

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 650**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10153071 .5**
96 Fecha de presentación: **08.08.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **2177616**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2010**

54 Título: **Receptores de citoquinas Zcytor11 solubles**

30 Prioridad:
08.08.2000 US 223827 P
01.12.2000 US 250876 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.05.2012

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

72 Inventor/es:
Kindsvogel, Wayne R. y
Topouzis, Stavros

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

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 2 381 650 T3

DESCRIPCIÓN

Receptores de citoquinas Zcytor11 solubles.

5 Descripción

[0001] Las citoquinas son proteínas solubles que influyen en el crecimiento y la diferenciación de muchos tipos de células. Sus receptores están compuestos de una o más proteínas de membrana integrales que se unen a la citoquina con una alta afinidad y transducen este suceso de unión a la célula a través de las partes citoplasmáticas de determinadas subunidades del receptor. Los receptores de citoquinas se han agrupado en varias clases basándose en las similitudes en sus dominios extracelulares de unión al ligando. Por ejemplo, las cadenas de receptores responsables de la unión y/o la transducción del efecto de los interferones (IFN) son miembros de la familia de receptores de citoquinas de tipo II (CRF2), basado en un dominio extracelular de 200 restos característico. Las actividades in vivo demostradas de estos interferones ilustran el enorme potencial clínico de, y la necesidad de, otras citoquinas, agonistas de citoquinas y antagonistas de citoquinas.

[0002] Xie M-H y col., JBC, Vol. 275(4), 29 Junio 2000, páginas 31335-31339, describen IL-22, una nueva citoquina humana que señala a través de las proteínas relacionadas con los receptores de interferones CR2-4 y IL-22R.

[0003] El documento WO 99/07848 describe el receptor de citoquinas 11 de mamífero.

[0004] La presente memoria descriptiva describe nuevos receptores de citoquinas y composiciones y procedimientos relacionados. En particular, la presente memoria descriptiva describe una región extracelular de unión al ligando de un receptor Zcytor11 de mamífero, que alternativamente, también contiene un dominio transmembrana o tanto un dominio intracelular como un dominio de transmembrana.

[0005] Además, la presente memoria descriptiva describe nuevos receptores de citoquinas solubles que se pueden usar para antagonizar los efectos del factor inducible por linfocitos T (IL-TIF) en determinadas enfermedades humanas. En particular, la presente memoria descriptiva describe una región extracelular de unión al ligando de un receptor de Zcytor11 de mamífero, que es homodímero, heterodímero o multímero.

[0006] En un aspecto, la presente memoria descriptiva describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido receptor de citoquinas soluble que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, y en la que el polipéptido receptor de citoquinas soluble codificado por la secuencia de polinucleótido se une o antagoniza el IL-TIF (SEQ ID NO: 8). En una realización, el polinucleótido es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo homodímero de receptores.

[0007] En un segundo aspecto, la memoria descriptiva describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido receptor de citoquinas soluble que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo heterodímero o multímero de receptores. En una realización, el polinucleótido es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo heterodímero o multímero de receptores que comprende además un receptor de citoquinas de clase I o clase II soluble. En otra realización, el polinucleótido es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo heterodímero o multímero de receptores que comprende un polipéptido receptor CRF2-4 soluble (SEQ ID NO: 33) o un polipéptido receptor de IL-10 soluble (SEQ ID NO: 34), o un polipéptido receptor DIRS1 soluble (SEQ ID NO: 35). En otra realización, el polinucleótido es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo heterodímero o multímero de receptores que además comprende un polipéptido receptor CRF2-4 soluble (SEQ ID NO: 33) o un polipéptido receptor de IL-10 soluble (SEQ ID NO: 34), o un polipéptido receptor DIRS1 soluble (SEQ ID NO: 35).

[0008] En un tercer aspecto, la memoria descriptiva describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido receptor de citoquinas soluble que comprende una secuencia de restos de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, en el que polipéptido receptor de citoquinas soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo heterodímero o multímero de receptores. En otra realización, el polipéptido es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble codificado por el polinucleótido comprende además un receptor de citoquinas de clase I o clase II soluble. En otra realización, el polinucleótido es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo heterodímero o multímero de receptores que además comprende un polipéptido receptor CRF2-4 soluble (SEQ ID NO: 33) o un polipéptido receptor de IL-10 soluble (SEQ ID NO: 34), o un polipéptido receptor DIRS1 soluble (SEQ

ID NO: 35). En otra realización, el polinucleótido es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble codifica además un dominio intracelular. En otra realización, el polinucleótido es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble comprende además un marcador de afinidad.

5 **[0009]** En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente unidos: (a) un promotor de transcripción; un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido receptor de citoquinas soluble que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, y un terminador de la transcripción; y (b) un segundo promotor de la transcripción; un segundo segmento de ADN que codifica un polipéptido receptor de citoquinas de clase I o clase II soluble; y un terminador de la transcripción; y en el
10 que el primer y segundo segmentos de ADN están contenidos en un solo vector de expresión o están contenidos en vectores de expresión independientes.

