vorticial durante un minuto y se calentaron a 65 °C durante 10 minutos. Se cargaron veinte microlitros de cada muestra por carril en un gel PAGE del 4 %-12 % (NOVEX). Los geles se procesaron en tampón MES 1X. Los clones positivos se denominaron pRPS01 y se sometieron a análisis de secuencias.

Se usó un microlitro de ADN de secuenciación para transformar la cepa de células *E. coli* electrocompetentes MC1061. Las células se sometieron a electropulsos a 2,0 kV, 25 µF y 400 ohms. Después de la electroporación, las

células se rescataron en 0,6 ml de SOC y se cultivaron en placas LB+Amp a 37 °C durante una noche, con 100 mg/l de Ampicilina. Se indujeron cuatro cultivos con ITPG y se exploraron con respecto a los positivos como se ha descrito anteriormente. Los clones positivos se expandieron para la purificación de proteínas de la proteína de fusión huzcytor17lig/MBP-6H usando técnicas convencionales.

5 B. Purificación de huzcytor17Lig/MBP-6H a partir de fermentación de *E. coli*

A menos que se indique otra cosa, todas las operaciones se realizaron a 4 °C. El siguiente procedimiento se usó para purificar el polipéptido huzcytor17Lig/MBP-6H recombinante. Se construyeron células *E. coli* que contenían la construcción pRPS01 y expresaban huzcytor17Lig/MBP-6H usando procedimientos convencionales de biología molecular y se cultivaron en 50,0 g/l de SuperBroth II (12 g/l de Caseína, 24 g/l de Extracto de levadura, 11,4 g/l de fosfato dipotásico, 1,7 g/l de fosfato monopotásico; Becton Dickinson, Cockeysville, MD), 5 g/l de glicerol y 5 ml/l de Sulfato de Magnesio 1 M. Se recogieron veinte gramos de células y se congelaron para la purificación de proteínas.

Las células descongeladas se resuspendieron en 500 ml de tampón de Equilibrio de Amilosa (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0). Para lisar las células se usó un sistema de ruptura de células de Prensa French (Constant Systems Ltd., Warwick, RU) estableciendo una temperatura de -7 °C a -10 °C y se usaron 30K PSI para lisar las células. Las células resuspendidas se ensayaron con respecto a la ruptura por lecturas de A_{600} antes y después de los ciclos a través de la Prensa French. La suspensión celular procesada se sedimentó a 10.000 G durante 30 minutos para retirar los residuos celulares y el sobrenadante se recogió para la purificación de proteínas.

Se vertió una columna de 25 ml de resina de Amilosa (New England Biolabs, Beverly, MA) (preparada como se describe más adelante) en una columna de vidrio H Bio-Rad, de 2,5 cm de diámetro x 10 cm de altura. La columna se llenó y se equilibró por gravedad con 10 volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrio de Amilosa. El sobrenadante celular procesado se cargó por lotes en la resina de Amilosa, durante una noche con agitación. La resina se devolvió a la columna Bio-Rad y se lavó con 10 VC de tampón de Equilibrio de Amilosa por gravedad. La columna se eluyó con ~2 VC de tampón de Elución de Amilosa (tampón de Equilibrio de Amilosa, Maltosa 10 mM, Fluka Biochemical, Suiza) por gravedad. Se recogieron diez fracciones de 5 ml a lo largo del perfil de elución y se ensayaron con respecto a la absorbancia a 280 y 320 nm. La resina de Amilosa se regeneró con 1 VC de H₂O destilada, 5 VC de SDS al 0,1 % (p/v) (Sigma), 5 VC de H₂O destilada, 5 VC de tampón de Equilibrio de Amilosa, y finalmente 1 VC de tampón de Almacenamiento de Amilosa (tampón de Equilibrio de Amilosa + Azida Sódica al 0,02 %). La columna regenerada se almacenó a 4 °C.

Se reunieron las fracciones del perfil de elución de interés y se dializaron en una cámara de diálisis 10 K (Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemical) frente a 4 cambios de 4 l de PBS pH 7,4 (Sigma) durante un periodo de tiempo de 8 horas para retirar los contaminantes de bajo peso molecular, se cambió el tampón y se desalinizó. Después de la diálisis, el material recogido representaba el polipéptido huzcytor17/MBP-6H purificado. El polipéptido huzcytor17/MBP-6H purificado se esterilizó por filtración y se analizó mediante tinción con Coomassie y SDS-PAGE obteniéndose un producto con el peso molecular apropiado. La concentración del polipéptido huzcytor17/MBP-6H se determinó por análisis BCA y fue de 1,28 mg/ml.

Ejemplo 46

Anticuerpo Policlonal de zcytor17lig Humano

A. Preparación y Purificación

Se prepararon anticuerpos policlonales inmunizando 2 conejos blancos New Zealand hembra con la proteína recombinante purificada huzcytor17/MBP-6H (Ejemplo 45). Cada conejo recibió una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 200 µg de proteína purificada en Adyuvante Completo de Freund seguido de inyecciones IP de refuerzo de 100 µg de proteína en Adyuvante Incompleto de Freund cada tres semanas. De siete a diez días después de la administración de la segunda inyección de refuerzo (3 inyecciones en total), se extrajo sangre de los animales y se recogió el suero. Los animales después se sometieron a refuerzos y a extracciones de sangre cada tres semanas.

El suero de conejo específico para huzcytor17/MBP-6H se preadsorbió de anticuerpos anti-MBP usando una columna de proteína CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB) que se preparó usando 10 mg de proteína de fusión-MBP recombinante purificada no específica por gramo de CNBr-SEPHAROSE. Los anticuerpos policlonales específicos para huzcytor17/MBP-6H se purificaron por afinidad a partir del suero de conejo preadsorbido usando una columna de proteína CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB) que se preparó usando 10 mg de la proteína recombinante purificada de antígeno específico huzcytor17/MBP-6H. Después de la purificación, los anticuerpos policlonales se dializaron con 4 cambios de 20 veces el volumen de anticuerpo de PBS durante un periodo de tiempo de al menos 8 horas. Los anticuerpos específicos de ligando de huzcytor17 se caracterizaron por ELISA usando 500 ng/ml de las proteínas recombinantes purificadas huzcytor17L/MBP-6H o huzcytor17L-CEE producidas en un sistema de expresión de baculovirus como dianas de anticuerpo. El límite inferior de detección (LID) del anticuerpo de conejo anti-huzcytor17L/MBP-6H purificado por afinidad fue 100 pg/ml sobre su antígeno recombinante purificado específico huzcytor17L/MBP-6H y 500 pg/ml sobre huzcytor17L-CEE recombinante purificado producido en un sistema de expresión de baculovirus.

B. SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western de anticuerpo de conejo anti-ZcytoR17lig humano MBP-6H

- Se ensayó anticuerpo de conejo anti-ZcytoR17 MBP-6H humano por SDS-PAGE (NuPage 4-12 %, Invitrogen, Carlsbad, CA) con el procedimiento de tinción con coomassie y transferencia de Western usando IgG de cabra anti-conejo-HRP. La proteína purificada (200-25 ng) zcytor17lig de ratón y humana se sometieron a electroporación usando una mini-cell Xcell II de Novex de Invitrogen y se transfirieron a nitrocelulosa (0,2 mm; Invitrogen, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente usando el módulo de transferencia Xcell de Novex con agitación de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el manual del instrumento. La transferencia se realizó a 300 mA durante una hora en un tampón que contenía base Tris 25 mM, glicina 200 mM, y metanol al 20 %. El filtro después se bloqueó con tampón A de Western (interno, Tris 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, pH 8,0, Igepal CA-630 al 0,05 %, NaCl 150 mM, y gelatina al 0,25 %) durante una noche con agitación suave a 4 °C. La nitrocelulosa se aclaró rápidamente y después se añadió el anticuerpo de conejo anti-zcytoR17 MBP-6H humano (1:1000) en tampón A de Western. La mancha de transferencia se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La mancha de transferencia se aclaró 3 veces durante 5 minutos cada vez en Western A, y después se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-HRP (1:5000) en tampón A de Western A. La mancha de transferencia se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. La mancha de transferencia se aclaró 3 veces durante 5 minutos cada vez en Western A, y después se aclaró rápidamente en H₂O. La mancha de transferencia se reveló usando reactivos de sustratos quimioluminiscentes disponibles en el mercado (reactivos de detección de transferencia CLWestern 1 y 2 mezclados 1:1; reactivos obtenidos de Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) y la mancha de transferencia se expuso a una película de rayos X durante hasta 5 minutos.
- El zcytor17lig humano purificado apareció como una banda grande a aproximadamente 30 kDa y una banda más pequeña a aproximadamente 20 kDa en condiciones reducidas. El zcytor17lig de ratón no se detectó por el anticuerpo de conejo anti-zcytor17lig humano.

Ejemplo 47Efectos de Zcytor17lig sobre la Adhesión de Monocitos U937 a una Monocapa de Células Endoteliales de Médula Ósea Transformada (TRBMEC)

- Se aceleraron Células Endoteliales de Médula Ósea Transformadas (TRBMEC) en grupos de tejidos de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de 25.000/pocillo en medio M131 (Cascade Biologics) suplementado con Suplemento de Crecimiento Microvascular (MVGS) (Cascade Biologics). Cuando alcanzaron la confluencia (24 horas después), las células se cambiaron a M199 (Gibco-Life Technologies) suplementado con Suero Bovino Fetal al 1 % (Hyclone). Se añadió zcytor17lig recombinante humano (reactivo de ensayo) a diversas concentraciones (de 0,4 a 10 ng/ml) (véase la Tabla 21 proporcionada a continuación) para ensayar el efecto de la proteína sobre las interacciones células inmunes-células endoteliales que daban como resultado adhesión. Algunos pocillos recibieron 0,3 ng/ml de Factor de Necrosis Tumoral (TNFalfa R&D Systems), una citocina proinflamatoria conocida, además de zcytor17lig, para ensayar el efecto de la proteína sobre las células endoteliales en condiciones inflamatorias. Como control positivo se usó TNFalfa a 0,3 ng/ml solo y la concentración usada representa aproximadamente un 70 % del efecto máximo de TNFalfa en este sistema, es decir, no induce la adherencia máxima de las células U937 (una línea celular similar a monocitos humanos) al endotelio. Por esta razón, este sistema puede detectar tanto la regulación positiva como la regulación negativa de los efectos del TNFalfa. Los niveles basales de adhesión tanto con como sin TNFalfa se usaron como valor basal para evaluar el efecto de los reactivos de ensayo.
- Después de una incubación de una noche de las células endoteliales con los reactivos de ensayo (zcytor17ligando ± TNFalfa), células U937 teñidas con marcador fluorescente Calceína-AM 5 µM (Molecular Probes), las células se suspendieron en RPMI 1640 (sin rojo de fenol) suplementado con FBS al 1 % y se cultivaron a 100.00 células/pocillo en la monocapa de TRBMEC aclarada. Se midieron los niveles de fluorescencia a longitudes de onda de excitación/emisión de 485/538 nm (lector de microplacas Molecular Devices, aplicación CytoFluor) 30 minutos después, antes y después de aclarar los pocillos tres veces con RPMI 1640 caliente (sin rojo de fenol), para retirar las U937 no adherentes. Se usaron los niveles de fluorescencia antes del aclarado (total) y después del aclarado (específico de adherencia) para determinar el porcentaje de adherencia (adherente neto/total neto x 100 = % de adherencia).
- Como puede verse en la Tabla 21 mostrada a continuación, cuando se añadía zcytor17lig solo afectaba a la adherencia basal de las células U937 a las monocapas endoteliales en el intervalo de concentraciones usado (aumentos menores de 2 veces, p<0,01 por ensayo ANOVA). Por sí mismo, el control positivo, 0,3 ng/ml de TNFalfa, aumentaba la adherencia de las células U937 desde un nivel basal del 5,8 % al 35 % (6-veces). En presencia de TNFalfa, zcytor17 sinergizaba con TNFalfa y aumentaba adicionalmente la adhesión a U937 de una manera dependiente de la concentración entre 0,4 y 10 ng/ml (p<0,01 por ensayo ANOVA). A 10 ng/ml, zcytor17lig aumentaba el efecto de TNFalfa en un 62 %. Estos resultados indican que zcytor17lig puede ser por sí mismo un agente proinflamatorio. Zcytor17lig podía sinergizar con concentraciones submáximas de TNFalfa para aumentar la adherencia de los monocitos a las células endoteliales. Estos resultados también muestran que las células endoteliales, especialmente cuando se exponen a citocinas pro-inflamatorias tales como TNFalfa, probablemente son un tejido diana de la acción de zcytor17lig. La consecuencia de zcytor17ligando sobre las células endoteliales puede ser elevar la adhesión de monocitos o macrófagos a un sitio de actividad proinflamatoria. Los monocitos y

5 macrófagos activados son importantes en muchas enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, la inhibición de las adhesiones de monocito/macrófagos puede proporcionar un fundamento terapéutico para los antagonistas de zcytor17ligando. Estos datos respaldarían el uso de antagonistas de zcytor17ligando para el tratamiento de enfermedades pulmonares, enfermedades vasculares, autoinmunidad, metástasis tumorales, enfermedades que implican reacciones alérgicas, curación de heridas y enfermedades de la piel incluyendo dermatitis de contacto, alérgicas o no alérgicas o psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal. La Tabla 21 muestra los efectos de zcytor17lig sobre la adhesión de monocitos U937 a monocapas endoteliales TRBMEC. Los resultados se expresan en porcentaje de adhesión y los números son la media \pm desviación típica de pocillos por triplicado.

Tabla 21

	<i>Basal</i>	<i>0,3 ng/ml de TNFalfa</i>
Basal	5,8 \pm 1,2	35 \pm 5,5
zcytor17lig 0,4 ng/ml	9 \pm 0,7	44,7 \pm 2,5
zcytor17lig 1,1 ng/ml	10,4 \pm 0,8	45,2 \pm 0,6
zcytor17lig 3,3 ng/ml	7,9 \pm 1,7	51,1 \pm 4
zcytor17lig 10 ng/ml	9,5 \pm 0,5	56,6 \pm 3,9

10

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ZymoGenetics, Inc.
- 15 <120> NUEVO LIGANDO DE CITOCINA ZCYTOR17
- <130> P26813EP-D2-PCT
- <140> EP 08102636.1
- 20 <141> 21-01-2003
- <150> US 60/350.325
- <151> 18-01-2002
- 25 <150> US 60/375.323
- <151> 25-04-2002
- <150> US 60/435.315
- <151> 19-12-2002
- 30 <160> 168
- <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
- 35 <210> 1
- <211> 904
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 40 <220>
- <221> CDS
- <222> (28)...(519)
- <400> 1
- 45

ES 2 377 188 T3

```

ctgaagctgg ccttgctctc tctcgcc atg gcc tct cac tca ggc ccc tcg acg 54
Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr
1 5

tct gtg ctc ttt ctg ttc tgc tgc ctg gga ggc tgg ctg gcc tcc cac 102
Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys Cys Leu Gly Trp Leu Ala Ser His
10 15 20 25

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

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

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

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

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

90 95 100 105

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

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

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

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

ggattggcag gaacttaagg agccttaaaa agatgaccga cagctaagtg tgggaactct 599
gccgtgattc cttaagtaca tttttccaat gaataatctc agggaccctt catatgggct 659
agtcccgga gggctgagat gtgaatttgt gaattacctt gaaaaacatt aggttattgt 719
tattagtctt ggtatttatg gaatgctttt cttctgcagg cttaagtctt acttattata 779
ccctcgtgag ggtgggaggt ggcagctatg ttaatttatt gatatttatt gtactaagag 839
ttgtcaatgc tccctggggg agccctcgga atctatttaa taaattatat tgaatttttc 899
tcata 904

```

<210> 2
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

5

ES 2 377 188 T3

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

5 <210> 3
 <211> 492
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polinucleótido degenerado de zcytor17lig humano de la SEC ID N°: 2
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(492)
 <223> n = A, T, C o G

15 <400> 3

```

atggcnwsnc aywsnggncc nwsnacnwsn gtnytnttyy tnttytgytg yytnggnggn 60
tggytngcnw sncayacnyt nccngtnmgn ytnytnmgnc cnwsngayga ygtncaraar 120
athgtngarg arytncarws nytnwsnaar atgytnytna argaytnga rgargaraar 180
ggngtnytng tnwsncaraa ytayacnytn ccntgyytnw snccngaygc ncarccnccn 240
aayaayathc aywsnccngc nathmgngcn tayytnaara cnathmgncn rytngayaay 300
aarwsngtna thgaygarat hathgarcaay ytnngayaary tnathttyca rgaygcncn 360
garacnaaya thwsngtncc nacngayacn caygartgya armgnttyat hytnacnath 420
wsncarcart tywsngartg yatggayytn gcnytnaarw snytnacnws ngngncncar 480
cargcnacna cn 492
  
```

20 <210> 4
 <211> 2903
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (497)...(2482)
 <400> 4

ES 2 377 188 T3

```

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

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

ttc agc ctg gca gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc 628
Phe Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val
      30             35             40

tac tac tat agg aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa 676
Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu
      45             50             55             60

acc agt tat acc cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa 724
Thr Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu
      65             70             75

aaa cat gat aat tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct 772
Lys His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala
      80             85             90

```

ES 2 377 188 T3

tcg tgc tct ttt ttc ctt cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc	820
Ser Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr	
95 100 105	
att gag gtg gaa gct gaa aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg	868
Ile Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met	
110 115 120	
aca tac tgg aga tta gag aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att	916
Thr Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile	
125 130 135 140	
ttc cgt gtg aaa cca gtt ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa	964
Phe Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu	
145 150 155	
tgg ata aag cct gag ttg gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca	1012
Trp Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr	
160 165 170	
ctt cga ttc agg aca gtc aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc	1060
Leu Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe	
175 180 185	
gct aag aac cgt aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg	1108
Ala Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu	
190 195 200	
cag cct ttt aca gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag	1156
Gln Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu	
205 210 215 220	
tca aag ttc tgg agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag	1204
Ser Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu	
225 230 235	
gaa gaa gct cca tgt ggc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct	1252
Glu Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala	
240 245 250	
gag gcg gat gga aga agg cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga	1300
Glu Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg	
255 260 265	
gga gcc cca gtc cta gag aaa aca ctt ggc tac aac ata tgg tac tat	1348
Gly Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr	
270 275 280	
cca gaa agc aac act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag	1396
Pro Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln	
285 290 295 300	
cag ctt gaa ctg cat ctg gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att	1444
Gln Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile	
305 310 315	
tct tat aat tct ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca	1492
Ser Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro	
320 325 330	
gct att caa gaa aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc	1540

ES 2 377 188 T3

Ala	Ile	Gln	Glu	Lys	Ser	Phe	Gln	Cys	Ile	Glu	Val	Met	Gln	Ala	Cys		
		335					340					345					
ggt	gct	gag	gac	cag	cta	gtg	gtg	aag	tgg	caa	agc	tct	gct	cta	gac	1588	
Val	Ala	Glu	Asp	Gln	Leu	Val	Val	Lys	Trp	Gln	Ser	Ser	Ala	Leu	Asp		
		350				355					360						
gtg	aac	act	tgg	atg	att	gaa	tgg	ttt	ccg	gat	gtg	gac	tca	gag	ccc	1636	
Val	Asn	Thr	Trp	Met	Ile	Glu	Trp	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Ser	Glu	Pro		
					370					375					380		
acc	acc	ctt	tcc	tgg	gaa	tct	gtg	tct	cag	gcc	acg	aac	tgg	acg	atc	1684	
Thr	Thr	Leu	Ser	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile		
				385					390					395			
cag	caa	gat	aaa	tta	aaa	cct	ttc	tgg	tgc	tat	aac	atc	tct	gtg	tat	1732	
Gln	Gln	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Phe	Trp	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr		
			400					405					410				
cca	atg	ttg	cat	gac	aaa	gtt	ggc	gag	cca	tat	tcc	atc	cag	gct	tat	1780	
Pro	Met	Leu	His	Asp	Lys	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr		
		415				420						425					
gcc	aaa	gaa	ggc	ggt	cca	tca	gaa	ggt	cct	gag	acc	aag	gtg	gag	aac	1828	
Ala	Lys	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Glu	Thr	Lys	Val	Glu	Asn		
		430				435					440						
att	ggc	gtg	aag	acg	gtc	acg	atc	aca	tgg	aaa	gag	att	ccc	aag	agt	1876	
Ile	Gly	Val	Lys	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser		
					450					455				460			
gag	aga	aag	ggt	atc	atc	tgc	aac	tac	acc	atc	ttt	tac	caa	gct	gaa	1924	
Glu	Arg	Lys	Gly	Ile	Ile	Cys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu		
				465					470					475			
ggt	gga	aaa	gga	ttc	tcc	aag	aca	gtc	aat	tcc	agc	atc	ttg	cag	tac	1972	
Gly	Gly	Lys	Gly	Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Tyr		
			480					485						490			
ggc	ctg	gag	tcc	ctg	aaa	cga	aag	acc	tct	tac	att	ggt	cag	gtc	atg	2020	
Gly	Leu	Glu	Ser	Leu	Lys	Arg	Lys	Thr	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Val	Met		
			495				500						505				
gcc	agc	acc	agt	gct	ggg	gga	acc	aac	ggg	acc	agc	ata	aat	ttc	aag	2068	
Ala	Ser	Thr	Ser	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Asn	Phe	Lys		
		510				515						520					
aca	ttg	tca	ttc	agt	gtc	ttt	gag	att	atc	ctc	ata	act	tct	ctg	att	2116	
Thr	Leu	Ser	Phe	Ser	Val	Phe	Glu	Ile	Ile	Leu	Ile	Thr	Ser	Leu	Ile		
					530					535					540		
ggt	gga	ggc	ctt	ctt	att	ctc	att	atc	ctg	aca	gtg	gca	tat	ggt	ctc	2164	
Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	Ile	Leu	Ile	Ile	Leu	Thr	Val	Ala	Tyr	Gly	Leu		
				545					550					555			
aaa	aaa	ccc	aac	aaa	ttg	act	cat	ctg	tgt	tgg	ccc	acc	ggt	ccc	aac	2212	
Lys	Lys	Pro	Asn	Lys	Leu	Thr	His	Leu	Cys	Trp	Pro	Thr	Val	Pro	Asn		
			560					565					570				
cct	gct	gaa	agt	agt	ata	gcc	aca	tgg	cat	gga	gat	gat	ttc	aag	gat	2260	
Pro	Ala	Glu	Ser	Ser	Ile	Ala	Thr	Trp	His	Gly	Asp	Asp	Phe	Lys	Asp		

ES 2 377 188 T3

575	580	585	
aag cta aac ctg aag gag tct gat gac tct gtg aac aca gaa gac agg			2308
Lys Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg			
590	595	600	
atc tta aaa cca tgt tcc acc ccc agt gac aag ttg gtg att gac aag			2356
Ile Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys			
605	610	615	620
ttg gtg gtg aac ttt ggg aat gtt ctg caa gaa att ttc aca gat gaa			2404
Leu Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu			
625	630	635	
gcc aga acg ggt cag gaa aac aat tta gga ggg gaa aag aat ggg act			2452
Ala Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr			
640	645	650	
aga att ctg tct tcc tgc cca act tca ata taagtgtgga ctaaaatgcg			2502
Arg Ile Leu Ser Ser Cys Pro Thr Ser Ile			
655	660		
agaaaggtgt cctgtggtct atgcaaatta gaaaggacat gcagagtttt ccaactagga			2562
agactgaatc tgtggcccca agagaacat cctcgaagac tgggtatgtg gtctttcca			2622
cacatggacc acctacggat gcaatctgta atgcatgtgc atgagaagtc tgttattaag			2682
tagagtgtga aaacatggtt atggtaatag gaacagcttt taaaatgctt ttgtatttg			2742
gcctttcata caaaaaagcc ataataccat tttcatgtaa tgctatactt ctatactatt			2802
ttcatgtaat actatacttc tatactatctt tcatgtaata ctatacttct atactatctt			2862
catgtaatac tatacttcta tattaagtt ttaccactc a			2903