[0010] En una realización, el vector de expresión descrito antes comprende además una secuencia señal secretora operativamente unida al primer y segundo segmentos de ADN. En otra realización, el vector de expresión
15 es como se ha descrito antes, en el que el segundo segmento de ADN codifica un polipéptido receptor CRF2-4 soluble (SEQ ID NO: 33) o un polipéptido receptor de IL-10 soluble (SEQ ID NO: 34), o un polipéptido receptor DIRS1 soluble (SEQ ID NO: 35).

[0011] En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una célula cultivada que comprende un vector de expresión como se ha descrito antes, en el que la célula expresa los polipéptidos codificados por los segmentos de ADN. En una realización, la célula cultivada comprende un vector de expresión como se ha descrito antes, en el que el primer y segundo segmentos de ADN están localizados en vectores de expresión independientes y son cotransfectados en la célula, y la célula expresa los polipéptidos codificados por los segmentos de ADN. En otra
20 realización, la célula cultivada comprende un vector de expresión como se ha descrito antes, en el que la célula expresa un polipéptido receptor soluble heterodímero o multímero codificado por los segmentos de ADN. En otra realización, la célula cultivada es como se ha descrito antes, en el que la célula secreta un complejo heterodímero o multímero de polipéptidos receptores de citoquinas. En otra realización, la célula cultivada es como se ha descrito antes, en el que la célula secreta un complejo heterodímero o multímero de polipéptidos receptores de citoquinas soluble que se une al IL-TIF o antagoniza la actividad del IL-TIF.
30

[0012] En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión que comprende: un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de restos de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3, y al menos otro segmento de ADN que codifica un polipéptido receptor de citoquinas de clase I o clase II soluble, en el que el primer segmento de ADN y los otros están
35 conectados en el marco; y en el que el primer segmento de ADN y los otros codifican la proteína de fusión.

[0013] En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión como se ha descrito antes, en el que al menos otro segmento de ADN codifica un polipéptido receptor CRF2-4 soluble (SEQ ID NO: 33) o un polipéptido receptor de IL-10 soluble (SEQ ID NO: 34), o un polipéptido receptor
40 DIRS1 soluble (SEQ ID NO: 35).

[0014] En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente unidos: un promotor de la transcripción; una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión como se ha descrito antes; y un terminador de la transcripción, en el que el promotor está
45 operativamente unido a la construcción de ADN, y la construcción de ADN está operativamente unida al terminador de la transcripción.

[0015] En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una célula cultivada que comprende un vector de expresión como se ha descrito antes, en el que la célula expresa un polipéptido codificado por la construcción de
50 ADN.

[0016] En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un procedimiento para producir una proteína de fusión que comprende: cultivar una célula como se ha descrito antes y aislar el polipéptido producido por la célula.

55 **[0017]** En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un polipéptido receptor de citoquinas soluble aislado que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3, y en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble se une al IL-TIF o antagoniza la actividad del IL-TIF. En una realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble forma un complejo homodímero de receptores.
60

[0018] En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble forma un complejo heterodímero o multímero

de receptores. En una realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble forma un complejo heterodímero o multímero de receptores que además comprende un receptor de citoquinas de clase I o clase II soluble.

- 5 **[0019]** En otra realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble forma un complejo heterodímero o multímero de receptores que además comprende un polipéptido receptor CRF2-4 soluble (SEQ ID NO: 33) o un polipéptido receptor de IL-10 soluble (SEQ ID NO: 34), o un polipéptido receptor DIRS1 soluble (SEQ ID NO: 35). En otra realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido forma un complejo heterodímero o multímero de receptores que además
10 comprende un polipéptido receptor CRF2-4 soluble (SEQ ID NO: 33) o un polipéptido receptor de IL-10 soluble (SEQ ID NO: 34), o un polipéptido receptor DIRS1 soluble (SEQ ID NO: 35).

- [0020]** En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un polipéptido receptor de citoquinas soluble aislado que comprende una secuencia de restos de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3, en el que el
15 polipéptido receptor de citoquinas soluble forma un complejo heterodímero o multímero de receptores. En otra realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble forma un complejo heterodímero o multímero de receptores que además comprende un receptor de citoquinas de clase I o clase II soluble. En otra realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble forma un complejo heterodímero o multímero de receptores que
20 comprende un polipéptido receptor CRF2-4 soluble (SEQ ID NO: 33) o un polipéptido receptor de IL-10 soluble (SEQ ID NO: 34), o un polipéptido receptor DIRS1 soluble (SEQ ID NO: 35). En otra realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido receptor de citoquinas soluble además comprende un marcador de afinidad, resto químico, toxina o etiqueta. En otro aspecto, la presente invención proporciona un complejo heterodímero o multímero de receptores soluble aislado que comprende subunidades de receptores solubles, en el
25 que al menos una de las subunidades de receptores solubles comprende un polipéptido receptor de citoquinas soluble que comprende una secuencia de restos de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3. En una realización, el complejo heterodímero o multímero de receptores soluble aislado descrito antes comprende además un polipéptido receptor de citoquinas de clase I o clase II soluble. En una realización, el complejo heterodímero o multímero de receptores soluble aislado descrito antes comprende además un polipéptido receptor CRF2-4 soluble
30 (SEQ ID NO: 33) o un polipéptido receptor de IL-10 soluble (SEQ ID NO: 34), o un polipéptido receptor DIRS1 soluble (SEQ ID NO: 35).