<210> 5
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 5

5

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

10

ES 2 377 188 T3

			195						200					205			
Glu	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu	Arg	Cys	Ala	Val	Lys	Glu	Ser	Lys	Phe	Trp		
	210					215					220						
Ser	Asp	Trp	Ser	Gln	Glu	Lys	Met	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro		
225					230					235					240		
Cys	Gly	Leu	Glu	Leu	Trp	Arg	Val	Leu	Lys	Pro	Ala	Glu	Ala	Asp	Gly		
				245					250					255			
Arg	Arg	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val		
			260					265					270				
Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Trp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Ser	Asn		
		275					280					285					
Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Thr	Met	Asn	Thr	Thr	Asn	Gln	Gln	Leu	Glu	Leu		
	290					295					300						
His	Leu	Gly	Gly	Glu	Ser	Phe	Trp	Val	Ser	Met	Ile	Ser	Tyr	Asn	Ser		
305					310					315					320		
Leu	Gly	Lys	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Ile	Pro	Ala	Ile	Gln	Glu		
				325					330					335			
Lys	Ser	Phe	Gln	Cys	Ile	Glu	Val	Met	Gln	Ala	Cys	Val	Ala	Glu	Asp		
			340					345				350					
Gln	Leu	Val	Val	Lys	Trp	Gln	Ser	Ser	Ala	Leu	Asp	Val	Asn	Thr	Trp		
		355					360				365						
Met	Ile	Glu	Trp	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Ser	Glu	Pro	Thr	Thr	Leu	Ser		
	370					375					380						
Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Gln	Gln	Asp	Lys		
385					390					395					400		
Leu	Lys	Pro	Phe	Trp	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	Met	Leu	His		
				405					410					415			
Asp	Lys	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	Lys	Glu	Gly		
			420					425				430					
Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Glu	Thr	Lys	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Val	Lys		
		435					440					445					
Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Glu	Arg	Lys	Gly		
	450					455					460						
Ile	Ile	Cys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Gly		
465					470					475					480		
Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Tyr	Gly	Leu	Glu	Ser		
				485					490					495			
Leu	Lys	Arg	Lys	Thr	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Val	Met	Ala	Ser	Thr	Ser		
			500					505					510				
Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Asn	Phe	Lys	Thr	Leu	Ser	Phe		
		515					520					525					
Ser	Val	Phe	Glu	Ile	Ile	Leu	Ile	Thr	Ser	Leu	Ile	Gly	Gly	Gly	Leu		
	530					535					540						
Leu	Ile	Leu	Ile	Ile	Leu	Thr	Val	Ala	Tyr	Gly	Leu	Lys	Lys	Pro	Asn		
545					550					555					560		
Lys	Leu	Thr	His	Leu	Cys	Trp	Pro	Thr	Val	Pro	Asn	Pro	Ala	Glu	Ser		
				565					570					575			
Ser	Ile	Ala	Thr	Trp	His	Gly	Asp	Asp	Phe	Lys	Asp	Lys	Leu	Asn	Leu		
			580				585						590				
Lys	Glu	Ser	Asp	Asp	Ser	Val	Asn	Thr	Glu	Asp	Arg	Ile	Leu	Lys	Pro		
		595					600				605						
Cys	Ser	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Leu	Val	Ile	Asp	Lys	Leu	Val	Val	Asn		
	610					615					620						
Phe	Gly	Asn	Val	Leu	Gln	Glu	Ile	Phe	Thr	Asp	Glu	Ala	Arg	Thr	Gly		
625					630					635					640		
Gln	Glu	Asn	Asn	Leu	Gly	Gly	Glu	Lys	Asn	Gly	Thr	Arg	Ile	Leu	Ser		
				645					650					655			
Ser	Cys	Pro	Thr	Ser	Ile												
			660														

<210> 6
 <211> 2964
 <212> ADN

ES 2 377 188 T3

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

5 <222> (13)...(2949)

<400> 6

```

gaattogcca cc atg gct cta ttt gca gtc ttt cag aca aca ttc ttc tta 51
      Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu
          1              5              10

aca ttg ctg tcc ttg agg act tac cag agt gaa gtc ttg gct gaa cgt 99
Thr Leu Leu Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg
      15              20              25

tta cca ttg act cct gta tca ctt aaa gtt tcc acc aat tct acg cgt 147
Leu Pro Leu Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg
      30              35              40              45

cag agt ttg cac tta caa tgg act gtc cac aac ctt cct tat cat cag 195
Gln Ser Leu His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln
          50              55              60

gaa ttg aaa atg gta ttt cag atc cag atc agt agg att gaa aca tcc 243
Glu Leu Lys Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser
          65              70              75

aat gtc atc tgg gtg ggg aat tac agc acc act gtg aag tgg aac cag 291
Asn Val Ile Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln
          80              85              90

gtt ctg cat tgg agc tgg gaa tct gag ctc cct ttg gaa tgt gcc aca 339
Val Leu His Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr
          95              100              105

cac ttt gta aga ata aag agt ttg gtg gac gat gcc aag ttc cct gag 387
His Phe Val Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu
      110              115              120              125

cca aat ttc tgg agc aac tgg agt tcc tgg gag gaa gtc agt gta caa 435
Pro Asn Phe Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln
          130              135              140

gat tct act gga cag gat ata ttg ttc gtt ttc cct aaa gat aag ctg 483
Asp Ser Thr Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu
          145              150              155

gtg gaa gaa ggc acc aat gtt acc att tgt tac gtt tct agg aac att 531
Val Glu Glu Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile
          160              165              170

caa aat aat gta tcc tgt tat ttg gaa ggg aaa cag att cat gga gaa 579
Gln Asn Asn Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu
          175              180              185

caa ctt gat cca cat gta act gca ttc aac ttg aat agt gtg cct ttc 627
Gln Leu Asp Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe
      190              195              200              205

```

ES 2 377 188 T3

att agg aat aaa ggg aca aat atc tat tgt gag gca agt caa gga aat	675
Ile Arg Asn Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn	
210 215 220	
gtc agt gaa ggc atg aaa ggc atc gtt ctt ttt gtc tca aaa gta ctt	723
Val Ser Glu Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu	
225 230 235	
gag gag ccc aag gac ttt tct tgt gaa acc gag gac ttc aag act ttg	771
Glu Glu Pro Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu	
240 245 250	
cac tgt act tgg gat cct ggg acg gac act gcc ttg ggg tgg tct aaa	819
His Cys Thr Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys	
255 260 265	
caa cct tcc caa agc tac act tta ttt gaa tca ttt tct ggg gaa aag	867
Gln Pro Ser Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys	
270 275 280 285	
aaa ctt tgt aca cac aaa aac tgg tgt aat tgg caa ata act caa gac	915
Lys Leu Cys Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp	
290 295 300	
tca caa gaa acc tat aac ttc aca ctc ata gct gaa aat tac tta agg	963
Ser Gln Glu Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg	
305 310 315	
aag aga agt gtc aat atc ctt ttt aac ctg act cat cga gtt tat tta	1011
Lys Arg Ser Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu	
320 325 330	
atg aat cct ttt agt gtc aac ttt gaa aat gta aat gcc aca aat gcc	1059
Met Asn Pro Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala	
335 340 345	
atc atg acc tgg aag gtg cac tcc ata agg aat aat ttc aca tat ttg	1107
Ile Met Thr Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu	
350 355 360 365	
tgt cag att gaa ctc cat ggt gaa gga aaa atg atg caa tac aat gtt	1155
Cys Gln Ile Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val	
370 375 380	
tcc atc aag gtg aac ggt gag tac ttc tta agt gaa ctg gaa cct gcc	1203
Ser Ile Lys Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala	
385 390 395	
aca gag tac atg gcg cga gta cgg tgt gct gat gcc agc cac ttc tgg	1251
Thr Glu Tyr Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp	
400 405 410	
aaa tgg agt gaa tgg agt ggt cag aac ttc acc aca ctt gaa gct gct	1299
Lys Trp Ser Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala	
415 420 425	
ccc tca gag gcc cct gat gtc tgg aga att gtg agc ttg gag cca gga	1347
Pro Ser Glu Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly	
430 435 440 445	

ES 2 377 188 T3

aat cat act gtg acc tta ttc tgg aag cca tta tca aaa ctg cat gcc	1395
Asn His Thr Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala	
450 455 460	
aat gga aag atc ctg ttc tat aat gta gtt gta gaa aac cta gac aaa	1443
Asn Gly Lys Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys	
465 470 475	
cca tcc agt tca gag ctc cat tcc att cca gca cca gcc aac agc aca	1491
Pro Ser Ser Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr	
480 485 490	
aaa cta atc ctt gac agg tgt tcc tac caa atc tgc gtc ata gcc aac	1539
Lys Leu Ile Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn	
495 500 505	
aac agt gtg ggt gct tct cct gct tct gta ata gtc atc tct gca gac	1587
Asn Ser Val Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp	
510 515 520 525	
ccc gaa aac aaa gag gtt gag gaa gaa aga att gca ggc aca gag ggt	1635
Pro Glu Asn Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly	
530 535 540	
gga ttc tct ctg tct tgg aaa ccc caa cct gga gat gtt ata ggc tat	1683
Gly Phe Ser Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr	
545 550 555	
gtt gtg gac tgg tgt gac cat acc cag gat gtg ctc ggt gat ttc cag	1731
Val Val Asp Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln	
560 565 570	
tgg aag aat gta ggt ccc aat acc aca agc aca gtc att agc aca gat	1779
Trp Lys Asn Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp	
575 580 585	
gct ttt agg cca gga gtt cga tat gac ttc aga att tat ggg tta tct	1827
Ala Phe Arg Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser	
590 595 600 605	
aca aaa agg att gct tgt tta tta gag aaa aaa aca gga tac tct cag	1875
Thr Lys Arg Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln	
610 615 620	
gaa ctt gct cct tca gac aac cct cac gtg ctg gtg gat aca ttg aca	1923
Glu Leu Ala Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr	
625 630 635	
tcc cac tcc ttc act ctg agt tgg aaa gat tac tct act gaa tct caa	1971
Ser His Ser Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln	
640 645 650	
cct ggt ttt ata caa ggg tac cat gtc tat ctg aaa tcc aag gcg agg	2019
Pro Gly Phe Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg	
655 660 665	
cag tgc cac cca cga ttt gaa aag gca gtt ctt tca gat ggt tca gaa	2067
Gln Cys His Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu	
670 675 680 685	
tgt tgc aaa tac aaa att gac aac ccg gaa gaa aag gca ttg att gtg	2115

ES 2 377 188 T3

Cys	Cys	Lys	Tyr	Lys	Ile	Asp	Asn	Pro	Glu	Glu	Lys	Ala	Leu	Ile	Val		
				690					695					700			
gac	aac	cta	aag	cca	gaa	tcc	ttc	tat	gag	ttt	ttc	atc	act	cca	ttc	2163	
Asp	Asn	Leu	Lys	Pro	Glu	Ser	Phe	Tyr	Glu	Phe	Phe	Ile	Thr	Pro	Phe		
			705					710					715				
act	agt	gct	ggt	gaa	ggc	ccc	agt	gct	acg	ttc	acg	aag	gtc	acg	act	2211	
Thr	Ser	Ala	Gly	Glu	Gly	Pro	Ser	Ala	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Thr	Thr		
			720					725					730				
ccg	gat	gaa	cac	tcc	tcg	atg	ctg	att	cat	atc	cta	ctg	ccc	atg	gtt	2259	
Pro	Asp	Glu	His	Ser	Ser	Met	Leu	Ile	His	Ile	Leu	Leu	Pro	Met	Val		
			735				740						745				
ttc	tgc	gtc	ttg	ctc	atc	atg	gtc	atg	tgc	tac	ttg	aaa	agt	cag	tgg	2307	
Phe	Cys	Val	Leu	Leu	Ile	Met	Val	Met	Cys	Tyr	Leu	Lys	Ser	Gln	Trp		
			750			755				760					765		
atc	aag	gag	acc	tgt	tat	cct	gac	atc	cct	gac	cct	tac	aag	agc	agc	2355	
Ile	Lys	Glu	Thr	Cys	Tyr	Pro	Asp	Ile	Pro	Asp	Pro	Tyr	Lys	Ser	Ser		
				770						775					780		
atc	ctg	tca	tta	ata	aaa	ttc	aag	gag	aac	cct	cac	cta	ata	ata	atg	2403	
Ile	Leu	Ser	Leu	Ile	Lys	Phe	Lys	Glu	Asn	Pro	His	Leu	Ile	Ile	Met		
				785				790							795		
aat	gtc	agt	gac	tgt	atc	cca	gat	gct	att	gaa	gtt	gta	agc	aag	cca	2451	
Asn	Val	Ser	Asp	Cys	Ile	Pro	Asp	Ala	Ile	Glu	Val	Val	Ser	Lys	Pro		
				800				805							810		
gaa	ggg	aca	aag	ata	cag	ttc	cta	ggc	act	agg	aag	tca	ctc	aca	gaa	2499	
Glu	Gly	Thr	Lys	Ile	Gln	Phe	Leu	Gly	Thr	Arg	Lys	Ser	Leu	Thr	Glu		
			815				820					825					
acc	gag	ttg	act	aag	cct	aac	tac	ctt	tat	ctc	ctt	cca	aca	gaa	aag	2547	
Thr	Glu	Leu	Thr	Lys	Pro	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Glu	Lys		
						835					840				845		
aat	cac	tct	ggc	cct	ggc	ccc	tgc	atc	tgt	ttt	gag	aac	ttg	acc	tat	2595	
Asn	His	Ser	Gly	Pro	Gly	Pro	Cys	Ile	Cys	Phe	Glu	Asn	Leu	Thr	Tyr		
					850					855					860		
aac	cag	gca	gct	tct	gac	tct	ggc	tct	tgt	ggc	cat	gtt	cca	gta	tcc	2643	
Asn	Gln	Ala	Ala	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Cys	Gly	His	Val	Pro	Val	Ser		
					865				870						875		
cca	aaa	gcc	cca	agt	atg	ctg	gga	cta	atg	acc	tca	cct	gaa	aat	gta	2691	
Pro	Lys	Ala	Pro	Ser	Met	Leu	Gly	Leu	Met	Thr	Ser	Pro	Glu	Asn	Val		
					880			885							890		
cta	aag	gca	cta	gaa	aaa	aac	tac	atg	aac	tcc	ctg	gga	gaa	atc	cca	2739	
Leu	Lys	Ala	Leu	Glu	Lys	Asn	Tyr	Met	Asn	Ser	Leu	Gly	Glu	Ile	Pro		
						900						905					
gct	gga	gaa	aca	agt	ttg	aat	tat	gtg	tcc	cag	ttg	gct	tca	ccc	atg	2787	
Ala	Gly	Glu	Thr	Ser	Leu	Asn	Tyr	Val	Ser	Gln	Leu	Ala	Ser	Pro	Met		
						915					920				925		
ttt	gga	gac	aag	gac	agt	ctc	cca	aca	aac	cca	gta	gag	gca	cca	cac	2835	
Phe	Gly	Asp	Lys	Asp	Ser	Leu	Pro	Thr	Asn	Pro	Val	Glu	Ala	Pro	His		

ES 2 377 188 T3

```

          930              935              940
tgt tca gag tat aaa atg caa atg gca gtc tcc ctg cgt ctt gcc ttg 2883
Cys Ser Glu Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu
          945              950              955

cct ccc ccg acc gag aat agc agc ctc tcc tca att acc ctt tta gat 2931
Pro Pro Pro Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp
          960              965              970

cca ggt gaa cac tac tgc taaccagcac tcgag 2964
Pro Gly Glu His Tyr Cys
          975

```

<210> 7
 <211> 979
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

```

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

```

10

ES 2 377 188 T3

Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu Met Asn Pro
 325 330 335
 Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile Met Thr
 340 345 350
 Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys Gln Ile
 355 360 365
 Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val Ser Ile Lys
 370 375 380
 Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr
 385 390 395 400
 Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys Trp Ser
 405 410 415
 Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro Ser Glu
 420 425 430
 Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn His Thr
 435 440 445
 Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn Gly Lys
 450 455 460
 Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro Ser Ser
 465 470 475 480
 Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile
 485 490 495
 Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val
 500 505 510
 Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn
 515 520 525
 Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Gly Phe Ser
 530 535 540
 Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp
 545 550 555 560
 Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn
 565 570 575
 Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg
 580 585 590
 Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg
 595 600 605
 Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala
 610 615 620
 Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser
 625 630 635 640
 Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe
 645 650 655
 Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His
 660 665 670
 Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys
 675 680 685
 Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu
 690 695 700
 Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala
 705 710 715 720
 Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu
 725 730 735
 His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val Phe Cys Val
 740 745 750
 Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Ile Lys Glu
 755 760 765
 Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser
 770 775 780
 Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met Asn Val Ser
 785 790 795 800
 Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro Glu Gly Thr

ES 2 377 188 T3

```

                805                810                815
Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu Thr Glu Leu
                820                825                830
Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys Asn His Ser
                835                840                845
Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr Asn Gln Ala
                850                855                860
Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser Pro Lys Ala
865                870                875
Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val Leu Lys Ala
                885                890                895
Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro Ala Gly Glu
                900                905                910
Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met Phe Gly Asp
                915                920                925
Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His Cys Ser Glu
                930                935                940
Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu Pro Pro Pro
945                950                955                960
Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp Pro Gly Glu
                965                970                975
His Tyr Cys

```

<210> 8
 <211> 2657
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (133)...(2040)

10

<400> 8

```

cggaggcggc ctgccggggt ggttcggctt cccggtgccc cctcgggcgc tgtaccaga 60
gctcgaagag gagcagcgcg gccgcgcgga cccggcaagg ctgggccgga ctoggggctc 120
ccgagggacg cc atg cgg gga gcc agg gcc cct ttc tgg ctg tgg ccg 171
      Met Arg Gly Gly Arg Gly Ala Pro Phe Trp Leu Trp Pro
              1                5                10

ctg ccc aag ctg gcg ctg ctg cct ctg ttg tgg gtg ctt ttc cag cgg 219
Leu Pro Lys Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Trp Val Leu Phe Gln Arg
      15                20                25

acg cgt ccc cag gcc agc gcc ggg cca ctg cag tgc tac gga gtt gga 267
Thr Arg Pro Gln Gly Ser Ala Gly Pro Leu Gln Cys Tyr Gly Val Gly
      30                35                40                45

ccc ttg ggc gac ttg aac tgc tcg tgg gag cct ctt ggg gac ctg gga 315
Pro Leu Gly Asp Leu Asn Cys Ser Trp Glu Pro Leu Gly Asp Leu Gly
              50                55                60

gcc ccc tcc gag tta cac ctc cag agc caa aag tac cgt tcc aac aaa 363
Ala Pro Ser Glu Leu His Leu Gln Ser Gln Lys Tyr Arg Ser Asn Lys
              65                70                75

acc cag act gtg gca gtg gca gcc gga cgg agc tgg gtg gcc att cct 411
Thr Gln Thr Val Ala Val Ala Ala Gly Arg Ser Trp Val Ala Ile Pro
              80                85                90

```

ES 2 377 188 T3

cgg gaa cag ctc acc atg tct gac aaa ctc ctt gtc tgg ggc act aag	459
Arg Glu Gln Leu Thr Met Ser Asp Lys Leu Leu Val Trp Gly Thr Lys	
95 100 105	
gca ggc cag cct ctc tgg ccc ccc gtc ttc gtg aac cta gaa acc caa	507
Ala Gly Gln Pro Leu Trp Pro Pro Val Phe Val Asn Leu Glu Thr Gln	
110 115 120 125	
atg aag cca aac gcc ccc cgg ctg ggc cct gac gtg gac ttt tcc gag	555
Met Lys Pro Asn Ala Pro Arg Leu Gly Pro Asp Val Asp Phe Ser Glu	
130 135 140	
gat gac ccc ctg gag gcc act gtc cat tgg gcc cca cct aca tgg cca	603
Asp Asp Pro Leu Glu Ala Thr Val His Trp Ala Pro Pro Thr Trp Pro	
145 150 155	
tct cat aaa gtt ctg atc tgc cag ttc cac tac cga aga tgt cag gag	651
Ser His Lys Val Leu Ile Cys Gln Phe His Tyr Arg Arg Cys Gln Glu	
160 165 170	
gcg gcc tgg acc ctg ctg gaa ccg gag ctg aag acc ata ccc ctg acc	699
Ala Ala Trp Thr Leu Leu Glu Pro Glu Leu Lys Thr Ile Pro Leu Thr	
175 180 185	
cct gtt gag atc caa gat ttg gag cta gcc act ggc tac aaa gtg tat	747
Pro Val Glu Ile Gln Asp Leu Glu Leu Ala Thr Gly Tyr Lys Val Tyr	
190 195 200 205	
ggc cgc tgc cgg atg gag aaa gaa gag gat ttg tgg ggc gag tgg agc	795
Gly Arg Cys Arg Met Glu Lys Glu Glu Asp Leu Trp Gly Glu Trp Ser	
210 215 220	
ccc att ttg tcc ttc cag aca ccg cct tct gct cca aaa gat gtg tgg	843
Pro Ile Leu Ser Phe Gln Thr Pro Pro Ser Ala Pro Lys Asp Val Trp	
225 230 235	
gta tca ggg aac ctc tgt ggg acg cct gga gga gag gaa cct ttg ctt	891
Val Ser Gly Asn Leu Cys Gly Thr Pro Gly Gly Glu Glu Pro Leu Leu	
240 245 250	
cta tgg aag gcc cca ggg ccc tgt gtg cag gtg agc tac aaa gtc tgg	939
Leu Trp Lys Ala Pro Gly Pro Cys Val Gln Val Ser Tyr Lys Val Trp	
255 260 265	
ttc tgg gtt gga ggt cgt gag ctg agt cca gaa gga att acc tgc tgc	987
Phe Trp Val Gly Gly Arg Glu Leu Ser Pro Glu Gly Ile Thr Cys Cys	
270 275 280 285	
tgc tcc cta att ccc agt ggg gcg gag tgg gcc agg gtg tcc gct gtc	1035
Cys Ser Leu Ile Pro Ser Gly Ala Glu Trp Ala Arg Val Ser Ala Val	
290 295 300	
aac gcc aca agc tgg gag cct ctc acc aac ctc tct ttg gtc tgc ttg	1083
Asn Ala Thr Ser Trp Glu Pro Leu Thr Asn Leu Ser Leu Val Cys Leu	
305 310 315	
gat tca gcc tct gcc ccc cgt agc gtg gca gtc agc agc atc gct ggg	1131
Asp Ser Ala Ser Ala Pro Arg Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Ala Gly	
320 325 330	
agc acg gag cta ctg gtg acc tgg caa ccg ggg cct ggg gaa cca ctg	1179

ES 2 377 188 T3

Ser	Thr	Glu	Leu	Leu	Val	Thr	Trp	Gln	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Pro	Leu		
	335					340					345						
gag	cat	gta	gtg	gac	tgg	gct	cga	gat	ggg	gac	ccc	ctg	gag	aaa	ctc	1227	
Glu	His	Val	Val	Asp	Trp	Ala	Arg	Asp	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Lys	Leu		
350				355					360						365		
aac	tgg	gtc	cgg	ctt	ccc	cct	ggg	aac	ctc	agt	gct	ctg	tta	cca	ggg	1275	
Asn	Trp	Val	Arg	Leu	Pro	Pro	Gly	Asn	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Pro	Gly		
				370				375						380			
aat	ttc	act	gtc	ggg	gtc	ccc	tat	cga	atc	act	gtg	acc	gca	gtc	tct	1323	
Asn	Phe	Thr	Val	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Val	Ser		
			385					390					395				
gct	tca	ggc	ttg	gcc	tct	gca	tcc	tcc	gtc	tgg	ggg	ttc	agg	gag	gaa	1371	
Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Trp	Gly	Phe	Arg	Glu	Glu		
		400				405						410					
tta	gca	ccc	cta	gtg	ggg	cca	acg	ctt	tgg	cga	ctc	caa	gat	gcc	cct	1419	
Leu	Ala	Pro	Leu	Val	Gly	Pro	Thr	Leu	Trp	Arg	Leu	Gln	Asp	Ala	Pro		
		415				420						425					
cca	ggg	acc	ccc	gcc	ata	gcg	tgg	gga	gag	gtc	cca	agg	cac	cag	ctt	1467	
Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Ile	Ala	Trp	Gly	Glu	Val	Pro	Arg	His	Gln	Leu		
430				435					440						445		
cga	ggc	cac	ctc	acc	cac	tac	acc	ttg	tgt	gca	cag	agt	gga	acc	agc	1515	
Arg	Gly	His	Leu	Thr	His	Tyr	Thr	Leu	Cys	Ala	Gln	Ser	Gly	Thr	Ser		
				450				455						460			
ccc	tcc	gtc	tgc	atg	aat	gtg	agt	ggc	aac	aca	cag	agt	gtc	acc	ctg	1563	
Pro	Ser	Val	Cys	Met	Asn	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Gln	Ser	Val	Thr	Leu		
			465					470					475				
cct	gac	ctt	cct	tgg	ggt	ccc	tgt	gag	ctg	tgg	gtg	aca	gca	tct	acc	1611	
Pro	Asp	Leu	Pro	Trp	Gly	Pro	Cys	Glu	Leu	Trp	Val	Thr	Ala	Ser	Thr		
		480				485						490					
atc	gct	gga	cag	ggc	cct	cct	ggt	ccc	atc	ctc	cgg	ctt	cat	cta	cca	1659	
Ile	Ala	Gly	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ile	Leu	Arg	Leu	His	Leu	Pro		
		495				500					505						
gat	aac	acc	ctg	agg	tgg	aaa	gtt	ctg	cca	ggc	atc	cta	ttc	ttg	tgg	1707	
Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Trp	Lys	Val	Leu	Pro	Gly	Ile	Leu	Phe	Leu	Trp		
510				515					520					525			
ggc	ttg	ttc	ctg	ttg	ggg	tgt	ggc	ctg	agc	ctg	gcc	acc	tct	gga	agg	1755	
Gly	Leu	Phe	Leu	Leu	Gly	Cys	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Thr	Ser	Gly	Arg		
				530				535						540			
tgc	tac	cac	cta	agg	cac	aaa	gtg	ctg	ccc	cgc	tgg	gtc	tgg	gag	aaa	1803	
Cys	Tyr	His	Leu	Arg	His	Lys	Val	Leu	Pro	Arg	Trp	Val	Trp	Glu	Lys		
			545					550					555				
gtt	cct	gat	cct	gcc	aac	agc	agt	tca	ggc	cag	ccc	cac	atg	gag	caa	1851	
Val	Pro	Asp	Pro	Ala	Asn	Ser	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	His	Met	Glu	Gln		
		560				565						570					
gta	cct	gag	gcc	cag	ccc	ctt	ggg	gac	ttg	ccc	atc	ctg	gaa	gtg	gag	1899	
Val	Pro	Glu	Ala	Gln	Pro	Leu	Gly	Asp	Leu	Pro	Ile	Leu	Glu	Val	Glu		

ES 2 377 188 T3

```

575                    580                    585
gag atg gag ccc ccg ccg gtt atg gag tcc tcc cag ccc gcc cag gcc 1947
Glu Met Glu Pro Pro Pro Val Met Glu Ser Ser Gln Pro Ala Gln Ala
590                    595                    600                    605

acc gcc ccg ctt gac tct ggg tat gag aag cac ttc ctg ccc aca cct 1995
Thr Ala Pro Leu Asp Ser Gly Tyr Glu Lys His Phe Leu Pro Thr Pro
610                    615                    620

gag gag ctg ggc ctt ctg ggg ccc ccc agg cca cag gtt ctg gcc 2040
Glu Glu Leu Gly Leu Leu Gly Pro Pro Arg Pro Gln Val Leu Ala
625                    630                    635

tgaaccacac gctctggctgg gggctgccag ccaggctaga gggatgctca tgcaggttgc 2100
accccagtcc tggattagcc ctcttgatgg atgaagacac tgaggactca gagaggtgga 2160
gtcacttacc tgaggacacc cagccaggca gagctgggat tgaaggacco ctatagagaa 2220
gggcttgccc cccatgggga agacacggat ggaaggtgga gcaaaggaaa atacatgaaa 2280
ttgagagtgg cagctgcctg ccaaaatctg ttccgctgta acagaactga atttggaccc 2340
cagcacagtg gctcacgcct gtaatccocag cactttggca ggccaaggtg gaaggatcac 2400
ttagagctag gagtttgaga ccagcctggg caatatagca agaccctca ctacaaaaat 2460
aaaacatcaa aaacaaaaac aattagctgg gcatgatggc acacacctgt agtccgagcc 2520
acttgggagg ctgaggtggg aggatcggtt gagcccagga gttcgaagct gcagggacct 2580
ctgattgcac cactgcactc caggctgggt aacagaatga gaccttatct caaaaataaa 2640
caaactaata aaaagca 2657

```

<210> 9
 <211> 636
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 9

5

```

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

```

10

225					230					235				240	
Asn	Leu	Cys	Gly	Thr	Pro	Gly	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	Leu	Leu	Trp	Lys
				245					250					255	
Ala	Pro	Gly	Pro	Cys	Val	Gln	Val	Ser	Tyr	Lys	Val	Trp	Phe	Trp	Val
			260					265					270		
Gly	Gly	Arg	Glu	Leu	Ser	Pro	Glu	Gly	Ile	Thr	Cys	Cys	Cys	Ser	Leu
		275					280				285				
Ile	Pro	Ser	Gly	Ala	Glu	Trp	Ala	Arg	Val	Ser	Ala	Val	Asn	Ala	Thr
	290					295				300					
Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Thr	Asn	Leu	Ser	Leu	Val	Cys	Leu	Asp	Ser	Ala
305					310					315					320
Ser	Ala	Pro	Arg	Ser	Val	Ala	Val	Ser	Ser	Ile	Ala	Gly	Ser	Thr	Glu
				325				330						335	
Leu	Leu	Val	Thr	Trp	Gln	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Pro	Leu	Glu	His	Val
			340				345						350		
Val	Asp	Trp	Ala	Arg	Asp	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Lys	Leu	Asn	Trp	Val
	355					360						365			
Arg	Leu	Pro	Pro	Gly	Asn	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Pro	Gly	Asn	Phe	Thr
	370					375					380				
Val	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Val	Ser	Ala	Ser	Gly
385					390					395					400
Leu	Ala	Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Trp	Gly	Phe	Arg	Glu	Glu	Leu	Ala	Pro
			405					410						415	
Leu	Val	Gly	Pro	Thr	Leu	Trp	Arg	Leu	Gln	Asp	Ala	Pro	Pro	Gly	Thr
			420					425					430		
Pro	Ala	Ile	Ala	Trp	Gly	Glu	Val	Pro	Arg	His	Gln	Leu	Arg	Gly	His
	435					440						445			
Leu	Thr	His	Tyr	Thr	Leu	Cys	Ala	Gln	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Ser	Val
	450					455					460				
Cys	Met	Asn	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Gln	Ser	Val	Thr	Leu	Pro	Asp	Leu
465					470					475					480
Pro	Trp	Gly	Pro	Cys	Glu	Leu	Trp	Val	Thr	Ala	Ser	Thr	Ile	Ala	Gly
			485					490						495	
Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ile	Leu	Arg	Leu	His	Leu	Pro	Asp	Asn	Thr
			500					505					510		
Leu	Arg	Trp	Lys	Val	Leu	Pro	Gly	Ile	Leu	Phe	Leu	Trp	Gly	Leu	Phe
	515						520					525			
Leu	Leu	Gly	Cys	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Thr	Ser	Gly	Arg	Cys	Tyr	His
	530					535					540				
Leu	Arg	His	Lys	Val	Leu	Pro	Arg	Trp	Val	Trp	Glu	Lys	Val	Pro	Asp
545					550					555					560
Pro	Ala	Asn	Ser	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	His	Met	Glu	Gln	Val	Pro	Glu
			565					570						575	
Ala	Gln	Pro	Leu	Gly	Asp	Leu	Pro	Ile	Leu	Glu	Val	Glu	Glu	Met	Glu
			580					585					590		
Pro	Pro	Pro	Val	Met	Glu	Ser	Ser	Gln	Pro	Ala	Gln	Ala	Thr	Ala	Pro
	595						600					605			
Leu	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Lys	His	Phe	Leu	Pro	Thr	Pro	Glu	Glu	Leu
	610					615					620				
Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Pro	Arg	Pro	Gln	Val	Leu	Ala				
625					630					635					

<210> 10
 <211> 755
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(489)

10

<400> 10

ES 2 377 188 T3

```

atg atc ttc cac aca gga aca acg aag oct acc ctg gtg ctg ctt tgc 48
Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

act aca tgc tgagtgatgg gggggggggg ggtgcagtgt cctcagcagt 529
Thr Thr Cys

gcctgtcctt cgagggctga gcttgcaacc caggacttaa ctccaaaggg actgtgcggt 589
cattactagt catgttattt atgtttttat ttgtccact gaaatcttgt tctgctaccc 649
tgtagggact ggaagtggca gctatattta tttatttatg tactgagttt gttaacgctc 709
catggaggag ccttcagagt ctatttaata aattatattg acatga 755

```

<210> 11
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 11

```

Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys
1 5 10 15
Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro
20 25 30

```

5

10

```

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

5 <210> 12
 <211>489
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polinucleótido degenerado de zcytor17lig de ratón de la SEC ID N°: 11
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(489)
 <223> n = A, T, C o G

15 <400> 12

```

atgathttyc ayacnggnac nacnaarocn acnytngtny tnytnrgygtg yathgggnacn 60
tggytngcna cntgywsnyt nwsnttyggn gcncnathw snaargarga yytnmggnacn 120
acnathgayy tnytnaarca rgarwsncar gayytnntaya ayaaytayws nathaarcar 180
gcnwsnggna tgwsngcnga ygarwsnath carytnccnt gyttywsnyt ngaymgngar 240
gcnytnacna ayathwsngt nathathgcn cayytngara argtnaargt nytnwsngar 300
aayacngtng ayacnwsntg ggtnathmgn tggytnacna ayathwsntg yttyaayccn 360
ytnaayytna ayathwsngt nccnggnaay acngaygarw sntaygaytg yaargtnntty 420
gtnytnacng tnytnaarca rttywsnaay tgyatggcng arytncargc naargayaay 480
acnacntgy
    
```

20 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC6673

<400> 13
 gcgcaaggtg ccggtcacag c 21

30 <210> 14
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29082

<400> 14

ES 2 377 188 T3

caattgttg ggtttttta gcagcagtag gccag 36

5 <210> 15
<211>36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC29083

<400> 15
ctgggcttac tgctgctaaa aaaaccaac aaattg 36

15 <210> 16
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC29145

<400> 16
gcgtctagag ggttatattg aagttgggca ggaaga 36

25 <210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Marcador de péptido Glu-Glu (CEE) modificado con Gly-Ser

<400> 17

35 Gly Ser Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5

40 <210> 18
<211>33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC29359

<400> 18
gcgggatcca tgaagctctc tcccagcct tca 33

50 <210> 19
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC27899

<400> 19
ccagaacttt gactcctga ccg 23

60 <210> 20
<211>23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC27895

 <400> 20
 5 gaagtcaact tcgctaagaa ccg 23

 <210> 21
 <211> 34
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29122

 <400> 21
 15 ccgctcgagt tatattgaag ttgggcagga agac 34

 <210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29180

 <400> 22
 25 cctggagtcc ctgaaacgaa ag 22

 <210> 23
 <211> 34
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29122

 <400> 23
 35 ccgctcgagt tatattgaag ttgggcagga agac 34

 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC9791

 <400> 24
 50 cgtccaaca aaaccagac 20

 <210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC9793

 <400> 25
 60 tggcggtgac agcggacac 19

 <210> 26
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC40109

<400> 26
 ccattccagc accagccaac 20

10

<210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC40112

<400> 27
 tacaactca atagcatctg gg 22

20

<210> 28
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC13496

<400> 28
 ccctgcagtg atcaacatgg ccaagttgac cagtgccggt 40

30

<210> 29
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC13945

<400> 29
 gcccatggac tagttcgaa aggtcgagtg tcagtcctgc tcctc 45

40

<210> 30
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC18698

50

<400> 30
 ttttttctc gagactttt tttttttt tttt 34

55

<210> 31
 <220>
 <223> Secuencia saltada

60

<400> 31
 000

<210> 32
 <211> 10
 <212> PRT

ES 2 377 188 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Marcador de péptido Glu-Glu (CEE) con un par de restos Gly-Ser

5 <400> 32

Gly Ser Gly Gly Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5 10

10 <210> 33
 <211>33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29451

<400> 33
 ccggaattcc cctgatacat gaagctctct ccc 33

20 <210> 34
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29124

<400> 34
 cgcggtatccc tcaaagacac tgaatgacaa tgt 33

30 <210> 35
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Marcador de péptido Glu-Glu (CEE) sin un par de restos Gly-Ser

40 <400> 35

Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5

<210>36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia peptídica FLAG C-terminal

50 <400> 36

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

55 <210> 37
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 377 188 T3

<400> 37

```

tcagacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagccgaggg ggcaccgtca 60
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 120
acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 300
aagtgcaagg tetccaaca agccctccca tcctccatcg agaaaacat ctccaaagcc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgectgtgc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
tccgacggtc ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaa                                     684
    
```

5 <210> 38
 <211> 2295
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polinucleótido de fusión zcytor17-Fc4 humano

<221> CDS
 <222> (1)...(2295)

15 <400> 38

```

atg aag ctc tct ccc cag cct tca tgt gtt aac ctg ggg atg atg tgg 48
Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp
  1           5           10           15

acc tgg gca ctg tgg atg ctc cct tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca 96
Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala
           20           25           30

gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg 144
Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg
           35           40           45

aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc 192
Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr
           50           55           60

cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat aat 240
Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn
           65           70           75           80
    
```


ES 2 377 188 T3

tgt	aca	acc	aat	agt	tct	aca	agt	gaa	aat	cgt	gct	tcg	tgc	tct	ttt	288
Cys	Thr	Thr	Asn	Ser	Ser	Thr	Ser	Glu	Asn	Arg	Ala	Ser	Cys	Ser	Phe	
			85					90					95			
ttc	ctt	cca	aga	ata	acg	atc	cca	gat	aat	tat	acc	att	gag	gtg	gaa	336
Phe	Leu	Pro	Arg	Ile	Thr	Ile	Pro	Asp	Asn	Tyr	Thr	Ile	Glu	Val	Glu	
			100					105					110			
gct	gaa	aat	gga	gat	ggt	gta	att	aaa	tct	cat	atg	aca	tac	tgg	aga	384
Ala	Glu	Asn	Gly	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Ser	His	Met	Thr	Tyr	Trp	Arg	
		115					120					125				
tta	gag	aac	ata	gcg	aaa	act	gaa	cca	cct	aag	att	ttc	cgt	gtg	aaa	432
Leu	Glu	Asn	Ile	Ala	Lys	Thr	Glu	Pro	Pro	Lys	Ile	Phe	Arg	Val	Lys	
	130					135						140				
cca	gtt	ttg	ggc	atc	aaa	cga	atg	att	caa	att	gaa	tgg	ata	aag	cct	480
Pro	Val	Leu	Gly	Ile	Lys	Arg	Met	Ile	Gln	Ile	Glu	Trp	Ile	Lys	Pro	
	145				150				155						160	
gag	ttg	gcg	cct	gtt	tca	tct	gat	tta	aaa	tac	aca	ctt	cga	ttc	agg	528
Glu	Leu	Ala	Pro	Val	Ser	Ser	Asp	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	Arg	Phe	Arg	
			165						170					175		
aca	gtc	aac	agt	acc	agc	tgg	atg	gaa	gtc	aac	ttc	gct	aag	aac	cgt	576
Thr	Val	Asn	Ser	Thr	Ser	Trp	Met	Glu	Val	Asn	Phe	Ala	Lys	Asn	Arg	
			180					185					190			
aag	gat	aaa	aac	caa	acg	tac	aac	ctc	acg	ggg	ctg	cag	cct	ttt	aca	624
Lys	Asp	Lys	Asn	Gln	Thr	Tyr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Phe	Thr	
		195					200					205				
gaa	tat	gtc	ata	gct	ctg	cga	tgt	gcg	gtc	aag	gag	tca	aag	ttc	tgg	672
Glu	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu	Arg	Cys	Ala	Val	Lys	Glu	Ser	Lys	Phe	Trp	
	210					215					220					
agt	gac	tgg	agc	caa	gaa	aaa	atg	gga	atg	act	gag	gaa	gaa	gct	cca	720
Ser	Asp	Trp	Ser	Gln	Glu	Lys	Met	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	
	225				230					235					240	
tgt	ggc	ctg	gaa	ctg	tgg	aga	gtc	ctg	aaa	cca	gct	gag	gcg	gat	gga	768
Cys	Gly	Leu	Glu	Leu	Trp	Arg	Val	Leu	Lys	Pro	Ala	Glu	Ala	Asp	Gly	
			245						250					255		
aga	agg	cca	gtg	cgg	ttg	tta	tgg	aag	aag	gca	aga	gga	gcc	cca	gtc	816
Arg	Arg	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val	
			260					265					270			
cta	gag	aaa	aca	ctt	ggc	tac	aac	ata	tgg	tac	tat	cca	gaa	agc	aac	864
Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Trp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Ser	Asn	
		275					280					285				
act	aac	ctc	aca	gaa	aca	atg	aac	act	act	aac	cag	cag	ctt	gaa	ctg	912
Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Thr	Met	Asn	Thr	Thr	Asn	Gln	Gln	Leu	Glu	Leu	
	290					295					300					
cat	ctg	gga	ggc	gag	agc	ttt	tgg	gtg	tct	atg	att	tct	tat	aat	tct	960
His	Leu	Gly	Gly	Glu	Ser	Phe	Trp	Val	Ser	Met	Ile	Ser	Tyr	Asn	Ser	
	305				310					315					320	
ctt	ggg	aag	tct	cca	gtg	gcc	acc	ctg	agg	att	cca	gct	att	caa	gaa	1008

ES 2 377 188 T3

Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu	
325 330 335	
aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc gtt gct gag gac	1056
Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp	
340 345 350	
cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac gtg aac act tgg	1104
Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp	
355 360 365	
atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc acc acc ctt tcc	1152
Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser	
370 375 380	
tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag caa gat aaa	1200
Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys	
385 390 400	
tta aaa ccc ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca atg ttg cat	1248
Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His	
405 410 415	
gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc aaa gaa ggc	1296
Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly	
420 425 430	
gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac att ggc gtg aag	1344
Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys	
435 440 445	
acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt gag aga aag ggt	1392
Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly	
450 455 460	
atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gga	1440
Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly	
465 470 475 480	
ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac ggc ctg gag tcc	1488
Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser	
485 490 495	
ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc agc acc agt	1536
Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser	
500 505 510	
gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca ttg tca ttc	1584
Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe	
515 520 525	
agt gtc ttt gag gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc cca	1632
Ser Val Phe Glu Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro	
530 535 540	
ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc	1680
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe	
545 550 555 560	
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc	1728
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	

ES 2 377 188 T3

	565	570	575	
	aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc			1776
	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe			
	580	585	590	
	aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg			1824
	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
	595	600	605	
	cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc			1872
	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
	610	615	620	
	gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc			1920
	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
	625	630	635	640
	tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc			1968
	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala			
	645	650	655	
	aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg			2016
	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg			
	660	665	670	
	gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc			2064
	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly			
	675	680	685	
	ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg			2112
	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
	690	695	700	
	gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc			2160
	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
	705	710	715	720
	ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag			2208
	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln			
	725	730	735	
	ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac			2256
	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His			
	740	745	750	
	tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa			2295
	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *			
	755	760		

<210> 39
 <211> 764
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido de fusión zcytor17-Fc4 humano

10

<400> 39

Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp

ES 2 377 188 T3

1				5					10				15		
Thr	Trp	Ala	Leu	Trp	Met	Leu	Pro	Ser	Leu	Cys	Lys	Phe	Ser	Leu	Ala
			20					25					30		
Ala	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Cys	Val	Tyr	Tyr	Tyr	Arg
		35					40					45			
Lys	Asn	Leu	Thr	Cys	Thr	Trp	Ser	Pro	Gly	Lys	Glu	Thr	Ser	Tyr	Thr
	50					55					60				
Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Arg	Thr	Tyr	Ala	Phe	Gly	Glu	Lys	His	Asp	Asn
65					70					75				80	
Cys	Thr	Thr	Asn	Ser	Ser	Thr	Ser	Glu	Asn	Arg	Ala	Ser	Cys	Ser	Phe
			85						90					95	
Phe	Leu	Pro	Arg	Ile	Thr	Ile	Pro	Asp	Asn	Tyr	Thr	Ile	Glu	Val	Glu
			100					105					110		
Ala	Glu	Asn	Gly	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Ser	His	Met	Thr	Tyr	Trp	Arg
		115					120					125			
Leu	Glu	Asn	Ile	Ala	Lys	Thr	Glu	Pro	Pro	Lys	Ile	Phe	Arg	Val	Lys
	130					135					140				
Pro	Val	Leu	Gly	Ile	Lys	Arg	Met	Ile	Gln	Ile	Glu	Trp	Ile	Lys	Pro
145					150					155				160	
Glu	Leu	Ala	Pro	Val	Ser	Ser	Asp	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	Arg	Phe	Arg
			165					170						175	
Thr	Val	Asn	Ser	Thr	Ser	Trp	Met	Glu	Val	Asn	Phe	Ala	Lys	Asn	Arg
		180						185					190		
Lys	Asp	Lys	Asn	Gln	Thr	Tyr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Phe	Thr
	195						200					205			
Glu	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu	Arg	Cys	Ala	Val	Lys	Glu	Ser	Lys	Phe	Trp
	210					215					220				
Ser	Asp	Trp	Ser	Gln	Glu	Lys	Met	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro
225					230					235					240
Cys	Gly	Leu	Glu	Leu	Trp	Arg	Val	Leu	Lys	Pro	Ala	Glu	Ala	Asp	Gly
			245					250						255	
Arg	Arg	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val
		260						265					270		
Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Trp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Ser	Asn
	275						280					285			
Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Thr	Met	Asn	Thr	Thr	Asn	Gln	Gln	Leu	Glu	Leu
	290					295					300				
His	Leu	Gly	Gly	Glu	Ser	Phe	Trp	Val	Ser	Met	Ile	Ser	Tyr	Asn	Ser
305					310					315				320	
Leu	Gly	Lys	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Ile	Pro	Ala	Ile	Gln	Glu
			325					330						335	
Lys	Ser	Phe	Gln	Cys	Ile	Glu	Val	Met	Gln	Ala	Cys	Val	Ala	Glu	Asp
		340						345					350		
Gln	Leu	Val	Val	Lys	Trp	Gln	Ser	Ser	Ala	Leu	Asp	Val	Asn	Thr	Trp
	355					360						365			
Met	Ile	Glu	Trp	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Ser	Glu	Pro	Thr	Thr	Leu	Ser
	370					375					380				
Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Gln	Gln	Asp	Lys
385					390					395					400
Leu	Lys	Pro	Phe	Trp	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	Met	Leu	His
			405						410					415	
Asp	Lys	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	Lys	Glu	Gly
		420						425					430		
Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Glu	Thr	Lys	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Val	Lys
	435						440						445		
Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Glu	Arg	Lys	Gly
	450					455					460				
Ile	Ile	Cys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Gly
465					470					475				480	
Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Tyr	Gly	Leu	Glu	Ser
			485						490					495	

ES 2 377 188 T3

Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser
 500 505 510
 Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe
 515 520 525
 Ser Val Phe Glu Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 530 535 540
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
 545 550 555 560
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 565 570 575
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 580 585 590
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 595 600 605
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 610 615 620
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 625 630 635 640
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 645 650 655
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 660 665 670
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 675 680 685
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 690 695 700
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 705 710 715 720
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 725 730 735
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 740 745 750
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 755 760

- 5 <210>40
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29157
 <400> 40
 ctagtatggc cggccatgaa gctctctccc cagc 34
- 15 <210> 41
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29150
 <400> 41
 gtctgaagat ctgggctcct caagacact gaatgacaat g 41
- 25 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>

ES 2 377 188 T3

<223> Cebador oligonucleotídico ZC41458

<400>42
tggacctcgc actaaaatca t 21

5

<210> 43
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC41457

<400> 43
aatcacggca gagtcccac ac 22

15

<210> 44
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC12749

25

<400> 44

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

30

<210> 45
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC12748
<400> 45

tcgagacgcg tggccaagga ttgaattcct agaaatctac agttccctttt ctgggaaata 60
cgcggtgta attccgggaa ggggagggat ttacgggaag 100

40

<210>46
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC10651

<400>46
agctttctg cagcagctct 20

50

<210> 47
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC10565

<400> 47
tttcagaaa aggtgcaaa tgc 23

60

5 <210> 48
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC14063

10 <400> 48
 caccagacat aatagctgac agact 25

15 <210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC17574

<400> 49
 ggtrttgctc agcatgcaca c 21

25 <210> 50
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC17600

<400> 50
 catgtaggcc atgaggtcca ccac 24

35 <210> 51
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC38065

45 <400> 51
 ctttctggg aatctgtgc t 21

50 <210> 52
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC38068

55 <400> 52
 cctccagctc tgggtctg 18

60 <210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC37877

<400> 53
 caaaaaaacc aacaaattga ctca 24

 5 <210> 54
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC37876

 <400> 54
 catgtggcta tactacttc agcag 25

 15 <210> 55
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> sonda TaqMan(r) de receptor zcytor17

 <400> 55
 ctgtgtggc ccaccgttc ca 22

 25 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Cebador directo de ARNr

 <400> 56
 cggtaccac atccaaggaa 20

 35 <210> 57
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Cebador inverso de ARNr

 45 <400> 57
 gctggaatta ccgcggt 18

 <210> 58
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Sonda TaqMan(r) de ARNr

 55 <400> 58
 tgctggcacc agactgccc tc 22

 60 <210> 59

 <220>
 <223> Secuencia saltada

 <400> 59

000

5 <210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41458

<400> 60
 tggacctgc actaaatca t 21

15 <210> 61
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41457

<400> 61
 aatcacggca gaggccac ac 22

25 <210> 62
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41459

<400> 62
 agaagggcgt gctcgtgc 19

35 <210> 63
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41460

45 <400> 63
 ccggatggct gggctgtg 18

50 <210> 64
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC39982

55 <400> 64
 aatgtctgtg tagcataagg tatga 25

60 <210> 65
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC39983

ES 2 377 188 T3

```

<400> 65
cctgcctacc tgaaaaccag aa      22

5
<210> 66
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC39980

<400> 66
tttgaattcg ccaccatggc tctattgca gtctt      36

15
<210> 67
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC39981

<400> 67
ctgtctcgag tgctggtag cagtgttc      28

25
<210> 68
<211> 2217
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(2217)

35
<400> 68

    atg gct cta ttt gca gtc ttt cag aca aca ttc ttc tta aca ttg ctg      48
    Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu Thr Leu Leu
     1             5             10             15

    tcc ttg agg act tac cag agt gaa gtc ttg gct gaa cgt tta cca ttg      96
    Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg Leu Pro Leu
             20             25             30

    act cct gta tca ctt aaa gtt tcc acc aat tct acg cgt cag agt ttg      144
    Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg Gln Ser Leu
             35             40             45

    cac tta caa tgg act gtc cac aac ctt cct tat cat cag gaa ttg aaa      192

```

ES 2 377 188 T3

His	Leu	Gln	Trp	Thr	Val	His	Asn	Leu	Pro	Tyr	His	Gln	Glu	Leu	Lys		
	50					55					60						
atg	gta	ttt	cag	atc	cag	atc	agt	agg	att	gaa	aca	tcc	aat	gtc	atc	240	
Met	Val	Phe	Gln	Ile	Gln	Ile	Ser	Arg	Ile	Glu	Thr	Ser	Asn	Val	Ile		
	65				70				75						80		
tgg	gtg	ggg	aat	tac	agc	acc	act	gtg	aag	tgg	aac	cag	gtt	ctg	cat	288	
Trp	Val	Gly	Asn	Tyr	Ser	Thr	Thr	Val	Lys	Trp	Asn	Gln	Val	Leu	His		
			85					90						95			
tgg	agc	tgg	gaa	tct	gag	ctc	cct	ttg	gaa	tgt	gcc	aca	cac	ttt	gta	336	
Trp	Ser	Trp	Glu	Ser	Glu	Leu	Pro	Leu	Glu	Cys	Ala	Thr	His	Phe	Val		
			100					105						110			
aga	ata	aag	agt	ttg	gtg	gac	gat	gcc	aag	ttc	cct	gag	cca	aat	ttc	384	
Arg	Ile	Lys	Ser	Leu	Val	Asp	Asp	Ala	Lys	Phe	Pro	Glu	Pro	Asn	Phe		
		115					120					125					
tgg	agc	aac	tgg	agt	tcc	tgg	gag	gaa	gtc	agt	gta	caa	gat	tct	act	432	
Trp	Ser	Asn	Trp	Ser	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Ser	Val	Gln	Asp	Ser	Thr		
	130					135					140						
gga	cag	gat	ata	ttg	ttc	gtt	ttc	cct	aaa	gat	aag	ctg	gtg	gaa	gaa	480	
Gly	Gln	Asp	Ile	Leu	Phe	Val	Phe	Pro	Lys	Asp	Lys	Leu	Val	Glu	Glu		
	145				150					155					160		
ggc	acc	aat	gtt	acc	att	tgt	tac	gtt	tct	agg	aac	att	caa	aat	aat	528	
Gly	Thr	Asn	Val	Thr	Ile	Cys	Tyr	Val	Ser	Arg	Asn	Ile	Gln	Asn	Asn		
				165					170						175		
gta	tcc	tgt	tat	ttg	gaa	ggg	aaa	cag	att	cat	gga	gaa	caa	ctt	gat	576	
Val	Ser	Cys	Tyr	Leu	Glu	Gly	Lys	Gln	Ile	His	Gly	Glu	Gln	Leu	Asp		
			180					185						190			
cca	cat	gta	act	gca	ttc	aac	ttg	aat	agt	gtg	cct	ttc	att	agg	aat	624	
Pro	His	Val	Thr	Ala	Phe	Asn	Leu	Asn	Ser	Val	Pro	Phe	Ile	Arg	Asn		
		195					200					205					
aaa	ggg	aca	aat	atc	tat	tgt	gag	gca	agt	caa	gga	aat	gtc	agt	gaa	672	
Lys	Gly	Thr	Asn	Ile	Tyr	Cys	Glu	Ala	Ser	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Glu		
	210					215					220						
ggc	atg	aaa	ggc	atc	gtt	ctt	ttt	gtc	tca	aaa	gta	ctt	gag	gag	ccc	720	
Gly	Met	Lys	Gly	Ile	Val	Leu	Phe	Val	Ser	Lys	Val	Leu	Glu	Glu	Pro		
	225				230					235					240		
aag	gac	ttt	tct	tgt	gaa	acc	gag	gac	ttc	aag	act	ttg	cac	tgt	act	768	
Lys	Asp	Phe	Ser	Cys	Glu	Thr	Glu	Asp	Phe	Lys	Thr	Leu	His	Cys	Thr		
				245					250						255		
tgg	gat	cct	ggg	acg	gac	act	gcc	ttg	ggg	tgg	tct	aaa	caa	cct	tcc	816	
Trp	Asp	Pro	Gly	Thr	Asp	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Ser	Lys	Gln	Pro	Ser		
			260					265						270			
caa	agc	tac	act	tta	ttt	gaa	tca	ttt	tct	ggg	gaa	aag	aaa	ctt	tgt	864	
Gln	Ser	Tyr	Thr	Leu	Phe	Glu	Ser	Phe	Ser	Gly	Glu	Lys	Lys	Leu	Cys		
		275					280						285				
aca	cac	aaa	aac	tgg	tgt	aat	tgg	caa	ata	act	caa	gac	tca	caa	gaa	912	
Thr	His	Lys	Asn	Trp	Cys	Asn	Trp	Gln	Ile	Thr	Gln	Asp	Ser	Gln	Glu		

ES 2 377 188 T3

290	295	300	
acc tat aac ttc aca ctc ata gct gaa aat tac tta agg aag aga agt			960
Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg Lys Arg Ser			
305	310	315	320
gtc aat atc ctt ttt aac ctg act cat cga gtt tat tta atg aat cct			1008
Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu Met Asn Pro			
	325	330	335
ttt agt gtc aac ttt gaa aat gta aat gcc aca aat gcc atc atg acc			1056
Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile Met Thr			
	340	345	350
tgg aag gtg cac tcc ata agg aat aat ttc aca tat ttg tgt cag att			1104
Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys Gln Ile			
	355	360	365
gaa ctc cat ggt gaa gga aaa atg atg caa tac aat gtt tcc atc aag			1152
Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val Ser Ile Lys			
	370	375	380
gtg aac ggt gag tac ttc tta agt gaa ctg gaa cct gcc aca gag tac			1200
Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr			
385	390	395	400
atg gcg cga gta cgg tgt gct gat gcc agc cac ttc tgg aaa tgg agt			1248
Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys Trp Ser			
	405	410	415
gaa tgg agt ggt cag aac ttc acc aca ctt gaa gct gct ccc tca gag			1296
Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro Ser Glu			
	420	425	430
gcc cct gat gtc tgg aga att gtg agc ttg gag cca gga aat cat act			1344
Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn His Thr			
	435	440	445
gtg acc tta ttc tgg aag cca tta tca aaa ctg cat gcc aat gga aag			1392
Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn Gly Lys			
	450	455	460
atc ctg ttc tat aat gta gtt gta gaa aac cta gac aaa cca tcc agt			1440
Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro Ser Ser			
465	470	475	480
tca gag ctc cat tcc att cca gca cca gcc aac agc aca aaa cta atc			1488
Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile			
	485	490	495
ctt gac agg tgt tcc tac caa atc tgc gtc ata gcc aac aac agt gtg			1536
Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val			
	500	505	510
ggt gct tct cct gct tct gta ata gtc atc tct gca gac ccc gaa aac			1584
Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn			
	515	520	525
aaa gag gtt gag gaa gaa aga att gca ggc aca gag ggt gga ttc tct			1632
Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Gly Phe Ser			
	530	535	540

ES 2 377 188 T3

ctg tct tgg aaa ccc caa cct gga gat gtt ata ggc tat gtt gtg gac	1680
Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp	
545	550 555 560
tgg tgt gac cat acc cag gat gtg ctc ggt gat ttc cag tgg aag aat	1728
Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn	
565	570 575
gta ggt ccc aat acc aca agc aca gtc att agc aca gat gct ttt agg	1776
Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg	
580	585 590
cca gga gtt cga tat gac ttc aga att tat ggg tta tct aca aaa agg	1824
Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg	
595	600 605
att gct tgt tta tta gag aaa aaa aca gga tac tct cag gaa ctt gct	1872
Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala	
610	615 620
cct tca gac aac cct cac gtg ctg gtg gat aca ttg aca tcc cac tcc	1920
Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser	
625	630 635 640
ttc act ctg agt tgg aaa gat tac tct act gaa tct caa cct ggt ttt	1968
Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe	
645	650 655
ata caa ggg tac cat gtc tat ctg aaa tcc aag gcg agg cag tgc cac	2016
Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His	
660	665 670
cca cga ttt gaa aag gca gtt ctt tca gat ggt tca gaa tgt tgc aaa	2064
Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys	
675	680 685
tac aaa att gac aac ccg gaa gaa aag gca ttg att gtg gac aac cta	2112
Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu	
690	695 700
aag cca gaa tcc ttc tat gag ttt ttc atc act cca ttc act agt gct	2160
Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala	
705	710 715 720
ggt gaa ggc ccc agt gct acg ttc acg aag gtc acg act ccg gat gaa	2208
Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu	
725	730 735
cac tcc tcg	2217
His Ser Ser	

<210> 69
 <211> 739
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 69

Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu Thr Leu Leu

5

10

ES 2 377 188 T3

1				5					10				15		
Ser	Leu	Arg	Thr	Tyr	Gln	Ser	Glu	Val	Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	Pro	Leu
			20					25					30		
Thr	Pro	Val	Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Thr	Asn	Ser	Thr	Arg	Gln	Ser	Leu
		35					40					45			
His	Leu	Gln	Trp	Thr	Val	His	Asn	Leu	Pro	Tyr	His	Gln	Glu	Leu	Lys
	50					55					60				
Met	Val	Phe	Gln	Ile	Gln	Ile	Ser	Arg	Ile	Glu	Thr	Ser	Asn	Val	Ile
65					70					75					80
Trp	Val	Gly	Asn	Tyr	Ser	Thr	Thr	Val	Lys	Trp	Asn	Gln	Val	Leu	His
				85					90					95	
Trp	Ser	Trp	Glu	Ser	Glu	Leu	Pro	Leu	Glu	Cys	Ala	Thr	His	Phe	Val
			100					105					110		
Arg	Ile	Lys	Ser	Leu	Val	Asp	Asp	Ala	Lys	Phe	Pro	Glu	Pro	Asn	Phe
		115					120					125			
Trp	Ser	Asn	Trp	Ser	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Ser	Val	Gln	Asp	Ser	Thr
	130					135					140				
Gly	Gln	Asp	Ile	Leu	Phe	Val	Phe	Pro	Lys	Asp	Lys	Leu	Val	Glu	Glu
145					150					155					160
Gly	Thr	Asn	Val	Thr	Ile	Cys	Tyr	Val	Ser	Arg	Asn	Ile	Gln	Asn	Asn
				165					170					175	
Val	Ser	Cys	Tyr	Leu	Glu	Gly	Lys	Gln	Ile	His	Gly	Glu	Gln	Leu	Asp
		180						185					190		
Pro	His	Val	Thr	Ala	Phe	Asn	Leu	Asn	Ser	Val	Pro	Phe	Ile	Arg	Asn
		195					200					205			
Lys	Gly	Thr	Asn	Ile	Tyr	Cys	Glu	Ala	Ser	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Glu
	210				215						220				
Gly	Met	Lys	Gly	Ile	Val	Leu	Phe	Val	Ser	Lys	Val	Leu	Glu	Glu	Pro
225					230					235					240
Lys	Asp	Phe	Ser	Cys	Glu	Thr	Glu	Asp	Phe	Lys	Thr	Leu	His	Cys	Thr
				245					250					255	
Trp	Asp	Pro	Gly	Thr	Asp	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Ser	Lys	Gln	Pro	Ser
			260					265					270		
Gln	Ser	Tyr	Thr	Leu	Phe	Glu	Ser	Phe	Ser	Gly	Glu	Lys	Lys	Leu	Cys
		275					280					285			
Thr	His	Lys	Asn	Trp	Cys	Asn	Trp	Gln	Ile	Thr	Gln	Asp	Ser	Gln	Glu
	290					295					300				
Thr	Tyr	Asn	Phe	Thr	Leu	Ile	Ala	Glu	Asn	Tyr	Leu	Arg	Lys	Arg	Ser
305					310					315					320
Val	Asn	Ile	Leu	Phe	Asn	Leu	Thr	His	Arg	Val	Tyr	Leu	Met	Asn	Pro
				325					330					335	
Phe	Ser	Val	Asn	Phe	Glu	Asn	Val	Asn	Ala	Thr	Asn	Ala	Ile	Met	Thr
			340					345					350		
Trp	Lys	Val	His	Ser	Ile	Arg	Asn	Asn	Phe	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gln	Ile
		355					360					365			
Glu	Leu	His	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Met	Gln	Tyr	Asn	Val	Ser	Ile	Lys
	370					375					380				
Val	Asn	Gly	Glu	Tyr	Phe	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Glu	Tyr
385					390					395					400
Met	Ala	Arg	Val	Arg	Cys	Ala	Asp	Ala	Ser	His	Phe	Trp	Lys	Trp	Ser
				405					410					415	
Glu	Trp	Ser	Gly	Gln	Asn	Phe	Thr	Thr	Leu	Glu	Ala	Ala	Pro	Ser	Glu
			420					425					430		
Ala	Pro	Asp	Val	Trp	Arg	Ile	Val	Ser	Leu	Glu	Pro	Gly	Asn	His	Thr
		435					440					445			
Val	Thr	Leu	Phe	Trp	Lys	Pro	Leu	Ser	Lys	Leu	His	Ala	Asn	Gly	Lys
	450				455						460				
Ile	Leu	Phe	Tyr	Asn	Val	Val	Val	Glu	Asn	Leu	Asp	Lys	Pro	Ser	Ser
465				470						475					480
Ser	Glu	Leu	His	Ser	Ile	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn	Ser	Thr	Lys	Leu	Ile
				485					490					495	

ES 2 377 188 T3

Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val
 500 505 510
 Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn
 515 520 525
 Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Gly Phe Ser
 530 535 540
 Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp
 545 550 555 560
 Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn
 565 570 575
 Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg
 580 585 590
 Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg
 595 600 605
 Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala
 610 615 620
 Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser
 625 630 635 640
 Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe
 645 650 655
 Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His
 660 665 670
 Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys
 675 680 685
 Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu
 690 695 700
 Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala
 705 710 715 720
 Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu
 725 730 735
 His Ser Ser

5 <210> 70
 <211> 1557
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1557)

<400> 70

atg atg tgg acc tgg gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc 48
 Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe
 1 5 10 15
 agc ctg gca gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac 96
 Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr
 20 25 30
 tac tat agg aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc 144
 Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr
 35 40 45
 agt tat acc cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa 192
 Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys
 50 55 60
 cat gat aat tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tcg 240

ES 2 377 188 T3

His 65	Asp	Asn	Cys	Thr	Thr	Asn	Ser	Ser	Thr	Ser	Glu	Asn	Arg	Ala	Ser	
					70					75					80	
tgc	tct	ttt	ttc	ctt	cca	aga	ata	acg	atc	cca	gat	aat	tat	acc	att	288
Cys	Ser	Phe	Phe	Leu	Pro	Arg	Ile	Thr	Ile	Pro	Asp	Asn	Tyr	Thr	Ile	
				85					90					95		
gag	gtg	gaa	gct	gaa	aat	gga	gat	ggg	gta	att	aaa	tct	cat	atg	aca	336
Glu	Val	Glu	Ala	Glu	Asn	Gly	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Ser	His	Met	Thr	
			100					105					110			
tac	tgg	aga	tta	gag	aac	ata	gcg	aaa	act	gaa	cca	cct	aag	att	ttc	384
Tyr	Trp	Arg	Leu	Glu	Asn	Ile	Ala	Lys	Thr	Glu	Pro	Pro	Lys	Ile	Phe	
		115					120					125				
cgt	gtg	aaa	cca	ggt	ttg	ggc	atc	aaa	cga	atg	att	caa	att	gaa	tgg	432
Arg	Val	Lys	Pro	Val	Leu	Gly	Ile	Lys	Arg	Met	Ile	Gln	Ile	Glu	Trp	
						135					140					
ata	aag	cct	gag	ttg	gcg	cct	ggt	tca	tct	gat	tta	aaa	tac	aca	ctt	480
Ile	Lys	Pro	Glu	Leu	Ala	Pro	Val	Ser	Ser	Asp	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	
145					150					155					160	
cga	ttc	agg	aca	gtc	aac	agt	acc	agc	tgg	atg	gaa	gtc	aac	ttc	gct	528
Arg	Phe	Arg	Thr	Val	Asn	Ser	Thr	Ser	Trp	Met	Glu	Val	Asn	Phe	Ala	
				165					170					175		
aag	aac	cgt	aag	gat	aaa	aac	caa	acg	tac	aac	ctc	acg	ggg	ctg	cag	576
Lys	Asn	Arg	Lys	Asp	Lys	Asn	Gln	Thr	Tyr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	
			180					185					190			
cct	ttt	aca	gaa	tat	gtc	ata	gct	ctg	cga	tgt	gcg	gtc	aag	gag	tca	624
Pro	Phe	Thr	Glu	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu	Arg	Cys	Ala	Val	Lys	Glu	Ser	
		195				200						205				
aag	ttc	tgg	agt	gac	tgg	agc	caa	gaa	aaa	atg	gga	atg	act	gag	gaa	672
Lys	Phe	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Gln	Glu	Lys	Met	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	
	210					215					220					
gaa	gct	cca	tgt	ggc	ctg	gaa	ctg	tgg	aga	gtc	ctg	aaa	cca	gct	gag	720
Glu	Ala	Pro	Cys	Gly	Leu	Glu	Leu	Trp	Arg	Val	Leu	Lys	Pro	Ala	Glu	
225					230					235					240	
gcg	gat	gga	aga	agg	cca	gtg	cgg	ttg	tta	tgg	aag	aag	gca	aga	gga	768
Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	
				245					250					255		
gcc	cca	gtc	cta	gag	aaa	aca	ctt	ggc	tac	aac	ata	tgg	tac	tat	cca	816
Ala	Pro	Val	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Trp	Tyr	Tyr	Pro	
			260					265					270			
gaa	agc	aac	act	aac	ctc	aca	gaa	aca	atg	aac	act	act	aac	cag	cag	864
Glu	Ser	Asn	Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Thr	Met	Asn	Thr	Thr	Asn	Gln	Gln	
		275					280					285				
ctt	gaa	ctg	cat	ctg	gga	ggc	gag	agc	ttt	tgg	gtg	tct	atg	att	tct	912
Leu	Glu	Leu	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Ser	Phe	Trp	Val	Ser	Met	Ile	Ser	
	290				295						300					
tat	aat	tct	ctt	ggg	aag	tct	cca	gtg	gcc	acc	ctg	agg	att	cca	gct	960
Tyr	Asn	Ser	Leu	Gly	Lys	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Ile	Pro	Ala	

ES 2 377 188 T3

305					310					315				320		
att	caa	gaa	aaa	tca	ttt	cag	tgc	att	gag	gtc	atg	cag	gcc	tgc	gtt	1008
Ile	Gln	Glu	Lys	Ser	Phe	Gln	Cys	Ile	Glu	Val	Met	Gln	Ala	Cys	Val	
				325					330					335		
gct	gag	gac	cag	cta	gtg	gtg	aag	tgg	caa	agc	tct	gct	cta	gac	gtg	1056
Ala	Glu	Asp	Gln	Leu	Val	Val	Lys	Trp	Gln	Ser	Ser	Ala	Leu	Asp	Val	
			340					345					350			
aac	act	tgg	atg	att	gaa	tgg	ttt	ccg	gat	gtg	gac	tca	gag	ccc	acc	1104
Asn	Thr	Trp	Met	Ile	Glu	Trp	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Ser	Glu	Pro	Thr	
		355					360					365				
acc	ctt	tcc	tgg	gaa	tct	gtg	tct	cag	gcc	acg	aac	tgg	acg	atc	cag	1152
Thr	Leu	Ser	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Gln	
	370					375						380				
caa	gat	aaa	tta	aaa	cct	ttc	tgg	tgc	tat	aac	atc	tct	gtg	tat	cca	1200
Gln	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Phe	Trp	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	
385					390					395					400	
atg	ttg	cat	gac	aaa	gtt	ggc	gag	cca	tat	tcc	atc	cag	gct	tat	gcc	1248
Met	Leu	His	Asp	Lys	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	
				405					410					415		
aaa	gaa	ggc	ggt	cca	tca	gaa	ggt	cct	gag	acc	aag	gtg	gag	aac	att	1296
Lys	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Glu	Thr	Lys	Val	Glu	Asn	Ile	
			420					425					430			
ggc	gtg	aag	acg	gtc	acg	atc	aca	tgg	aaa	gag	att	ccc	aag	agt	gag	1344
Gly	Val	Lys	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Glu	
		435					440					445				
aga	aag	ggt	atc	atc	tgc	aac	tac	acc	atc	ttt	tac	caa	gct	gaa	ggt	1392
Arg	Lys	Gly	Ile	Ile	Cys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	
	450					455						460				
gga	aaa	gga	ttc	tcc	aag	aca	gtc	aat	tcc	agc	atc	ttg	cag	tac	ggc	1440
Gly	Lys	Gly	Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Tyr	Gly	
465					470					475					480	
ctg	gag	tcc	ctg	aaa	cga	aag	acc	tct	tac	att	gtt	cag	gtc	atg	gcc	1488
Leu	Glu	Ser	Leu	Lys	Arg	Lys	Thr	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Val	Met	Ala	
				485					490					495		
agc	acc	agt	gct	ggg	gga	acc	aac	ggg	acc	agc	ata	aat	ttc	aag	aca	1536
Ser	Thr	Ser	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Asn	Phe	Lys	Thr	
			500					505					510			
ttg	tca	ttc	agt	gtc	ttt	gag										1557
Leu	Ser	Phe	Ser	Val	Phe	Glu										
			515													

<210> 71
 <211> 519
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 71

ES 2 377 188 T3

Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe
1 5 10 15
Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr
35 40 45
Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys
50 55 60
His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser
65 70 75 80
Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile
85 90 95
Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr
100 105 110
Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe
115 120 125
Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp
130 135 140
Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu
145 150 155 160
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala
165 170 175
Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln
180 185 190
Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser
195 200 205
Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu
210 215 220
Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu
225 230 235 240
Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly
245 250 255
Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro
260 265 270
Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln
275 280 285
Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser
290 295 300
Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala
305 310 315 320
Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val
325 330 335
Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val
340 345 350
Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr
355 360 365
Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln
370 375 380
Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro
385 390 395 400
Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala
405 410 415
Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile
420 425 430
Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu
435 440 445
Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly
450 455 460
Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly
465 470 475 480
Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala

<400> 76

```

tgtatgtctg cacagtttgt gtatgcctgg tgcccacaga ggctcgagag tgtcagattc 60
ccccaaaaac tggagttaca gttttgagcc gccccatgct tgatagcaat caaacctggg 120
tcctctgaaa gagcatccag tgcattgtaac cactgaacca tctctccaaa coatgaacat 180
cactttaatt ttttttaata gttaaaggat attttgattc taaagatgta aaagaacgtc 240
tcacctatth tgaatttgg taataaatgt ttcttcaaag cttaaaaaaa ttagtccagg 300
tttttttttt ttttcagtca gtgatttgcct aagctgccca aactggctta gaatttgtga 360
ccctcttgtc tcagcatact gagggttaag attacaagtg caccocctac ccagtccca 420
taattaactg atccaccccc acccccattc caccocactc coattgocctg ggcaagtaac 480
tcttgagccc cattctgggt cttagagtctg aagtcacaaa ggtgcagggtg agaacgcaag 540
gacaagggca ggccctggag cacagatgcc ttctcotta gcttccctg tgttccactag 600
agccatcccc ctgcccctgg aattcccaca gatggatgct tctgtggctt cttaaaactt 660
cctgcagggg cactgacctc cagcccctct aagtcacttc ttccccagtg attgtacttt 720
tcaatcgggg ttcaaacttt cctctcatta aatcagcaag cactttccaa gaaaagagag 780
atgctcaaga tgccttctct gtgtgtatgt gtatgctgtt gtgtgtgtgc acgcatgtgt 840
gtgcatgtga ctcaatcttc tgccttgcct tgagggtaac ctccagcatt ccttccagcc 900
ctgcttcccc caggccgagc cgaggctggc aaccttttga aaatgttttc tggagaaaag 960
ctgagcaatg gttttgcca gggcgggcct ttgatctgct tcctcatgac aacctttat 1020
atattgctg gtggccatgg cgaacacacc aggtcccaga gaccacaggg aaagcggggc 1080
ttctcactc tcttaccgtc gccatgatct tccacacagg taccgctggc tccacacgca 1140
gtcagcatg gcttcagctc catggctctt atcatgttag ggaaggaggc cgggaatggc 1200
tgcctcaggt gggtgctgga cagaggctgt tgtaactgaa gctgggatgg gcaggggcat 1260
ctgacctatc agctccatgg tacccttctt tttctccagg aacaacgaag cctaccctgg 1320
tgctgctttg ctgtatagga acctggctgg ccacctgcag cttgtccttc ggtgccccaa 1380
tatogaagga agacttaaga actacaattg acctcttgaa acaagagtct caggatcttt 1440
ataacaacta tgtaagtgc cttgagattg tttttctta accatttctt taaaatgtct 1500
tattttgcta tctaagcaca gctatccttt ctcgatataa agccagctat ggaagccaga 1560
gaggcatggg gaaacattgg aattcgggtg ggtgaaatg tttccaaggg ggtaaatgca 1620
ctagcagaag aggcagaggc agactggctc agggactgaa acctggcag cttacgaaac 1680
actacaggat gtatgctccc tgaattcttt atctcaaac caccoggtc acagtcctta 1740
ctaaacgagc attcttctg aaagggtatc cttagagaag ggccagcttg attcaggaat 1800
cccccaagag caatgagagc cagtttcagc agccaaagat gtccatagtg aagcaggggtg 1860
tgaggatctt cctttgggtc tccgttgact aactaggcaa ctgtctgtgt gttcttggag 1920
catcctggag ggccctctgc ctggccagag cctggcacag gtacagcaca ggaccagaa 1980
agtgtgaata ctccatttcc ttgggaccgc ttagataact tcagttgaag caagtaacag 2040
ggaaactgat ggagacacag ataacctccc tgcccctctc acttcagtca ctgagcctcc 2100
gagaacaggt tgcagatggc taggggcagc ctccagcaga tagggggagg cagactgggt 2160
agaagcatcc ttaggaaaca cggccaacct ggggtgggtat gccatgtctt ctagctcata 2220
agccaactag accttcgatt cctgtagaca cagagttagt gatggccaa gcttcagaag 2280
gttgtgttac caattagata aggtctgagg caggctagac acagaggaag ccctggaat 2340
gagctgttct gagctgtagg gttgttacia atgtcttctt tacaatattt caaacctct 2400
ctttctacag agcataaagc aggcattctg gatgtcagca gacgaatcaa tacagctgcc 2460
gtgtttcagc ctggaccggg aagcattaac caacatctcg gtcacatag cacatctgga 2520
gaaagtcaa gtgttgagcg agaacacagt agatacttct tgggtgataa gatggctaac 2580
aaacatcagc tgtttcaacc cactgaattt aaacatttct gtgctggaa atactgatga 2640
atcctatgat tgtaaagtgt tctgtcttac ggttttaaag cagttctcaa actgcatggc 2700
agaactgcag gctaaggaca atactacatg ctgagtgatg gggggggggg ggtgcagtgt 2760
cctcagcagt gcctgtcctt cgagggctga gcttgcaacc caggacttaa ctccaaaggg 2820
actgtgoggt cattactagt catgttattt atgtttttat tttgtccact gaaatcttgt 2880
tctgtacccc tgtagggact ggaagtggca gctatattta tttatttatg tactgagttt 2940
gttaacgctc catggaggag ccttcagagt ctatttaata aattatattg acatgatcac 3000
ataatcagtt ttggaatttg tgatggggtt gaaatcaaag attaggaatg ttctggaat 3060
agtttatgct acctctccc tccattagac agactcatga gcaataatc ccagcagcat 3120
cacgtcatg ataaacatct ttgttccagg tcaatagtac aatcactgtc cttttggtat 3180
gtaggctgga aactaa
    
```

- 5 <210> 77
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Cebador oligonucleotídico ZC28575

<400> 77
 ccaggaaagg aaaccagtta tacc 24

5

<210> 78
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC21195

<400> 78
 gaggagacca taacccccga cag 23

15

<210> 79
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC21196

<400> 79
 catagctccc accacacgat ttt 23

25

<210> 80
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC26358

<400> 80
 aaaaccaaac gtacaacctc acggg 25

35

<210> 81
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC26359

45

<400> 81
 gagcagccat acaccagagc agaca 25

50

<210> 82
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29179

<400> 82
 gcagggttg gaacggtg 19

60

<210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28917

 <400> 83
 5 tgcaagatgc tggaattgac 20

 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28916

 <400> 84
 15 agtcaattcc agcatcttgc 20

 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28918

 <400> 85
 25 tcacagagtc atcagactcc 20

 <210> 86
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41498

 <400> 86
 35 ggctccagag accacagg 18

 <210> 87
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41496

 <400> 87
 45 atgactagta atgaccgcac ag 22

 <210> 88
 <211> 39
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41583

 <400> 88
 60 cgtacgggcc ggccaccatg atcttcaca caggaaca 39

 <210> 89
 <211>36

ES 2 377 188 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC41584

<400> 89
tgacgaggcg cgcctcagca ttagtattg tcctta 36

10 <210> 90
<211> 650
<212> ADN
<213> Mus musculus

15 <220>
<221> CDS
<222> (53)...(542)

20 <400> 90

ES 2 377 188 T3

```

ggctccagag accacaggca aagcgggcct tctcactct cttaccgtcg cc atg atc 58
                                         Met Ile
                                         1

ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc tgt ata 106
Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys Cys Ile
          5                               10                               15

gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca ata tcg 154
Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro Ile Ser
          20                               25                               30

aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag tct cag 202
Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu Ser Gln
          35                               40                               45                               50

gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg tca gca 250
Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met Ser Ala
          55                               60                               65

gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa gca tta 298
Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu Ala Leu
          70                               75                               80

acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa gtg ttg 346
Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys Val Leu
          85                               90                               95

agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta aca aac 394
Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu Thr Asn
          100                              105                              110

atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct gga aat 442
Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro Gly Asn
          115                              120                              125                              130

act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt tta aag 490
Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val Leu Lys
          135                              140                              145

cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat act aca 538
Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn Thr Thr
          150                              155                              160

tgc t gagtgatggg ggggggtgc agtgtctca gcagtgcctg tccttcgagg 592
Cys

gctgagcttg caaccagga cttactcca aaggactgt gcggtcatta ctagtcat 650

```

<210> 91
 <211>163
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 91

5

ES 2 377 188 T3

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

<210> 92
 <211> 511
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de ADNc murino clonado (SEC ID N°: 90) con sitio de restricción Fsel y Ascl y secuencia Kozak parcial del marco de lectura abierta de mcytor17lig y codón de terminación

10

<400> 92

```
ggccggccac catgatcttc cacacaggaa caecgaagcc taccctgggtg ctgctttgct 60
gtataggaac ctggctggcc acctgcagct tgtccttcgg tgccccaata tcgaaggaag 120
acttaagaac tacaattgac ctcttgaaac aagagtctca ggatctttat aacaactata 180
gcataaagca ggcattctggg atgtcagcag acgaatcaat acagctgccg tgtttcagcc 240
```

```
tggaccggga agcattaacc aacatctcgg tcatcatagc acatctggag aaagtcaaag 300
tggtgagcga gaacacagta gatacttctt ggggtgataag atggctaaca aacatcagct 360
gtttcaacc actgaattta aacatttctg tgcctggaaa tactgatgaa tcctatgatt 420
gtaaagtgtt cgtgcttaag gttttaaagc agttctcaaa ctgcatggca gaactgcagg 480
ctaaggacaa tactacatgc tgaggcgcgc c 511
```

15

<210> 93
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41438

<400> 93
 gccatggcct ctactcagg c 21

25

<210> 94
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

30

ES 2 377 188 T3

<223> Cebador oligonucleotídico ZC41437

<400> 94
ccaggagca ttgacaactc ttag 24

5

<210> 95
<211> 516
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Polinucleótido de zCyt17Lig-CEE humano
<221> CDS
<222> (1)...(516)

15

<400> 95

```

atg gcc tct cac tca ggc ccc tcg acg tct gtg ctc ttt ctg ttc tgc 48
Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys
 1           5           10           15

tgc ctg gga ggc tgg ctg gcc tcc cac acg ttg ccc gtc cgt tta cta 96
Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu
          20           25           30

cga cca agt gat gat gta cag aaa ata gtc gag gaa tta cag tcc ctc 144
Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu
          35           40           45

tcg aag atg ctt ttg aaa gat gtg gag gaa gag aag ggc gtg ctc gtg 192
Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu Glu Glu Lys Gly Val Leu Val
          50           55           60

tcc cag aat tac acg ctg ccg tgt ctc agc cct gac gcc cag ccg cca 240
Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro
          65           70           75           80

aac aac atc cac agc cca gcc atc cgg gca tat ctc aag aca atc aga 288
Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg
          85           90           95

cag cta gac aac aaa tct gtt att gat gag atc ata gag cac ctc gac 336
Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp Glu Ile Ile Glu His Leu Asp
          100          105          110

aaa ctc ata ttt caa gat gca cca gaa aca aac att tct gtg cca aca 384
Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr
          115          120          125

gac acc cat gaa tgt aaa cgc ttc atc ctg act att tct caa cag ttt 432
Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe
          130          135          140

tca gag tgc atg gac ctc gca cta aaa tca ttg acc tct gga gcc caa 480
Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln
          145          150          155          160

cag gcc acc act gaa gaa tac atg ccg atg gaa taa 516
Gln Ala Thr Thr Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu *
          165          170
    
```

20

<210> 96
<211> 171

ES 2 377 188 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido zCyt17Lig-CEE humano

<400> 96

```

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

10 <210> 97
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZCZC41607

<400> 97
 20 tccaggaat tcatataggc cggccacat ggctctcac tcaggcccc 49

<210> 98
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZCZC41605

30 <400> 98

```

caaccccaga gctgttttaa ggcgcgcctc tagattatta ttccatoggc atgtattctt 60
cagtgtggc ctgttgggct cc 82
    
```

35 <210> 99
 <211> 629
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

40 <220>
 <221> CDS

ES 2 377 188 T3

<222> (28)...(528)

<400> 99

```

aacccttgaggaccagaa cgagaca atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc 54
                    Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser
                    1                               5

atc cac acc atg ctg ctc ctg ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc 102
Ile His Thr Met Leu Leu Leu Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu
10                15                20                25

caa gct tca atc agt ggc cgg gat acc cac cgt tta acc aga acg ttg 150
Gln Ala Ser Ile Ser Gly Arg Asp Thr His Arg Leu Thr Arg Thr Leu
30                35                40

aat tgc agc tct att gtc aag gag att ata ggg aag ctc cca gaa cct 198
Asn Cys Ser Ser Ile Val Lys Glu Ile Ile Gly Lys Leu Pro Glu Pro
45                50                55

gaa ctc aaa act gat gat gaa gga ccc tct ctg agg aat aag agc ttt 246
Glu Leu Lys Thr Asp Asp Glu Gly Pro Ser Leu Arg Asn Lys Ser Phe
60                65                70

cgg aga gta aac ctg tcc aaa ttc gtg gaa agc caa gga gaa gtg gat 294
Arg Arg Val Asn Leu Ser Lys Phe Val Glu Ser Gln Gly Glu Val Asp
75                80                85

cct gag gac aga tac gtt atc aag tcc aat ctt cag aaa ctt aac tgt 342
Pro Glu Asp Arg Tyr Val Ile Lys Ser Asn Leu Gln Lys Leu Asn Cys
90                95                100                105

tgc ctg cct aca tct gcg aat gac tct gcg ctg cca ggg gtc ttc att 390
Cys Leu Pro Thr Ser Ala Asn Asp Ser Ala Leu Pro Gly Val Phe Ile
110                115                120

cga gat ctg gat gac ttt cgg aag aaa ctg aga ttc tac atg gtc cac 438
Arg Asp Leu Asp Asp Phe Arg Lys Lys Leu Arg Phe Tyr Met Val His
125                130                135

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

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

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

```

5

<210> 100

<211> 166

<212> PRT

10

<213> Mus musculus

<400> 100

ES 2 377 188 T3

```

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

```

5 <210> 101
 <211> 674
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (10)...(464)

<400> 101

```

gatccaaac atg agc cgc ctg ccc gtc ctg ctc ctg ctc caa ctc ctg gtc 51
Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val
 1          5          10

```

```

cgc ccc gga ctc caa gct ccc atg acc cag aca acg tcc ttg aag aca 99
Arg Pro Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Ser Leu Lys Thr

```

ES 2 377 188 T3

```

15              20              25              30
agc tgg gtt aac tgc tct aac atg atc gat gaa att ata aca cac tta 147
Ser Trp Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu
              35              40              45

aag cag cca cct ttg cct ttg ctg gac ttc aac aac ctc aat ggg gaa 195
Lys Gln Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu
              50              55              60

gac caa gac att ctg atg gaa aat aac ctt cga agg cca aac ctg gag 243
Asp Gln Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu
              65              70              75

gca ttc aac agg gct gtc aag agt tta cag aac gca tca gca att gag 291
Ala Phe Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu
              80              85              90

agc att ctt aaa aat ctc ctg cca tgt ctg ccc ctg gcc acg gcc gca 339
Ser Ile Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala
              95              100              105              110

ccc acg cga cat cca atc cat atc aag gac ggt gac tgg aat gaa ttc 387
Pro Thr Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe
              115              120              125

cgg agg aaa ctg acg ttc tat ctg aaa acc ctt gag aat gcg cag gct 435
Arg Arg Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala
              130              135              140

caa cag acg act ttg agc ctc gcg atc tt ttagtccaac gtcagctcg 484
Gln Gln Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile
              145              150

ttctctgggc cttctcacca cagcgcctcg ggacatcaaa aacagcagaa cttctgaaac 544
ctctgggtca tctctcacac attccaggac cagaagcatt tcaccttttc ctgcggcctc 604
agatgaattg ttaattatct aatttctgaa atgtgcagct cccatttggc cttgtgcggt 664
tgtgttctca
              674

```

<210> 102
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 102

ES 2 377 188 T3

```

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

```

```

Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln
 130          135          140
Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile
 145          150

```

5 <210>103
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Marcador de péptido Glu-Glu (CEE) alternativo sin un par de restos Gly-Ser
 <400> 103

Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5

15 <210> 104
 <211> 513
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polinucleótido de zCyt17Lig(m)-CEE de ratón

25 <221> CDS
 <222> (1)...(513)
 <400>104

ES 2 377 188 T3

```

atg atc ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc 48
Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct 384

Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro
115 120 125

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

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

act aca tgc gaa gaa tac atg ccg atg gaa tga 513
Thr Thr Cys Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu *
165 170

```

<210> 105
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido zCyt17Lig(m)-CEE de ratón

10

<400> 105

ES 2 377 188 T3

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

5 <210> 106
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41643

<400> 106
 tccaggaat tcatatagc cggccacat gatctccac acaggaaca 49

15 <210> 107
 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41641

<400> 107

25 caaccccaga gctgttttaa ggcgcgectc tagattatca ttccatcggc atgtattctt 60
 cgcattgtagt attgtcctta gcctg 85

30 <210> 108
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC38,239

<400> 108
 accaactaa ccaadaaac 19

40 <210> 109
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 377 188 T3

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC38.245

5 <400> 109
ctgttgacag ttctgaaccg 20

10 <210> 110
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC38,238

20 <400> 110
cgcggttcc attgtatctg 20

25 <210> 111
<211> 2748
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (237)...(2222)

<400> 111

gatggggccc tgaatggtga tctgacagaa ttccagacca acctggtggt tattgtcctt 60
ttcatctggt catgctgaat ataactctcaa gatgtgctgg agaaggtgct gctgtccggg 120
ctctcagaga aggcagtgct ggagggcgttc ctggcccggg tctctccta ctgttcctgg 180
tagcccagcc ttctcggggt ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239
Met
1

ES 2 377 188 T3

ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac 287
 Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His
 5 10 15

gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg 335
 Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu
 20 25 30

tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act 383
 Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr
 35 40 45

aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act 431
 Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Thr
 50 55 60 65

tgc act tgg aga cca gag aag gaa acc aat gat acc agc tac att gtg 479
 Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Val
 70 75 80

act ttg act tac tcc tat gga aaa agc aat tat agt gac aat gct aca 527
 Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala Thr
 85 90 95

gag gct tca tat tct ttt ccc cgt tcc tgt gca atg ccc cca gac atc 575
 Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp Ile
 100 105 110

tgc agt gtt gaa gta caa gct caa aat gga gat ggt aaa gtt aaa tct 623
 Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys Ser
 115 120 125

gac atc aca tat tgg cat tta atc tcc ata gca aaa acc gaa cca cct 671
 Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro
 130 135 140 145

ata att tta agt gtg aat cca att tgt aat aga atg ttc cag ata caa 719
 Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile Gln
 150 155 160

tgg aaa ccg cgt gaa aag act cgt ggg ttt cct tta gta tgc atg ctt 767
 Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met Leu
 165 170 175

cgg ttc aga act gtc aac agt agc cgc tgg acg gaa gtc aat ttt gaa 815
 Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu
 180 185 190

aac tgt aaa cag gtc tgc aac ctc aca gga ctt cag gct ttc aca gaa 863
 Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr Glu
 195 200 205

tat gtc ctg gct cta cga ttc agg ttc aat gac tca aga tat tgg agc 911
 Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp Ser
 210 215 220 225

aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtg act atg gag gaa gtt cca cat 959
 Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro His
 230 235 240

gtc ctg gac ctg tgg aga att ctg gaa cca gca gac atg aac gga gac 1007

ES 2 377 188 T3

Val	Leu	Asp	Leu	Trp	Arg	Ile	Leu	Glu	Pro	Ala	Asp	Met	Asn	Gly	Asp		
			245					250					255				
agg	aag	gtg	cga	ttg	ctg	tgg	aag	aag	gca	aga	gga	gcc	ccc	gtc	ttg	1055	
Arg	Lys	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val	Leu		
			260				265					270					
gag	aaa	aca	ttt	ggc	tac	cac	ata	cag	tac	ttt	gca	gag	aac	agc	act	1103	
Glu	Lys	Thr	Phe	Gly	Tyr	His	Ile	Gln	Tyr	Phe	Ala	Glu	Asn	Ser	Thr		
			275			280					285						
aac	ctc	aca	gag	ata	aac	aac	atc	acc	acc	cag	cag	tat	gaa	ctg	ctt	1151	
Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Gln	Gln	Tyr	Glu	Leu	Leu		
						295				300					305		
ctg	atg	agc	cag	gca	cac	tct	gtg	tcc	gtg	act	tct	ttt	aat	tct	ctt	1199	
Leu	Met	Ser	Gln	Ala	His	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Ser	Phe	Asn	Ser	Leu		
				310					315					320			
ggc	aag	tcc	caa	gag	acc	atc	ctg	agg	atc	cca	gat	gtc	cat	gag	aag	1247	
Gly	Lys	Ser	Gln	Glu	Thr	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Asp	Val	His	Glu	Lys		
			325					330					335				
acc	ttc	cag	tac	att	aag	agc	atg	cag	gcc	tac	ata	gcc	gag	ccc	ctg	1295	
Thr	Phe	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ser	Met	Gln	Ala	Tyr	Ile	Ala	Glu	Pro	Leu		
			340				345					350					
ttg	gtg	gtg	aac	tgg	caa	agc	tcc	att	cct	gcg	gtg	gac	act	tgg	ata	1343	
Leu	Val	Val	Asn	Trp	Gln	Ser	Ser	Ile	Pro	Ala	Val	Asp	Thr	Trp	Ile		
			355			360						365					
gtg	gag	tgg	ctc	cca	gaa	gct	gcc	atg	tgc	aag	ttc	cct	gcc	ctt	tcc	1391	
Val	Glu	Trp	Leu	Pro	Glu	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Phe	Pro	Ala	Leu	Ser		
			370			375				380					385		
tgg	gaa	tct	gtg	tct	cag	gtc	acg	aac	tgg	acc	atc	gag	caa	gat	aaa	1439	
Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Val	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Glu	Gln	Asp	Lys		
				390					395					400			
cta	aaa	cct	ttc	aca	tgc	tat	aat	ata	tca	gtg	tat	cca	gtg	ttg	gga	1487	
Leu	Lys	Pro	Phe	Thr	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	Val	Leu	Gly		
			405					410					415				
cac	oga	gtt	gga	gag	ccg	tat	tca	atc	caa	gct	tat	gcc	aaa	gaa	gga	1535	
His	Arg	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	Lys	Glu	Gly		
			420				425					430					
act	cca	tta	aaa	ggt	cct	gag	acc	agg	gtg	gag	aac	atc	ggt	ctg	agg	1583	
Thr	Pro	Leu	Lys	Gly	Pro	Glu	Thr	Arg	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Leu	Arg		
			435			440						445					
aca	gcc	acg	atc	aca	tgg	aag	gag	att	cct	aag	agt	gct	agg	aat	gga	1631	
Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn	Gly		
						455				460					465		
ttt	atc	aac	aat	tac	act	gta	ttt	tac	caa	gct	gaa	ggt	gga	aaa	gaa	1679	
Phe	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Val	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Glu		
				470					475					480			
ctc	tcc	aag	act	gtt	aac	tct	cat	gcc	ctg	cag	tgt	gac	ctg	gag	tct	1727	
Leu	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	His	Ala	Leu	Gln	Cys	Asp	Leu	Glu	Ser		

ES 2 377 188 T3

```

                485                490                495
ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga 1775
Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg
                500                505                510

gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc 1823
Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile
                515                520                525

agt gtg ttt gaa att gtc ctt cta aca tct cta gtt gga gga ggc ctt 1871
Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu
530                535                540                545

ctt cta ctt agc atc aaa aca gtg act ttt ggc ctc aga aag cca aac 1919
Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro Asn
                550                555                560

cgg ttg act ccc ctg tgt tgt cct gat gtt ccc aac cct gct gaa agt 1967
Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser
                565                570                575

agt tta gcc aca tgg ctc gga gat ggt ttc aag aag tca aat atg aag 2015
Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met Lys
                580                585                590

gag act gga aac tct ggg aac aca gaa gac gtg gtc cta aaa cca tgt 2063
Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro Cys
                595                600                605

ccc gtc ccc gcg gat ctc att gac aag ctg gta gtg aac ttt gag aat 2111
Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Asn
610                615                620                625

ttt ctg gaa gta gtt ttg aca gag gaa gct gga aag ggt cag gcg agc 2159
Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala Ser
                630                635                640

att ttg gga gga gaa gcg aat gag tat atc tta tcc cag gaa cca agc 2207
Ile Leu Gly Gly Glu Ala Asn Glu Tyr Ile Leu Ser Gln Glu Pro Ser
                645                650                655

tgt cct ggc cat tgc tgaagctacc ctcagggctcc aggacagctg tcttggtggc 2262
Cys Pro Gly His Cys
                660

acttgactct ggcaggaacc tgatctctac ttttctctc cctgtctccg gacactttct 2322
ctccttcatg cagagaccag gactagagcg gattcctcat ggtttgccag gctcctcagt 2382
ccttgctcgg gctcaggatc ttcaacaatg ccttttctgg gacactccat catccactta 2442
tatttatttt ttgcaacatt gtggattgaa cccagggact tgtttatgcg cgcaacttca 2502
gtaactgtgg cagagactta ggaatggaga tctgaccctt tgcagaaggt ttctggacat 2562
ccgtccctgt gtgagcctca gacagcattg tctttacttt gaatcagctt ccaagttaat 2622
aaaagaaaaa cagagaggtg gcataacagc tctgtcttcc tgacctgctt gagttccagt 2682
tctgacttcc tttggtgatg aacagcaatg tgggaagtgt aagctgaata aacccttcc 2742
tccccca                2748

```

<210> 112
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 112

ES 2 377 188 T3

Met Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala
1 5 10 15
His Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala
20 25 30
Leu Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro
35 40 45
Thr Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu
50 55 60
Thr Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile
65 70 75 80
Val Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala
85 90 95
Thr Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp
100 105 110
Ile Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys
115 120 125
Ser Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro
130 135 140
Pro Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile
145 150 155 160
Gln Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met
165 170 175
Leu Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe
180 185 190
Glu Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr
195 200 205
Glu Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp
210 215 220
Ser Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro
225 230 235 240
His Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly
245 250 255
Asp Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val
260 265 270
Leu Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser
275 280 285
Thr Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu
290 295 300
Leu Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser
305 310 315 320
Leu Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu
325 330 335
Lys Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro
340 345 350
Leu Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp
355 360 365
Ile Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu
370 375 380
Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp
385 390 395 400
Lys Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu
405 410 415
Gly His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu
420 425 430
Gly Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu
435 440 445
Arg Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn
450 455 460
Gly Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys
465 470 475 480

ES 2 377 188 T3

Glu Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu
 485 490 495
 Ser Leu Thr Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr
 500 505 510
 Arg Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser
 515 520 525
 Ile Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Gly
 530 535 540
 Leu Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro
 545 550 555 560
 Asn Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu
 565 570 575
 Ser Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met
 580 585 590
 Lys Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro
 595 600 605
 Cys Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu
 610 615 620
 Asn Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala
 625 630 635 640
 Ser Ile Leu Gly Gly Glu Ala Asn Glu Tyr Ile Leu Ser Gln Glu Pro
 645 650 655
 Ser Cys Pro Gly His Cys
 660

<210> 113
 <211> 2728
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (237)...(1877)

10

<400> 113

gatggggccc tgaatgttga tctgacagaa ttccagacca acctggtggt tattgtcctt 60
 ttcattctggt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaagggtgct gctgtccggg 120
 ctctcagaga aggcagtgtc ggagggcttc ctggcccggg tctcctccta ctgttctctg 180
 tagcccagcc ttctcggggg ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239
 Met
 1
 ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac 287
 Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His
 5 10 15
 gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg 335
 Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu
 20 25 30
 tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act 383
 Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr
 35 40 45
 aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act 431
 Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Thr
 50 55 60 65
 tgc act tgg aga cca gag aag gaa acc aat gat acc agc tac att gtg 479
 Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Val

ES 2 377 188 T3

	70	75	80	
act ttg act tac tcc tat gga aaa agc aat tat agt gac aat gct aca				527
Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala Thr				
	85	90	95	
gag gct tca tat tct ttt ccc cgt tcc tgt gca atg ccc cca gac atc				575
Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp Ile				
	100	105	110	
tgc agt gtt gaa gta caa gct caa aat gga gat ggt aaa gtt aaa tct				623
Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys Ser				
	115	120	125	
gac atc aca tat tgg cat tta atc tcc ata gca aaa acc gaa cca cct				671
Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro				
	130	135	140	145
ata att tta agt gtg aat cca att tgt aat aga atg ttc cag ata caa				719
Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile Gln				
	150	155	160	
tgg aaa ccg cgt gaa aag act cgt ggg ttt cct tta gta tgc atg ott				767
Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met Leu				
	165	170	175	
cgg ttc aga act gtc aac agt agc cgc tgg acg gaa gtc aat ttt gaa				815
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu				
	180	185	190	
aac tgt aaa cag gtc tgc aac ctc aca gga ott cag gct ttc aca gaa				863
Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr Glu				
	195	200	205	
tat gtc ctg gct cta cga ttc agg ttc aat gac tca aga tat tgg agc				911
Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp Ser				
	210	215	220	225
aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtg act atg gag gaa gtt cca cat				959
Lys Trp Ser Lys Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro His				
	230	235	240	
gtc ctg gac ctg tgg aga att ctg gaa cca gca gac atg aac gga gac				1007
Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly Asp				
	245	250	255	
agg aag gtg cga ttg ctg tgg aag aag gca aga gga gcc ccc gtc ttg				1055
Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val Leu				
	260	265	270	
gag aaa aca ttt ggc tac cac ata cag tac ttt gca gag aac agc act				1103
Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser Thr				
	275	280	285	
aac ctc aca gag ata aac aac atc acc acc cag cag tat gaa ctg ott				1151
Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu Leu				
	290	295	300	305
ctg atg agc cag gca cac tct gtg tcc gtg act tct ttt aat tct ctt				1199
Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser Leu				
	310	315	320	

ES 2 377 188 T3

ggc aag tcc caa gag acc atc ctg agg atc cca gat gtc cat gag aag 1247
 Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu Lys
 325 330 335

acc ttc cag tac att aag agc atg cag gcc tac ata gcc gag ccc ctg 1295
 Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro Leu
 340 345 350

ttg gtg gtg aac tgg caa agc tcc att cct gcg gtg gac act tgg ata 1343
 Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp Ile
 355 360 365

gtg gag tgg ctc cca gaa gct gcc atg tcg aag ttc cct gcc ctt tcc 1391
 Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu Ser
 370 375 380 385

tgg gaa tct gtg tct cag gtc acg aac tgg acc atc gag caa gat aaa 1439
 Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp Lys
 390 395 400

cta aaa cct ttc aca tgc tat aat ata tca gtg tat cca gtg ttg gga 1487
 Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu Gly
 405 410 415

cac cga gtt gga gag ccg tat tca atc caa gct tat gcc aaa gaa gga 1535
 His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly
 420 425 430

act cca tta aaa ggt cct gag acc agg gtg gag aac atc ggt ctg agg 1583
 Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu Arg
 435 440 445

aca gcc acg atc aca tgg aag gag att cct aag agt gct agg aat gga 1631
 Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn Gly
 450 455 460 465

ttt atc aac aat tac act gta ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gaa 1679
 Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Glu
 470 475 480

ctc tcc aag act gtt aac tct cat gcc ctg cag tgt gac ctg gag tct 1727
 Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu Ser
 485 490 495

ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga 1775
 Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg
 500 505 510

gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc 1823
 Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile
 515 520 525

agt gag tac tgg ctt cag gcc tca ttc tgg agt tta ctt cgg gtt gga 1871
 Ser Glu Tyr Trp Leu Gln Ala Ser Phe Trp Ser Leu Leu Arg Val Gly
 530 535 540 545

aat gtt tgacaggagc aaggagagcc agcagagggc agcagagcat ggcttctcct 1927
 Asn Val

ES 2 377 188 T3

```

gctctctctg gctcactcac ctcccaggag ttactgagga gctggcaaag ggagggctga 1987
gtagaccaa caggccattt tgatccttgc tgtaagcag ccacaaataa tcttaagatg 2047
aagcaagcaa catccacttc agcctcagcc acgtcaaagg ctggtgcctg agctcacact 2107
ggccagttcc taaatgtcag gagttgtgca atagaacctg ggaaggaaca actggttgat 2167
cagaggtcac tgacaaggga cttaatgtta ccatctgctg tggggctttt gtttcgtttt 2227
gtttgtttgt tatgtgtatt caacttatca gcttttacgt tgaaaacatg aaaagcaaga 2287
caaatttgtt agatatcaca tataatgtga aatataatag ttaataaatt gagtaggaaa 2347
gctgagggca tgtaatagac agagggaaaa gaagaggaaa gccagtctgg tctacaaagt 2407
gagttccagg acagccaggg ctacatggag aaaccctgtc tcaatcaatc aatcaatcaa 2467
tcaatcagtc aatcaatcaa aattcaagca gcattgacaa gttttgcaat aactactata 2527
aaccaaaaaa gtcatcttga tgtatctcag aagccccttg ttatttatgt tcctgaagac 2587
taaagtagac cgtggctctg agaaccatga gcaagataac acgttctgtc ctgcagccta 2647
acaatgcctt cttgggtattc tttttgatac aacttctaaa ataacttttt tttaaaaaaa 2707
ataaaaatca tgttacagct a 2728

```

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

 <400> 114

```

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

```

ES 2 377 188 T3

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

- 5 <210>115
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>Cebador ZC41.764
- 10 <400> 115
 atcgaattca gaccaatggc ttctctgtg 30
- <210> 116
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Cebador ZC41.598
- 20 <400> 116
 acagtagtgt tctgactcag ttgg 24
- <210> 117
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Cebador ZC41.948
- 30 <400> 117
 ggtactgttc tcttgtctc g 21

ES 2 377 188 T3

5
 <210> 118
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador ZC41.766

10
 <400> 118
 atctctagat gtttactgtt caccttg 27

15
 <210> 119
 <211> 4026
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

20
 <220>
 <221> CDS
 <222> (780)...(3692)

<400> 119

```

ctgtggacat tttaccatgc agccataaag agaggtcaaa aatgtctttc aagtgcccg 60
ttagtaaaga tctgatggcg ttctaaggag agaaaggaac ttggatcttc gtggacaaag 120
aattcaggtc ttagctgaa ggaggcgtgg ccacacaggg cgtttccagg tcctgtagag 180
gaagcacagt tcatagatct ctgtttotaac acgtctgtot tgctctgaac gccgaaagtc 240
aactcgatca caagtttgat ccaacagttt gacatttcag gtaattttca gacggagcgc 300
tggggttgga tctcccaagc aacacaattg gctctgtgca ggacacctgg cacggggcac 360
tgggtcgcag ctctgtccct ctccctccag gaacaacgat gctcaaggac cagcttttcc 420
tcccaggcct ctcccacttc ccttctcacc ggtgctgccc gcccggtccc gggaaccog 480
ccgctcgcag ggtcccgatc gttccccta catcccttgg gaccaggagc aaattcctgt 540
gggtcccagc agtgccaaa gtgctcagcg agacgggaaa ttgcaacagt acttggcct 600
tcggccctcc ccggcgctt tcccgtaact ccgcccctg gacacttgtc ccgtagtga 660
ttcatagctg gggcggggg ccgctccac acgctggac agacgtccgc gcccgctccc 720
ctgtgaggcc gaggaccggc aaggctccgg agcaggctgc caggcgggta atcagacca 779
atg gct ttc tct gtg gtc ctt cat cca gcc ttc ctc ctg gca gtg ctg 827
Met Ala Phe Ser Val Val Leu His Pro Ala Phe Leu Leu Ala Val Leu
  1           5           10          15

tcc ctg agg gca tcc cga agc gaa gtc ttg gag gag cct tta cca ttg 875
Ser Leu Arg Ala Ser Arg Ser Glu Val Leu Glu Glu Pro Leu Pro Leu
           20           25           30

act cct gag ata cat aaa gtt tct ttt caa ttg aaa ctt caa gaa gtg 923
Thr Pro Glu Ile His Lys Val Ser Phe Gln Leu Lys Leu Gln Glu Val
           35           40           45

aat tta gaa tgg act gtc cca gcc ctt act cat gaa gaa tta aac atg 971
Asn Leu Glu Trp Thr Val Pro Ala Leu Thr His Glu Glu Leu Asn Met
           50           55           60

ata ttt cag ata gag atc agt aga ctg aac ata tcc aac acc atc tgg 1019
Ile Phe Gln Ile Glu Ile Ser Arg Leu Asn Ile Ser Asn Thr Ile Trp
           65           70           75           80

gtg gag aat tat agc acc act gtg aag cgt gaa gaa gct gtg cgt tgg 1067
Val Glu Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Arg Glu Glu Ala Val Arg Trp
           85           90           95
    
```

ES 2 377 188 T3

aac tgg acg tct gat atc cct ttg gag tgt gtc aaa cat ttc ata aga 1115
Asn Trp Thr Ser Asp Ile Pro Leu Glu Cys Val Lys His Phe Ile Arg
100 105 110

atc agg gct ctg gta gat gac acc aag tcc ctt cca cag agt tcc tgg 1163
Ile Arg Ala Leu Val Asp Asp Thr Lys Ser Leu Pro Gln Ser Ser Trp
115 120 125

ggc aac tgg agt tcc tgg aaa gaa gtt aat gca aag gtt tcc gtt gaa 1211
Gly Asn Trp Ser Ser Trp Lys Glu Val Asn Ala Lys Val Ser Val Glu
130 135 140

cct gat aaa tca tta ata ttt cct aaa gac aaa gtg ttg gaa gaa ggc 1259
Pro Asp Lys Ser Leu Ile Phe Pro Lys Asp Lys Val Leu Glu Glu Gly
145 150 155 160

tcc aat gtc acc atc tgt ctg atg tat ggg cag aat gta tat aat gta 1307
Ser Asn Val Thr Ile Cys Leu Met Tyr Gly Gln Asn Val Tyr Asn Val
165 170 175

tcc tgt aag ttg caa gat gag cca atc cat gga gaa caa ctt gat tcc 1355
Ser Cys Lys Leu Gln Asp Glu Pro Ile His Gly Glu Gln Leu Asp Ser
180 185 190

cac gtg tca tta tta aaa ttg aac aat gta gtt ttc ctt agt gac aca 1403
His Val Ser Leu Leu Lys Leu Asn Asn Val Val Phe Leu Ser Asp Thr
195 200 205

ggg aca aac atc aat tgt caa gcc acg aag ggt cct aaa aga ata ttt 1451
Gly Thr Asn Ile Asn Cys Gln Ala Thr Lys Gly Pro Lys Arg Ile Phe
210 215 220

ggg act gtt ctc ttt gtc tcg aaa gtg ctc gag gaa cct aag aat gtt 1499
Gly Thr Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro Lys Asn Val
225 230 235 240

tcc tgt gaa acc cga gac ttt aag act ttg gac tgt tca tgg gaa cct 1547
Ser Cys Glu Thr Arg Asp Phe Lys Thr Leu Asp Cys Ser Trp Glu Pro
245 250 255

ggg gta gat acg act ttg act tgg cgt aaa caa aga ttc caa aac tac 1595
Gly Val Asp Thr Thr Leu Thr Trp Arg Lys Gln Arg Phe Gln Asn Tyr
260 265 270

act tta tgt gaa tcg ttc tct aag aga tgt gag gtt tct aac tac agg 1643
Thr Leu Cys Glu Ser Phe Ser Lys Arg Cys Glu Val Ser Asn Tyr Arg
275 280 285

aac tcc tat acc tgg caa atc act gaa ggc tca cag gaa atg tat aac 1691
Asn Ser Tyr Thr Trp Gln Ile Thr Glu Gly Ser Gln Glu Met Tyr Asn
290 295 300

ttt act ctc aca gct gaa aac caa cta agg aaa aga agt gtc aac att 1739
Phe Thr Leu Thr Ala Glu Asn Gln Leu Arg Lys Arg Ser Val Asn Ile
305 310 315 320

aat ttt aac ctg acc cat aga gtt cat cca aag gct ccg cag gac gtc 1787
Asn Phe Asn Leu Thr His Arg Val His Pro Lys Ala Pro Gln Asp Val
325 330 335

ES 2 377 188 T3

acc ctt aaa att ata ggt gct aca aaa gcc aac atg act tgg aag gtt 1835
 Thr Leu Lys Ile Ile Gly Ala Thr Lys Ala Asn Met Thr Trp Lys Val
 340 345 350

cac tcc cat gga aac aac tac aca ctt ttg tgt cag gtt aaa ctc caa 1883
 His Ser His Gly Asn Asn Tyr Thr Leu Leu Cys Gln Val Lys Leu Gln
 355 360 365

tat gga gaa gtg att cat gag cac aat gtt tct gtc cac atg agc gca 1931
 Tyr Gly Glu Val Ile His Glu His Asn Val Ser Val His Met Ser Ala
 370 375 380

aac tac ctc ttc agt gat ctg gat cca gac aca aag tac aag gct ttt 1979
 Asn Tyr Leu Phe Ser Asp Leu Asp Pro Asp Thr Lys Tyr Lys Ala Phe
 385 390 395 400

gtg cgc tgt gca agt gcc aac cac ttc tgg aaa tgg agc gac tgg acc 2027
 Val Arg Cys Ala Ser Ala Asn His Phe Trp Lys Trp Ser Asp Trp Thr
 405 410 415

caa aaa gag ttc agc aca ccc gag act gct ccc tca cag gct ctt gat 2075
 Gln Lys Glu Phe Ser Thr Pro Glu Thr Ala Pro Ser Gln Ala Leu Asp
 420 425 430

gta tgg aga caa gtg tgg tcg gag aat gga aga cgc att gtg act tta 2123
 Val Trp Arg Gln Val Trp Ser Glu Asn Gly Arg Arg Ile Val Thr Leu
 435 440 445

ttc tgg aag cca cta tta aaa tca cag gcc aat ggc aaa atc ata tcc 2171
 Phe Trp Lys Pro Leu Leu Lys Ser Gln Ala Asn Gly Lys Ile Ile Ser
 450 455 460

tat aat ata gtt gta gaa aat gaa gcc aaa cca act gag tca gaa cac 2219
 Tyr Asn Ile Val Val Glu Asn Glu Ala Lys Pro Thr Glu Ser Glu His
 465 470 475 480

tac tgt gtc tgg gca cca gcc ctc agc aca aac ctg agc ctt gac ctg 2267
 Tyr Cys Val Trp Ala Pro Ala Leu Ser Thr Asn Leu Ser Leu Asp Leu
 485 490 495

caa cct tac aag att cgc atc aca gcc aac aac agc atg ggg gca tct 2315
 Gln Pro Tyr Lys Ile Arg Ile Thr Ala Asn Asn Ser Met Gly Ala Ser
 500 505 510

cct gag tcc ttg atg gtc ctt tct aat gat tct gga cac gag gtc aag 2363
 Pro Glu Ser Leu Met Val Leu Ser Asn Asp Ser Gly His Glu Val Lys
 515 520 525

gaa aag aca att aaa ggt ata aag gat gca ttc aat att tct tgg gag 2411
 Glu Lys Thr Ile Lys Gly Ile Lys Asp Ala Phe Asn Ile Ser Trp Glu
 530 535 540

ccc gta tct gga gac acg atg gcc tat gtt gtg gac tgg tgt gca cat 2459
 Pro Val Ser Gly Asp Thr Met Gly Tyr Val Val Asp Trp Cys Ala His
 545 550 555 560

tcc cag gac caa cgc tgt gat ttg cag tgg aag aac ctt ggt ccc aat 2507
 Ser Gln Asp Gln Arg Cys Asp Leu Gln Trp Lys Asn Leu Gly Pro Asn
 565 570 575

acc aca agc acc acc atc acc tca gat gat ttt aaa cca ggc gtc cgt 2555

ES 2 377 188 T3

Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ile	Thr	Ser	Asp	Asp	Phe	Lys	Pro	Gly	Val	Arg		
			580					585					590				
tac	aac	ttc	aga	att	ttt	gaa	agg	tct	gtg	gaa	cac	aaa	gct	cgg	tta	2603	
Tyr	Asn	Phe	Arg	Ile	Phe	Glu	Arg	Ser	Val	Glu	His	Lys	Ala	Arg	Leu		
		595					600					605					
gta	gag	aaa	caa	aga	gga	tac	acc	cag	gaa	ctg	gct	cct	ttg	gtg	aat	2651	
Val	Glu	Lys	Gln	Arg	Gly	Tyr	Thr	Gln	Glu	Leu	Ala	Pro	Leu	Val	Asn		
	610					615					620						
cca	aaa	gtg	gag	att	cct	tac	tcg	acc	cct	aac	tcc	ttc	gtt	cta	aga	2699	
Pro	Lys	Val	Glu	Ile	Pro	Tyr	Ser	Thr	Pro	Asn	Ser	Phe	Val	Leu	Arg		
	625				630					635					640		
tgg	cca	gat	tat	gac	agc	gac	ttc	cag	gct	ggt	ttt	ata	aaa	ggg	tac	2747	
Trp	Pro	Asp	Tyr	Asp	Ser	Asp	Phe	Gln	Ala	Gly	Phe	Ile	Lys	Gly	Tyr		
				645				650						655			
ctc	gtg	tat	gtg	aaa	tcc	aag	gag	atg	cag	tgc	aac	caa	ccc	tgg	gaa	2795	
Leu	Val	Tyr	Val	Lys	Ser	Lys	Glu	Met	Gln	Cys	Asn	Gln	Pro	Trp	Glu		
			660					665					670				
agg	acc	ctc	ctt	cca	gat	aat	tca	gtc	ctc	tgt	aaa	tac	gac	atc	aat	2843	
Arg	Thr	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	Ser	Val	Leu	Cys	Lys	Tyr	Asp	Ile	Asn		
			675				680					685					
ggc	tca	gag	aca	aag	aca	ctc	acc	gtg	gaa	aac	ctt	cag	cca	gag	tcc	2891	
Gly	Ser	Glu	Thr	Lys	Thr	Leu	Thr	Val	Glu	Asn	Leu	Gln	Pro	Glu	Ser		
	690					695					700						
ctc	tat	gag	ttt	ttc	gtc	act	ccg	tac	acc	agc	gct	ggc	cca	gga	ccc	2939	
Leu	Tyr	Glu	Phe	Phe	Val	Thr	Pro	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Pro	Gly	Pro		
	705				710					715					720		
aat	gaa	acg	ttc	aca	aag	gtc	aca	act	cca	gat	gca	cgc	tcc	cac	atg	2987	
Asn	Glu	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Thr	Thr	Pro	Asp	Ala	Arg	Ser	His	Met		
				725					730					735			
ctg	ctg	cag	atc	ata	cta	ccc	atg	acc	ctc	tgc	gtc	ttg	ctc	agc	atc	3035	
Leu	Leu	Gln	Ile	Ile	Leu	Pro	Met	Thr	Leu	Cys	Val	Leu	Leu	Ser	Ile		
			740					745					750				
att	gtc	tgc	tac	tgg	aaa	agt	cag	tgg	gtg	aag	gag	aag	tgc	tac	cct	3083	
Ile	Val	Cys	Tyr	Trp	Lys	Ser	Gln	Trp	Val	Lys	Glu	Lys	Cys	Tyr	Pro		
		755					760					765					
gac	att	ccc	aat	ccg	tac	aag	agc	agc	att	ctg	tca	ctc	ata	aaa	tcc	3131	
Asp	Ile	Pro	Asn	Pro	Tyr	Lys	Ser	Ser	Ile	Leu	Ser	Leu	Ile	Lys	Ser		
	770					775					780						
aag	aag	aat	cct	cac	tta	ata	atg	aat	gtc	aaa	gac	tgc	att	cca	gat	3179	
Lys	Lys	Asn	Pro	His	Leu	Ile	Met	Asn	Val	Lys	Asp	Cys	Ile	Pro	Asp		
	785				790					795					800		
gtc	ctt	gaa	gtg	ata	aac	aaa	gca	gaa	ggc	agc	aag	aca	cag	tgt	gta	3227	
Val	Leu	Glu	Val	Ile	Asn	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Lys	Thr	Gln	Cys	Val		
				805					810					815			
ggc	tct	ggg	aaa	ctt	cac	att	gaa	gat	gta	ccc	act	aag	ccg	cca	atc	3275	
Gly	Ser	Gly	Lys	Leu	His	Ile	Glu	Asp	Val	Pro	Thr	Lys	Pro	Pro	Ile		

ES 2 377 188 T3

```

      820              825              830
gtg cca aca gaa aag gat tcc tca ggg cct gtg ccc tgc atc ttc ttt 3323
Val Pro Thr Glu Lys Asp Ser Ser Gly Pro Val Pro Cys Ile Phe Phe
      835              840              845

gag aat ttt act tac gat cag tca gct ttt gac tct ggt tcc cat ggc 3371
Glu Asn Phe Thr Tyr Asp Gln Ser Ala Phe Asp Ser Gly Ser His Gly
      850              855              860

ctc att cca ggt ccc cta aaa gac aca gca cac caa ctt gga cta ttg 3419
Leu Ile Pro Gly Pro Leu Lys Asp Thr Ala His Gln Leu Gly Leu Leu
      865              870              875

gct cca cct aac aag ttc cag aac gta tta aaa aat gac tac atg aag 3467
Ala Pro Pro Asn Lys Phe Gln Asn Val Leu Lys Asn Asp Tyr Met Lys
      885              890              895

ccc ctg gtc gaa agt cca act gaa gaa act agc ttg att tat gtg tca 3515
Pro Leu Val Glu Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ser Leu Ile Tyr Val Ser
      900              905              910

cag ctg gct tca ccc atg tgc gga gac aag gac acg ctt gcc aca gaa 3563
Gln Leu Ala Ser Pro Met Cys Gly Asp Lys Asp Thr Leu Ala Thr Glu
      915              920              925

cca ccc gtg cca gtg cat ggt tca gag tat aaa agg caa atg gta gtt 3611
Pro Pro Val Pro Val His Gly Ser Glu Tyr Lys Arg Gln Met Val Val
      930              935              940

ccc ggg agc ctc gca tca cct tct ctg aag gag gat aac agc ttg acc 3659
Pro Gly Ser Leu Ala Ser Pro Ser Leu Lys Glu Asp Asn Ser Leu Thr
      945              950              955              960

tca acg gtc ctc tta ggc caa ggt gaa cag taa acaccacgca gcacaaataa 3712
Ser Thr Val Leu Leu Gly Gln Gly Glu Gln *
      965              970

atgcactcca cacactatag gcactttggg agatgtagct gttaccatgc caacaccacg 3772
tgccctgggt ggtccaggg gtgggggttg aggggagact cattatctgc agtgctgatt 3832
tatcaacgat cactacagac caacagactt aaggaccata taatatggtg ttcaccctga 3892
aggcgttccc tagaaatggc agatccgaga gcatgctgac cttgctatta tttgggtccag 3952
gctcaccctt attgcagtag cttgacatag ggtgtacacc agtcatttcg cagagcctac 4012
ctactcaaaa ctac 4026

```

<210> 120
 <211> 970
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 120

```

Met Ala Phe Ser Val Val Leu His Pro Ala Phe Leu Leu Ala Val Leu
  1          5          10          15
Ser Leu Arg Ala Ser Arg Ser Glu Val Leu Glu Glu Pro Leu Pro Leu
      20          25          30
Thr Pro Glu Ile His Lys Val Ser Phe Gln Leu Lys Leu Gln Glu Val
      35          40          45
Asn Leu Glu Trp Thr Val Pro Ala Leu Thr His Glu Glu Leu Asn Met
      50          55          60
Ile Phe Gln Ile Glu Ile Ser Arg Leu Asn Ile Ser Asn Thr Ile Trp
      65          70          75          80

```

10

				565					570				575		
Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ile	Thr	Ser	Asp	Asp	Phe	Lys	Pro	Gly	Val	Arg
			580					585					590		
Tyr	Asn	Phe	Arg	Ile	Phe	Glu	Arg	Ser	Val	Glu	His	Lys	Ala	Arg	Leu
		595					600					605			
Val	Glu	Lys	Gln	Arg	Gly	Tyr	Thr	Gln	Glu	Leu	Ala	Pro	Leu	Val	Asn
	610					615					620				
Pro	Lys	Val	Glu	Ile	Pro	Tyr	Ser	Thr	Pro	Asn	Ser	Phe	Val	Leu	Arg
625					630					635					640
Trp	Pro	Asp	Tyr	Asp	Ser	Asp	Phe	Gln	Ala	Gly	Phe	Ile	Lys	Gly	Tyr
			645					650					655		
Leu	Val	Tyr	Val	Lys	Ser	Lys	Glu	Met	Gln	Cys	Asn	Gln	Pro	Trp	Glu
			660					665					670		
Arg	Thr	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	Ser	Val	Leu	Cys	Lys	Tyr	Asp	Ile	Asn
		675					680					685			
Gly	Ser	Glu	Thr	Lys	Thr	Leu	Thr	Val	Glu	Asn	Leu	Gln	Pro	Glu	Ser
	690					695					700				
Leu	Tyr	Glu	Phe	Phe	Val	Thr	Pro	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Pro	Gly	Pro
705					710					715					720
Asn	Glu	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Thr	Thr	Pro	Asp	Ala	Arg	Ser	His	Met
				725					730					735	
Leu	Leu	Gln	Ile	Ile	Leu	Pro	Met	Thr	Leu	Cys	Val	Leu	Leu	Ser	Ile
			740					745					750		
Ile	Val	Cys	Tyr	Trp	Lys	Ser	Gln	Trp	Val	Lys	Glu	Lys	Cys	Tyr	Pro
		755					760					765			
Asp	Ile	Pro	Asn	Pro	Tyr	Lys	Ser	Ser	Ile	Leu	Ser	Leu	Ile	Lys	Ser
	770					775					780				
Lys	Lys	Asn	Pro	His	Leu	Ile	Met	Asn	Val	Lys	Asp	Cys	Ile	Pro	Asp
785					790						795				800
Val	Leu	Glu	Val	Ile	Asn	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Lys	Thr	Gln	Cys	Val
				805					810					815	
Gly	Ser	Gly	Lys	Leu	His	Ile	Glu	Asp	Val	Pro	Thr	Lys	Pro	Pro	Ile
			820					825					830		
Val	Pro	Thr	Glu	Lys	Asp	Ser	Ser	Gly	Pro	Val	Pro	Cys	Ile	Phe	Phe
		835					840					845			
Glu	Asn	Phe	Thr	Tyr	Asp	Gln	Ser	Ala	Phe	Asp	Ser	Gly	Ser	His	Gly
	850					855					860				
Leu	Ile	Pro	Gly	Pro	Leu	Lys	Asp	Thr	Ala	His	Gln	Leu	Gly	Leu	Leu
865					870					875					880
Ala	Pro	Pro	Asn	Lys	Phe	Gln	Asn	Val	Leu	Lys	Asn	Asp	Tyr	Met	Lys
				885					890					895	
Pro	Leu	Val	Glu	Ser	Pro	Thr	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Ile	Tyr	Val	Ser
		900						905					910		
Gln	Leu	Ala	Ser	Pro	Met	Cys	Gly	Asp	Lys	Asp	Thr	Leu	Ala	Thr	Glu
		915						920					925		
Pro	Pro	Val	Pro	Val	His	Gly	Ser	Glu	Tyr	Lys	Arg	Gln	Met	Val	Val
	930					935					940				
Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Glu	Asp	Asn	Ser	Leu	Thr
945					950						955				960
Ser	Thr	Val	Leu	Leu	Gly	Gln	Gly	Glu	Gln						
				965					970						

<210> 121
 <211> 2910
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polinucleótido degenerado que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 120.

10

<221> misc_feature
 <222> (1)...(2910)
 <223> N = A, T, G o C

<221> misc_feature
 <222> (1)...(2910)
 <223> n = A, T, C o G

5

<400> 121

atggcnttyw	sngtngtnyt	ncayccngcn	ttytntytng	engtnytntws	nytnmgngcn	60
wsmngnwsng	argtnytnga	rgarccnytn	ccnytnacnc	cngarathca	yaargtnwsn	120
ttycarytna	arytncarga	rgtnaayyt	gartggacng	tnccngcnyt	nacncaygar	180
garytnaaya	tgathttyca	rathgarath	wsmngnytna	ayathwsnaa	yacnathtgg	240
gtngaraayt	aywsnacnac	ngtnaarmgn	gargargcng	tnmgntggaa	ytggacnwsn	300
gayathccny	tngartgygt	naarcaytty	athmgnathm	gngcnytngt	ngaygayacn	360
aarwsnytn	cncarwsnws	ntggggnaay	tggwsnwsnt	ggaargargt	naaygcnaar	420
gtnwsngtng	arccngayaa	rwsnytnath	ttyccnaarg	ayaargtnyt	ngargarggn	480
wsnaaygtna	cnathtgyyt	natgtayggn	caraaygtnt	ayaaygtntws	ntgyaarytn	540
cargaygarc	cnathcaygg	ngarcarytn	gaywsncayg	tnwsnytnyt	naarytnaay	600
aaygtngtnt	tyytnwsnga	yacnggnacn	aayathaayt	gycargcnac	naarggnccn	660
aarmgnatht	tyggnacngt	nytnnttygt	wsnaargtnt	tngargarcc	naaraaygt	720
wsntgygara	cnmgngaytt	yaaracnytn	gaytgywsnt	gggarccngg	ngtngayacn	780
acnytnacnt	ggmgnaarca	rmgnttycar	aaytayaacny	tntgygarws	nttywsnaar	840
mgntgygarg	tnwsnaayta	ymgnaaywsn	tayacntggc	arathacnga	rggnwsncar	900
garatgtaya	ayttyacny	nacngcngar	aaycarytnm	gnaarmgnws	ngtnaayath	960
aayttyaayy	tnacncaymg	ngtncaayccn	aargcncnc	argaygtnac	nytnaarath	1020
athggngcna	cnaargcnaa	yatgacntgg	aargtncaayw	sncayggnaa	yaaytayaacn	1080
ytnytntgyc	argtnaaryt	ncartayggn	gargtnathc	aygarcayaa	ygtnwsngtn	1140
cayatgwsng	cnaaytayyt	nttywsngay	ytngayccng	ayacnaarta	yaargcntty	1200
gtnmngtygy	cnwsngcnaa	ycayttytgg	aartggwsng	aytggacnca	raargartty	1260
wsnacccng	aracngcnc	nwsncargcn	ytngaygtnt	ggmgncargt	ntggwsngar	1320
aayggnmgnm	gnathgtnac	nytnnttytgg	aarccnytny	tnaarwsnca	rgcnaayggn	1380
aarathathw	sntayaayat	hgtngtngar	aaygargcna	arccnacnga	rwsngarccay	1440
taytgygtnt	gggcncngc	nytnwsnacn	aayytnwsny	tngayytnca	rcntayaar	1500
athmgnatha	cngcnaayaa	ywsnatgggn	gcnwsncng	arwsnytnat	ggtnytnwsn	1560
aaygaywsng	gncaygargt	naargaraar	acnathaarg	gnathaarga	ycnttyaay	1620
athwsntggg	arccngtntws	nggngayacn	atgggntayg	tngtngaytg	gtgygcncay	1680
wsncargayc	armgntgyga	yytncartgg	aaraayytng	gncnaayac	nacnwsnacn	1740
acnathacnw	sngaygaytt	yaarccnggn	gtnmngtaya	ayttymgnat	httygarmgn	1800
wsngtngarc	ayaargcnmg	nytngtngar	aarcarmgng	gntayaacnca	rgarytnngcn	1860
ccnytngtna	ayccnaargt	ngarathccn	taywsnacnc	cnaaywsntt	ygtnytnmgn	1920
tggccngayt	aygaywsnga	yttycargcn	ggnttyatha	arggntayyt	ngtntaygt	1980
aarwsnaarg	aratgcartg	yaaycarccn	tgggarmgna	cnytnytnc	ngayaaywsn	2040
gtnytntgya	artaygayat	haayggwnsn	garacnaara	cnytnacngt	ngaraayyt	2100
carccngarw	snytnayga	rttyttygt	acnccntaya	cnwsngcngg	ncnggnccn	2160
aaygaracnt	tyacnaargt	nacnacccn	gaygcnmgnw	sncayatgyt	nytnarath	2220
athytnccna	tgacnytntg	ygtnytnyt	wsnathathg	tntgytaytg	gaarwsncar	2280
tgggtnaarg	araartgyta	ycngayath	ccnaayccnt	ayaarwsnws	nathytnwsn	2340
ytfnatharw	snaaraaraa	yccncayyt	athatgaayg	tnaargaytg	yathccngay	2400
gtnytnngarg	tnathaayaa	rgcngarggn	wsnaaracnc	artgygtngg	nwsnggnaar	2460
ytncaayathg	argaygtnc	nacnaarccn	ccnathgtnc	cnacngaraa	rgaywsnwsn	2520
ggncngtnc	cntgyathtt	ytytgaraay	ttyacntayg	aycarwsngc	nttygaywsn	2580
ggwnsncaayg	gnytnathcc	nggnccnytn	aargayacng	cncaycaryt	nggnytnyt	2640
gncncncna	ayaarttyca	raaygtnytn	aaraaygayt	ayatgaarcc	nytngtngar	2700
wsnccnacng	argaracnws	nytnathtay	gtnwsncary	tngcnwsncc	natgtgyggn	2760
gayaargaya	cnytnacnac	ngarccncn	gtncngtnc	ayggwnsnga	rtayaarmgn	2820
caratggtng	tnccngnws	nytnngcnwsn	ccnwsnytna	argargayaa	ywsnytnacn	2880
wsnacngtnt	nytnngcnca	rggngarcar				2910

<210> 122
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Cebador ZC43891

15

<400> 122
 gggcagtagg atatgaatca gcat 24

5

<210> 123
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Cebador ZC43900

<400> 123
 gaaggcccca gtgctacgt 19

15

<210> 124
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> ZC43896 sonda de OSMRbeta

<400> 124
 tcatccggag tcgtgacctt cgtg 24

25

<210> 125
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Cebador ZC43280

35

<400> 125
 gagcacgccc ttctttcct 20

40

<210> 126
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador ZC43281

<400> 126
 cgttgcccggt cggtttacta 20

50

<210> 127
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> ZC43275 sonda de zcytor17lig

<400> 127
 ctgtaattcc tcgactattt tctgtacatc atcacttggt 40

60

<210> 128
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador ZC40574

 <400> 128
 5 ctcatttga atttgccga tt 22

 <210> 129
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador ZC40575

 <400> 129
 15 ccgagtgaag atccccttt ta 22

 <210> 130
 <211> 26
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ZC43017 sonda GUS

 <400> 130
 25 tgaacagtca ccgacgagag tgctgg 26

 <210> 131
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador ZC28480

 <400> 131
 35 cgattcagga cagtcaacag tacc 24

 <210> 132
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador ZC41653

 <400> 132
 45 ccttcgtgaa cgtagcactg g 21

 <210> 133
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador ZC41655

 <400> 133 19
 55 ctgaaatcca aggcgagc 19

 <210> 134
 <211> 20
 <212> ADN
 60

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador ZC41703
 5
 <400> 134 20
 tgaagctggc cttgctctct 20
 <210> 135
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador ZC41704
 15
 <400> 135 19
 gagatagcc cggatggct 19
 20
 <210> 136
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador ZC43272
 <400> 136 24
 gctggtatca ttggttcct tctc 24
 30
 <210> 137
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador ZC43273
 <400> 137 24
 cattctcttt cctctgcaaa ttca 24
 40
 <210> 138
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> ZC43478 sonda de zcytor17
 50
 <400> 138
 tagagaacat ttctgcgctc ttttactcg acag 34
 <210> 139
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador ZC43278
 60
 <400> 139
 aaacaagagt ctcaggatct ttataacaac 30
 <210> 140

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador ZC43279

<400> 140
 acggcagctg tattgattcg t 21

10

<210> 141
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> ZC43276 sonda de zcytor17lig

<400> 141
 taaagcaggc atctgggatg tcagca 26

20

<210> 142
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Cebador ZC43045

30

<400> 142
 aaacatgata tttcagatag agatcagtag act 33

<210> 143
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Cebador ZC43046

40

<400> 143
 cttatgaaat gtttgacaca ctcaa 26

45

<210> 144
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> ZC43141 de sonda de OSMRbeta

<400> 144
 ctgtgcgttg gaactggacg tctgatatc 29

55

<210> 145
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> Cebador ZC43004

<400> 145

gaaacccgcc gcatattact t 21
 <210> 146
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador ZC43005
 10
 <400> 146
 tggcgttgct cacaaaggt 19
 <210> 147
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> ZC43018 de sonda de GUS murino
 20
 <400> 147
 acccacacca aagccctgga cctc 24
 25
 <210> 148
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador ZC40269
 <400> 148
 gccagtttca cacactcctc ttt 23
 35
 <210> 149
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador ZC40268
 <400> 149
 gcagctattg cactagtcac tttctt 26
 45
 <210> 150
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Sonda de receptor de transferrina ZC40298
 55
 <400> 150
 cccagtagc cactcatgaa tccaatcaa 29
 60
 <210> 151
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador ZC43140

<400> 151
 ttctccaca gcaatcgcac 20

5 <210> 152
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador ZC43139

15 <400> 152
 atgcatgctt cggttcagaa c 21

20 <210> 153
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador ZC41608

30 <400> 153
 gcagacaatg atgctgagca agac 24

35 <210> 154
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador ZC41609

45 <400> 154
 caacgctgtg attgcagtg gaag 24

50 <210> 155
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador ZC41502

60 <400> 155
 agcgggcctt cctcactc 18

65 <210> 156
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70 <220>
 <223> Cebador ZC41500

75 <400> 156
 ggacaaaata aaaacataaa taac 24

80 <210> 157
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 377 188 T3

<220>
 <223> Engarce

5 <400> 157
 tgtc gatgaa gccctgaaag acg cgcagac taattcgagc 40

10 <210> 158
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Engarce

 <400> 158
 acg cgcagac taattcgagc tcccaccatc accatcacca cg cgaattcg gtaccgctgg 60

20 <210> 159
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Engarce

 <400> 159
 actcactata gggcgaattg cccgggggat ccacgcggaa ccagcggtac cgaattcgcg 60

30 <210> 160
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Engarce

 <400> 160
 acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tg 42

40 <210> 161
 <211> 825
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <221> CDS
 <222> (48)...(518)

50 <400> 161

ES 2 377 188 T3

```

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

atg caa ctc ctg tct tgc att gca cta att ctt gca ctt gtc aca aac 104
Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu Val Thr Asn
   5                               10                               15

agt gca cct act tca agt tgc aca aag aaa aca aag aaa aca cag cta 152
Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Lys Lys Thr Gln Leu
  20                               25                               30                               35

caa ctg gag cat tta ctg ctg gat tta cag atg att ttg aat gga att 200
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
                               40                               45                               50

aat aat tac aag aat ccc aaa ctc acc agg atg ctc aca ttt aag ttt 248
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
                               55                               60                               65

tac atg ccc aag aag gcc aca gaa ctg aaa cag ctt cag tgt cta gaa 296
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Cys Leu Glu
                               70                               75                               80

gaa gaa ctc aaa cct ctg gag gaa gtg ctg aat tta gct caa agc aaa 344
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
   85                               90                               95

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

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

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

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

aaaacatata aggcttcta tttatttatt taaatattta aattttatat ttattgttga 598
atgtatggtt gctacctatt gtaactatta ttcttaactt taaaactata aatatggatc 658
ttttatgatt ctttttgtaa gccctagggg ctctaaaatg gtttacctta tttatcccaa 718
aaatatttat tattatggtg aatgtaaat atagtatcta tgtagattgg ttagtaaac 778

```

tatttaataa atttgataaa tataaaaaaa aaaaacaaaa aaaaaaa 825

- <210> 162
- <211> 156
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 162

ES 2 377 188 T3

```

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

```

- <210> 163
- <211> 614
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (64)...(525)

- <400> 163

```

gategttagc ttctcctgat aaactaattg cctcacattg tcaactgcaaa tcgacaccta 60
tta atg ggt ctc acc tcc caa ctg ctt ccc cct ctg ttc ttc ctg cta 108
  Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu
    1      5      10      15
gca tgt gcc ggc aac ttt gtc cac gga cac aag tgc gat atc acc tta 156
Ala Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Ile Thr Leu
      20      25      30
cag gag atc atc aaa act ttg aac agc ctc aca gag cag aag act ctg 204
Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu
      35      40      45
tgc acc gag ttg acc gta aca gac atc ttt gct gcc tcc aag aac aca 252
Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr
      50      55      60
act gag aag gaa acc ttc tgc agg gct gcg act gtg ctc cgg cag ttc 300
Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe
      65      70      75

```

ES 2 377 188 T3

```

tac agc cac cat gag aag gac act cgc tgc ctg ggt gcg act gca cag 348
Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln
 80 85 90 95

cag ttc cac agg cac aag cag ctg atc cga ttc ctg aaa cgg ctc gac 396
Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp
 100 105 110

agg aac ctc tgg ggc ctg gcg ggc ttg aat tcc tgt cct gtg aag gaa 444
Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu
 115 120 125

gcc aac cag agt acg ttg gaa aac ttc ttg gaa agg cta aag acg atc 492
Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile
 130 135 140

atg aga gag aaa tat tca aag tgt tgc agc tga atattttaat ttatgagttt 545
Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser *
 145 150

ttgatagcct tatttttttaa gtattttatat atttataact catcataaaa taaagtatat 605
atagaatct 614

```

5
 <210> 164
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 164

```

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

```

10
 15
 20
 <210> 165
 <211> 756
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (9)...(443)
 <440> 165

ES 2 377 188 T3

```

gctggagg atg tgg ctg cag agc ctg ctg ctc ttg ggc act gtg gcc tgc 50
      Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys
          1             5             10

agc atc tct gca ccc gcc cgc tgc ccc agc ccc agc acg cag ccc tgg 98
Ser Ile Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp
  15             20             25             30

gag cat gtg aat gcc atc cag gag gcc cgg cgt ctc ctg aac ctg agt 146
Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser
          35             40             45

aga gac act gct gct gag atg aat gaa aca gta gaa gtc atc tca gaa 194
Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu
          50             55             60

atg ttt gac ctc cag gag cgg acc tgc cta cag acc cgc ctg gag ctg 242
Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu
          65             70             75

tac aag cag ggc ctg cgg gcc agc ctc acc aag ctc aag gcc ccc ttg 290
Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu
  80             85             90

acc atg atg gcc agc cac tac aag cag cac tgc cct cca acc ccg gaa 338
Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu
  95             100             105             110

act tcc tgt gca acc cag act atc acc ttt gaa agt ttc aaa gag aac 386
Thr Ser Cys Ala Thr Gln Thr Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn
          115             120             125

ctg aag gac ttt ctg ctt gtc atc ccc ttt gac tgc tgg gag cca gtc 434
Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val
          130             135             140

cag gag tga gaccggccag atgaggctgg ccaagccggg gagctgctct 483
Gln Glu *

ctcatgaaac aagagctaga aactcaggat ggtcatcttg gagggaccaa ggggtgggcc 543
acagccatgg tgggagtggc ctggacctgc cctgggccac actgacctg atacaggcat 603
ggcagaagaa tgggaatatt ttatactgac agaaatcagt aatatttata tatttatatt 663
tttaaaatat ttatttattt atttatttaa gttcatattc catatttatt caagatgttt 723
taccgtaata attattatta aaaatatgct tct 756

```

<210> 166
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 166

5

ES 2 377 188 T3

```

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
 1      5      10      15
Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
      20      25      30
Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
      35      40      45
Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
      50      55      60
Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys

```

```

      65      70      75      80
Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
      85      90      95
Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
      100      105      110
Cys Ala Thr Gln Thr Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
      115      120      125
Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
      130      135      140

```

5 <210> 167
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(60)

15 <221> variación
 <222> (25)...(30)
 <223> n = A, G, C, o T

<221> misc_feature
 <222> (1)...(60)
 <223> n = A, T, C o G

20 <400> 167

```

gcc aca gaa ctg aaa cag ctt cag nnn nnn gaa gaa gaa ctc aaa cct 48
Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Xaa Xaa Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 1      5      10      15

ctg gag gaa gtg 60
Leu Glu Glu Val
      20

```

25 <210> 168
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)...(10)
 <223> Cualquier aminoácido

35 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(20)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 168

ES 2 377 188 T3

Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Xaa Xaa Glu Glu Glu Leu Lys Pro
1 5 10 15
Leu Glu Glu Val
20

5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una parte de la SEC ID N°: 2, en el que dicha parte consiste en entre 30 y 100 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, y en el que dicha parte contiene aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:
- 5 (a) los restos de aminoácido 54 a 59 de la SEC ID N°: 2;
 (b) los restos de aminoácido 129 a 134 de la SEC ID N°: 2;
 (c) los restos de aminoácido 53 a 58 de la SEC ID N°: 2;
 (d) los restos de aminoácido 35 a 40 de la SEC ID N°: 2;
 (e) los restos de aminoácido 33 a 38 de la SEC ID N°: 2;
- 10 (f) los restos de aminoácido 114 a 119 de la SEC ID N°: 2;
 (g) los restos de aminoácido 101 a 105 de la SEC ID N°: 2;
 (h) los restos de aminoácido 126 a 131 de la SEC ID N°: 2;
 (i) los restos de aminoácido 113 a 118 de la SEC ID N°: 2; y
 (j) los restos de aminoácido 158 a 162 de la SEC ID N°: 2.
- 15 2. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en restos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste en:
- (a) los restos de aminoácido 54 a 59 de la SEC ID N°: 2;
 (b) los restos de aminoácido 129 a 134 de la SEC ID N°: 2;
 (c) los restos de aminoácido 53 a 58 de la SEC ID N°: 2;
- 20 (d) los restos de aminoácido 35 a 40 de la SEC ID N°: 2;
 (e) los restos de aminoácido 33 a 38 de la SEC ID N°: 2;
 (f) los restos de aminoácido 114 a 119 de la SEC ID N°: 2;
 (g) los restos de aminoácido 101 a 105 de la SEC ID N°: 2;
 (h) los restos de aminoácido 126 a 131 de la SEC ID N°: 2;
- 25 (i) los restos de aminoácido 113 a 118 de la SEC ID N°: 2; y
 (j) los restos de aminoácido 158 a 162 de la SEC ID N°: 2.
3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo de: (a) un anticuerpo policlonal, (b) un anticuerpo monoclonal murino, (c) un anticuerpo humanizado derivado de (b) y (d) un anticuerpo monoclonal humano.
- 30 4. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislados que se une específicamente a un polipéptido que consiste en una parte de la SEC ID N°: 11, en el que dicha parte consiste en entre 30 y 100 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 11, y en el que dicha parte contiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) los restos de aminoácido 34 a 39 de la SEC ID N°: 11;
 (b) los restos de aminoácido 46 a 51 de la SEC ID N°: 11;
- 35 (c) los restos de aminoácido 131 a 136 de la SEC ID N°: 11;
 (d) los restos de aminoácido 158 a 163 de la SEC ID N°: 11; y
 (e) los restos de aminoácido 157 a 162 de la SEC ID N°: 11.
5. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en restos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste en:
- 40 (a) los restos de aminoácido 34 a 39 de la SEC ID N°: 11;
 (b) los restos de aminoácido 46 a 51 de la SEC ID N°: 11;
 (c) los restos de aminoácido 131 a 136 de la SEC ID N°: 11;
 (d) los restos de aminoácido 158 a 163 de la SEC ID N°: 11; y
 (e) los restos de aminoácido 157 a 162 de la SEC ID N°: 11.
- 45 6. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo de: (a) un anticuerpo policlonal, (b) un anticuerpo monoclonal murino y (c) un anticuerpo monoclonal.
7. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el anticuerpo comprende además un radionúclido, un enzima, un sustrato, un cofactor, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador peptídico, una partícula magnética, un fármaco o una toxina.
- 50 8. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en la reducción de la inflamación inducida por un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 27 a 164 de la SEC ID N°: 2.
- 55 9. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de un mamífero que padece una enfermedad inflamatoria, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 27 a 164 de la SEC ID

Nº: 2.

10. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, para su uso para reducir la inflamación inducida por un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 31 a 163 de la SEC ID Nº: 11.

5 11. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, para su uso en el tratamiento de un mamífero que padece una enfermedad inflamatoria, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 31 a 163 de la SEC ID Nº: 11.

10 12. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para su uso en un procedimiento para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación, comprendiendo dicho procedimiento:

- (1) determinar el nivel de una molécula inflamatoria;
- (2) administrar dicho medicamento;
- (3) determinar un nivel de la molécula inflamatoria posterior a la administración;
- (4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (3), en el que la ausencia de aumento o la disminución en el nivel de molécula inflamatoria es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria.

15 13. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica, tal como una enfermedad inflamatoria crónica seleccionada del grupo de:

- (a) enfermedad inflamatoria intestinal;
- (b) colitis ulcerosa;
- (c) enfermedad de Crohn;
- (d) dermatitis atópica;
- (e) eccema; y
- (f) psoriasis.

20 14. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda, tal como una enfermedad inflamatoria aguda seleccionada del grupo de:

- (a) endotoxemia
- (b) septicemia;
- (c) síndrome de choque tóxico; y
- (d) enfermedad infecciosa.

25 15. Un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 27 a 164 de la SEC ID Nº: 2 en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

30 (a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el contacto se realiza en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la muestra biológica, y

(b) detectar cualquiera del anticuerpo unido o fragmento de anticuerpo unido.

35 16. Un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 31 a 163 de la SEC ID Nº: 11 en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

40 (a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el contacto se realiza en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la muestra biológica, y

(b) detectar cualquiera del anticuerpo unido o fragmento de anticuerpo unido.

45 17. Un procedimiento *in vitro* para detectar inflamación en un paciente, que comprende:

(a) incubar una muestra de tejido o muestra biológica de un paciente con un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en condiciones en las que el anticuerpo se une a su polipéptido complementario en el tejido o la muestra biológica;

(b) visualizar el anticuerpo unido en el tejido o la muestra biológica; y

50 (c) comparar los niveles de anticuerpo unido en el tejido o en la muestra biológica del paciente con un tejido o una muestra biológica de control normales, en el que un aumento en el nivel de anticuerpo unido al tejido o la muestra biológica del paciente con respecto al tejido o la muestra biológica de control normales es indicativo de inflamación en el paciente.

	1	15 16	30 31	45	
1 zcytor171ig	---ASHTLPVRLLRP	SDDVQKIVEEELSLS	KMLLKD--VEEEKGV		40
2 mzytor171ig	---ATCSLSFGAPIS	KEDLRTTIDLLKQES	QDLYNNYSIKQASGM		42
3 mIL-3	ASISGRDTHRLRTL	NCS-SIVKEIIGKL-	--PEP----ELKT--		35
4 hIL-3	APMTQTTPLKTSW-V	NCS-NMIDEIITHLK	QPPLP--LLDFNNLN		41
	46	60 61	75 76	90	
1 zcytor171ig	LVSQNYTLPCLSPDA	QPPNNIHSPAIRAYL	KTIRQLDNKSVIDEI		85
2 mzytor171ig	SADESIQLPCFSLDR	EALTNISVIIAHLEK	VKVLSE-NTVDTSWV		86
3 mIL-3	DDEGPSLRNKS----	-----FRRVNLSKFV	ESQGEVDPEDRYVIK		71
4 hIL-3	GEDQDILMENN----	-----LRRPNLEAFN	RAVKSL--QNASAIE		75
	91	105 106	120 121	135	
1 zcytor171ig	IEHLDKLIHQDAPET	NISVPTDTHE---CK	RFILTISQQFSECMD		127
2 mzytor171ig	IRWLTNISCFNPLNL	NISVPGNTDESVDCK	VFVLTVLKQFSNCMA		131
3 mIL-3	SNLQKLNCLPTSAN	DSALPGVFIRDLD--	DFRKKLRFYMVH-LN		113
4 hIL-3	SILKNLLPCLPLATA	APTRHPIHIKGDWN	EFRKLTFFY----LK		116
	136	150 151	165 166	180	
1 zcytor171ig	LALKSLTSGAQQATT				142
2 mzytor171ig	ELQAKDNTTC				141
3 mIL-3	DLETVLTSRPPQPAS	GSVSPNRGTVEC			140
4 hIL-3	TLENA----QAQTT	LSLAIF			133

FIG. 1

```

          10      20      30      40      50
ZCYTOR MASHSGPSTSVLFLFCCLGGWLASHTLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSLSKMLLKD--VEE
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
M17RL- MIFHTGTTKPTLVLLCCIGTWLATCSLSFGAPISKEDLRTTIDLLKQESQOLYNNYSIKQ
          10      20      30      40      50      60

          60      70      80      90      100     110
ZCYTOR EKGVLVSQNYTLPCLSPDAQPPNNIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDE-IIEHLDKLIFQ
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
M17RL- ASGMSADESIQLPCFSLDREALTNI--SVIIAHLEKVKVLSSENTVDTSWVIRWLTNISCF
          70      80      90      100     110

          120     130     140     150     160
ZCYTOR DAPETNISVPTDTHE---CKRFILTISQQFSECM-DLALKSLTSGAQQATT
      .. : : : : : : : : : : X: : : : : : : : : : X .. : : : :
M17RL- NPLNLNISVPGNTDESYDCKVFVLTVLKQFSNMAELQAKDNTTC
          120     130     140     150     160

```

FIG. 2

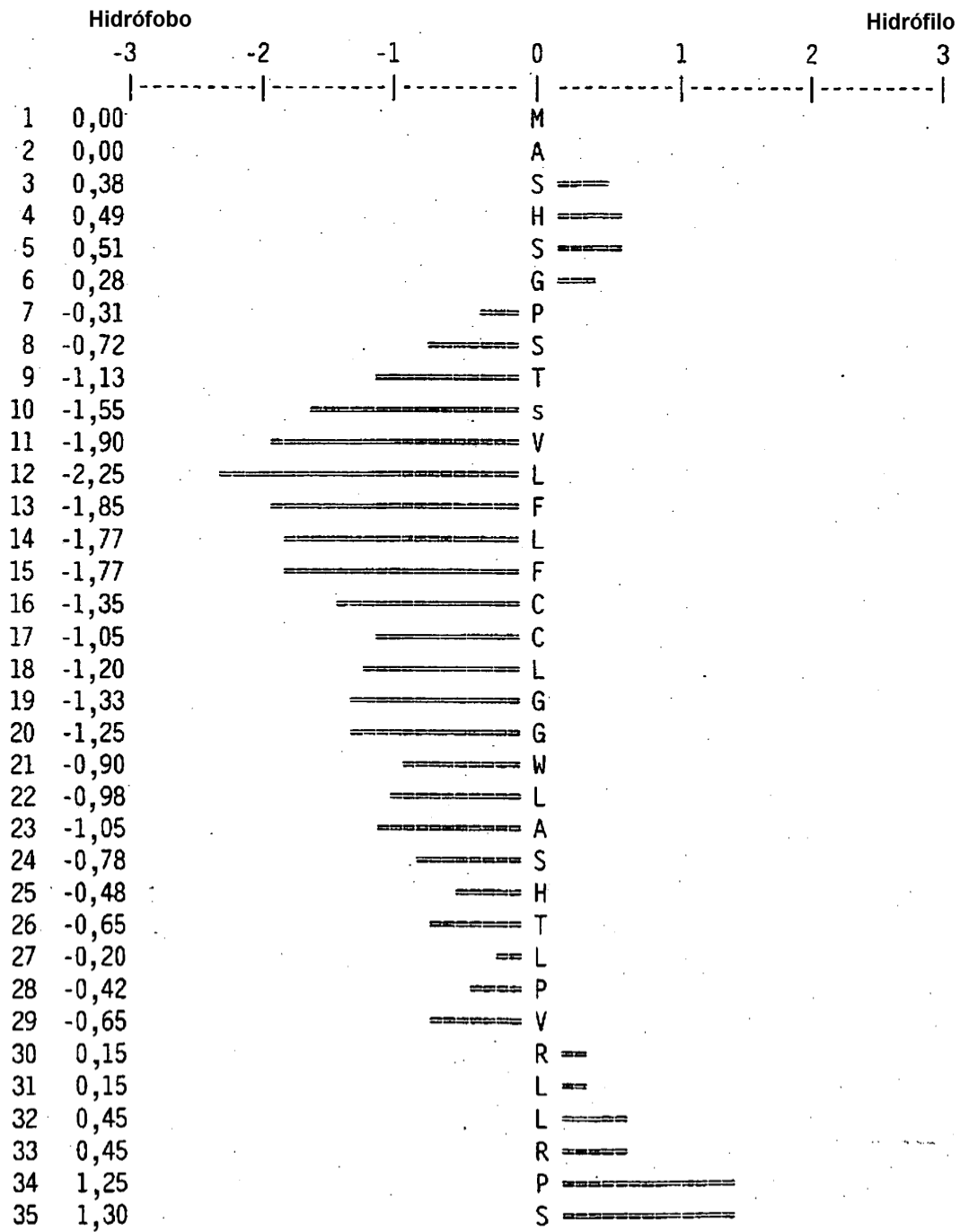


FIG. 3A

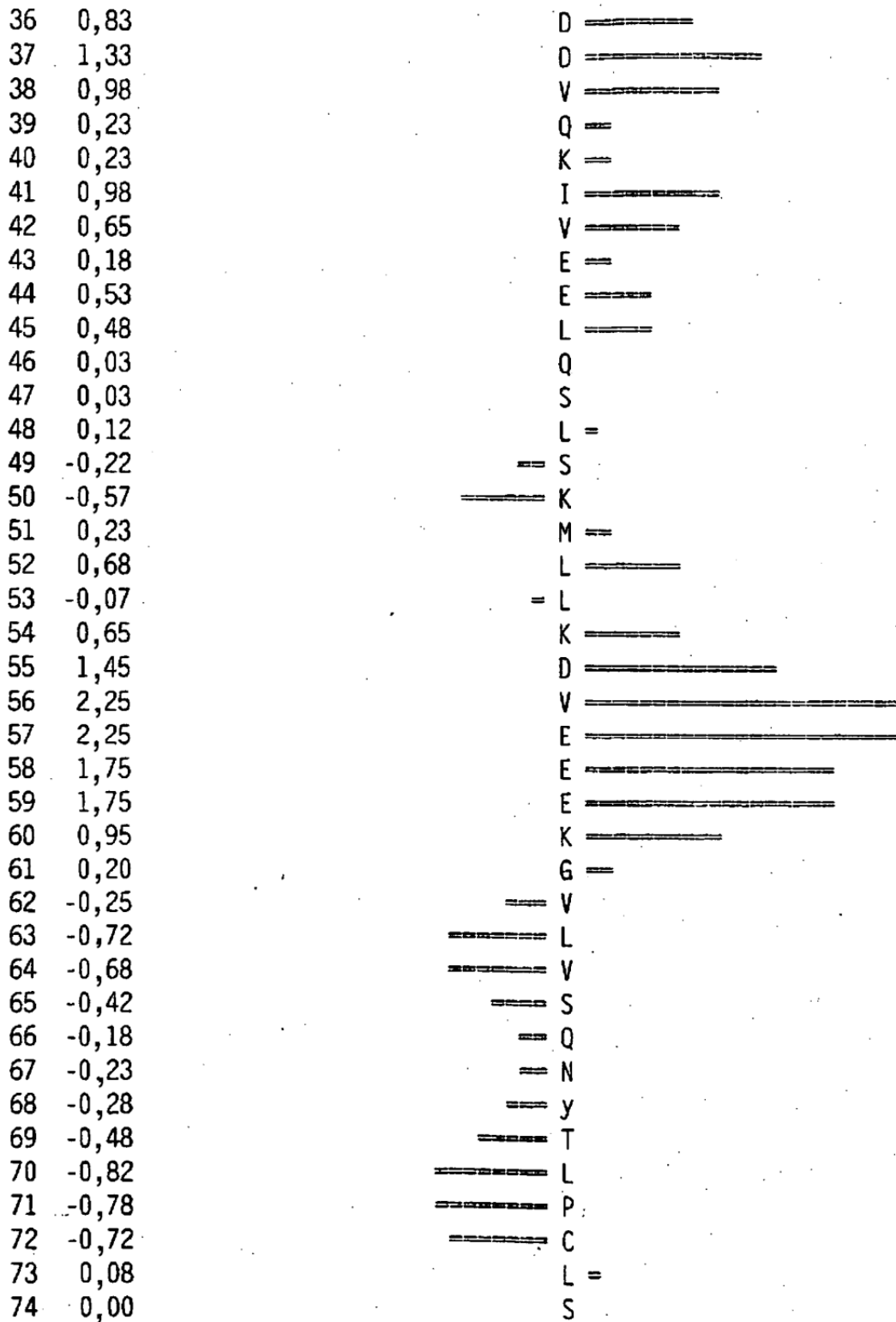


FIG. 3B

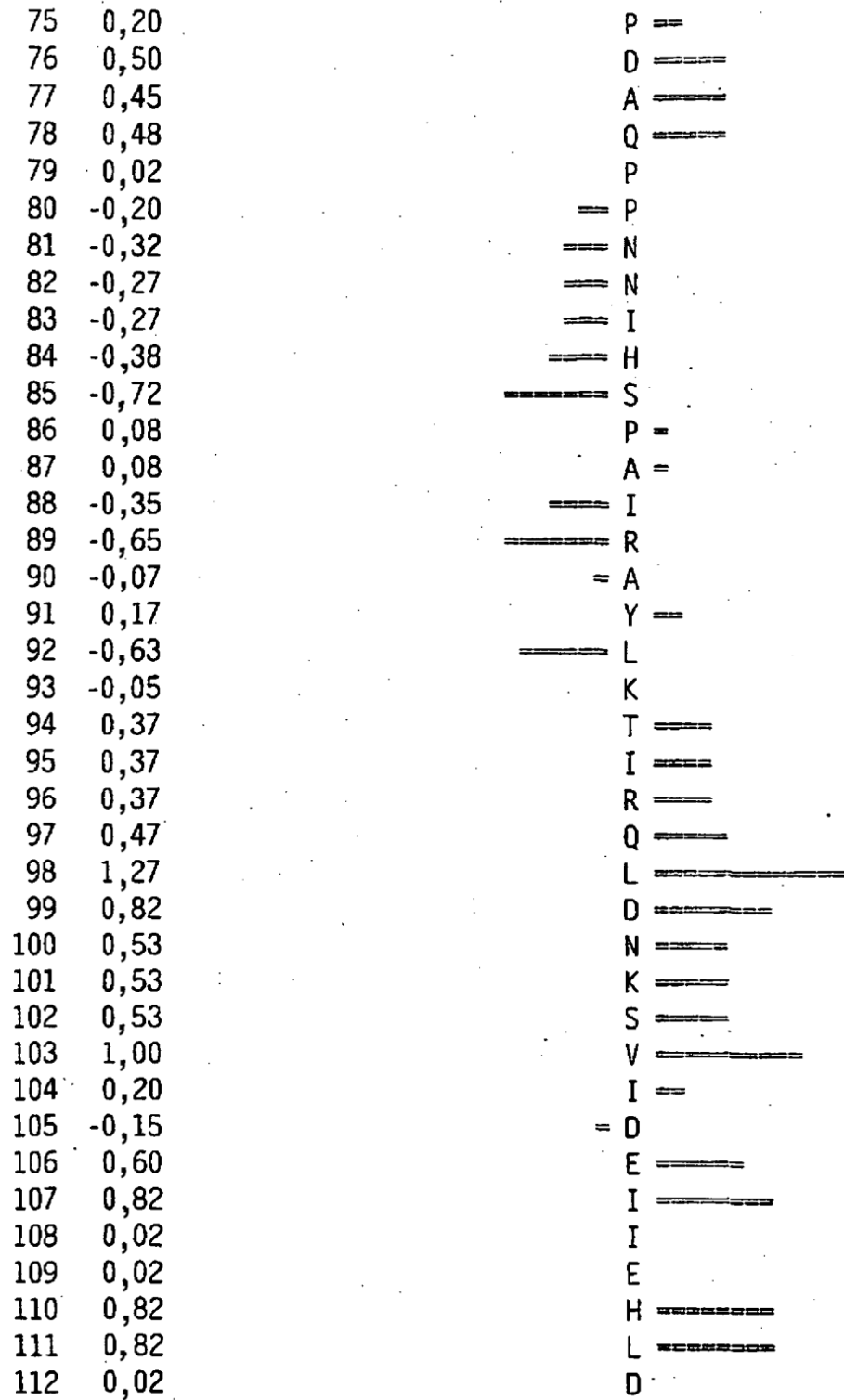


FIG. 3C

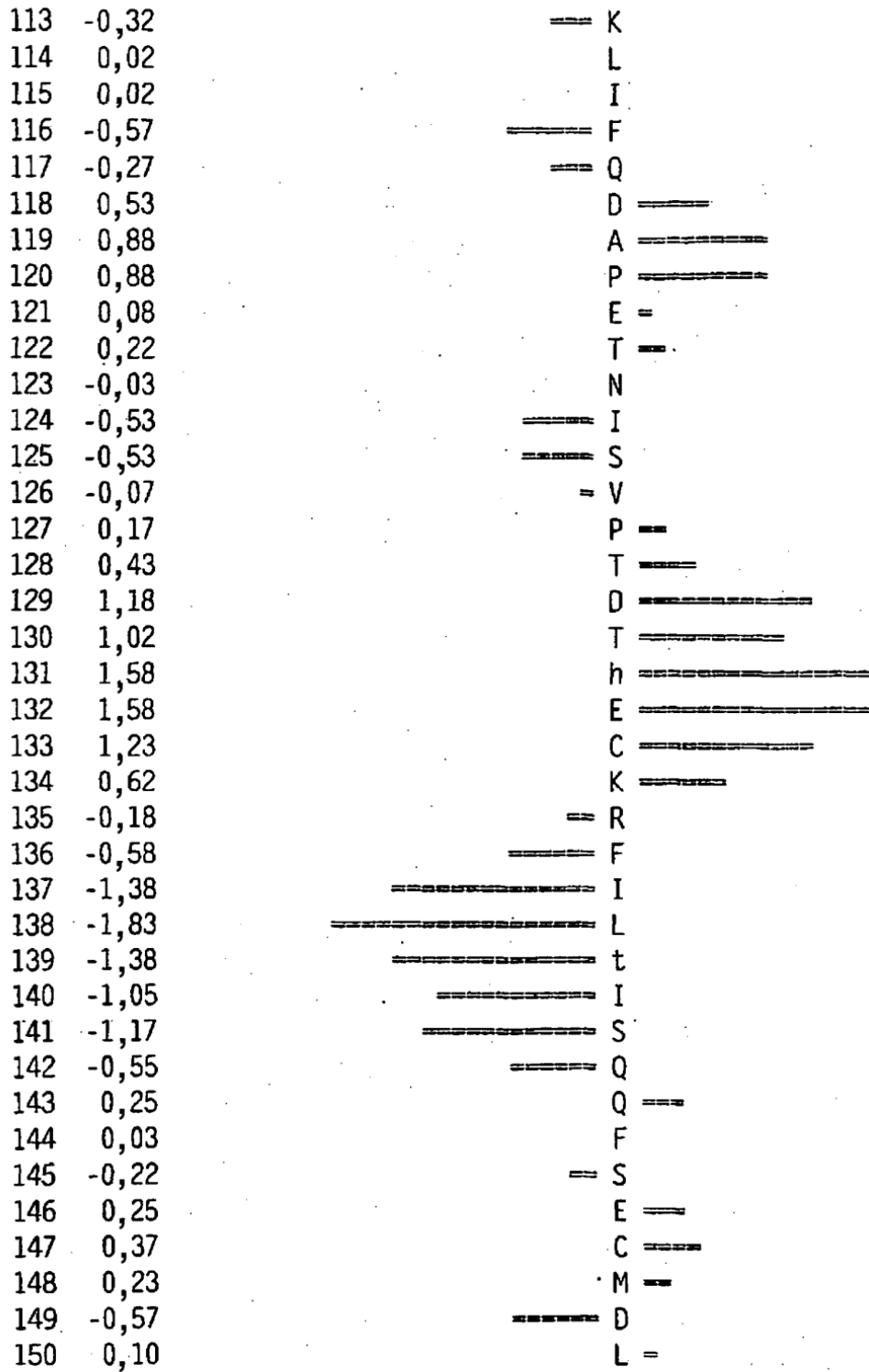


FIG. 3D

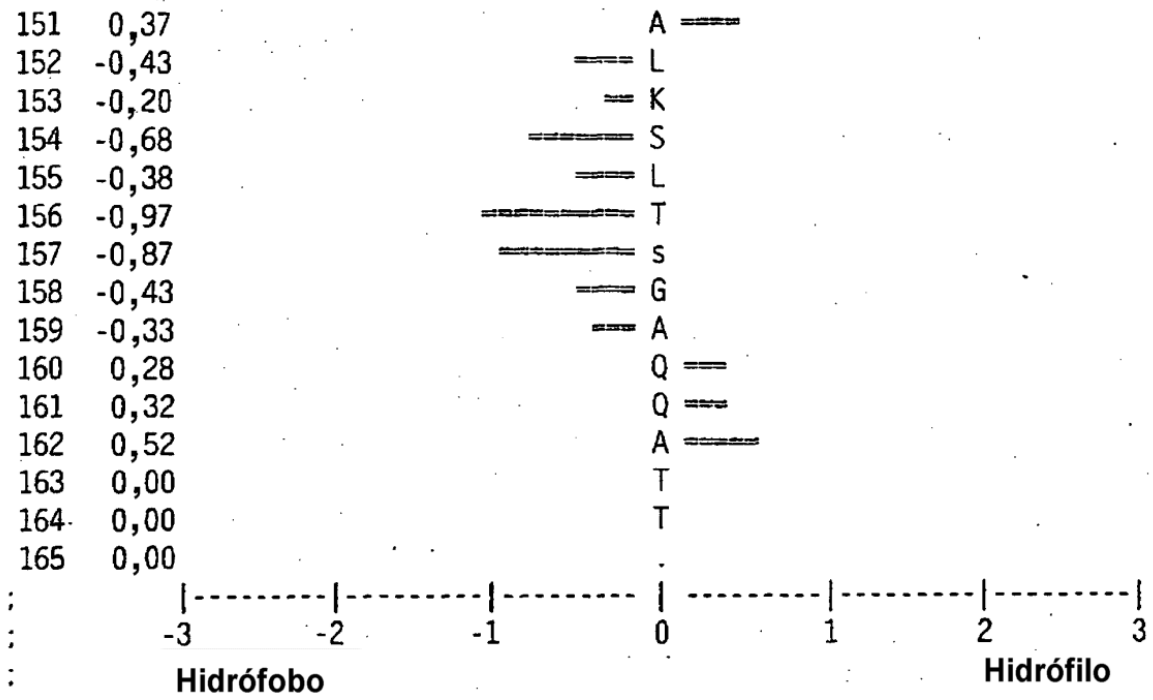


FIG. 3E