- [0021]** En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un procedimiento para producir un polipéptido receptor de citoquinas soluble que forma un complejo heterodímero o multímero que comprende: cultivar una célula como se
35 ha descrito antes y aislar los polipéptidos receptores solubles producidos por la célula.

- [0022]** En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un procedimiento para producir un anticuerpo contra el polipéptido receptor de citoquinas soluble, que comprende: inocular a un animal un polipéptido receptor de citoquinas soluble seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polipéptido que comprende un complejo
40 homodímero de receptores de citoquinas soluble; (b) un polipéptido que comprende un complejo de receptores heterodímero o multímero de receptores de citoquinas soluble que comprende un polipéptido receptor de citoquinas de clase I o clase II soluble; (c) un polipéptido que comprende un complejo de receptores heterodímero o multímero de receptores de citoquinas soluble, que comprende un polipéptido receptor CRF2-4 soluble (SEQ ID NO: 33); (d) un polipéptido que comprende un complejo de receptores heterodímero o multímero de receptores de citoquinas
45 soluble, que comprende un polipéptido receptor de IL-10 soluble (SEQ ID NO: 34); (e) un polipéptido que comprende un complejo de receptores heterodímero o multímero de receptores de citoquinas soluble, que comprende un polipéptido receptor DIRS1 soluble (SEQ ID NO: 34); y en el que el polipéptido provoca una respuesta inmunitaria en el animal para producir el anticuerpo; y aislar el anticuerpo del animal.

- 50 **[0023]** En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un anticuerpo producido por el procedimiento descrito antes, que se une específicamente a un complejo de receptores homodímero, heterodímero o multímero, que comprende un polipéptido receptor de citoquinas soluble. En una realización, el anticuerpo descrito antes es un anticuerpo monoclonal.

- 55 **[0024]** En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de receptores homodímero, heterodímero o multímero como se ha descrito antes.

- [0025]** En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un procedimiento para inhibir la proliferación inducida por IL-TIF de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas, que comprende cultivar células
60 de la médula ósea o de la sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de receptor de citoquinas soluble suficiente para reducir la proliferación de las células hematopoyéticas en la médula ósea o células de la sangre periférica, comparado con las células de la médula ósea o de la sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor de citoquinas soluble. En una realización, el procedimiento es como se ha descrito antes, en el

que las células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides. En una realización, el procedimiento es como se ha descrito antes, en el que las células linfoides son macrófagos o linfocitos T.

[0026] En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un procedimiento para reducir la inflamación inducida por IL-TIF o inducida por IL-9, que comprende administrar a un mamífero con inflamación una cantidad de una composición de receptor de citoquinas soluble suficiente para reducir la inflamación.

[0027] En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un procedimiento para suprimir una respuesta inmunitaria en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno, que comprende: (1) determinar un nivel de anticuerpo específico para el antígeno o patógeno; (2) administrar una composición que comprende un polipéptido receptor de citoquinas soluble en un vehículo farmacéutico aceptable; (3) determinar un nivel después de administración del anticuerpo específico para el antígeno o patógeno; (4) comparar el nivel de anticuerpo de la etapa (1) con el nivel de anticuerpo de la etapa (3), en el que la ausencia de un aumento o una disminución del nivel de anticuerpo es indicativo de supresión de una respuesta inmunitaria.

[0028] Estos y otros aspectos de la invención se harán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y el dibujo adjunto.

[0029] 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 surge de forma natural por mutación y puede producir polimorfismo fenotípico en las poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (no hay 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 documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

[0030] “Que corresponde a”, cuando se usa en relación a una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, indica la posición en una segunda secuencia que se alinea con la posición de referencia cuando dos secuencias se alinean de forma óptima.

[0031] 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 operativamente unido a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Dichos segmentos adicionales incluyen secuencias promotoras y terminadoras y también pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, etc. Los vectores de expresión en general derivan de un plásmido o ADN vírico, o pueden contener elementos de ambos.

[0032] El término “aislado”, cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido se ha sacado de su medio genético natural y por lo tanto carece de otras secuencias codificantes extrañas o no deseadas y está en una forma adecuada para usar en sistemas de producción de proteínas genéticamente modificadas.

[0033] “Operativamente unido”, cuando se refiere a segmentos de ADN, indica que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan de forma coordinada para los propósitos a los que se dirigen, p. ej., la transcripción se inicia en el promotor y continúa por el segmento codificante hasta el terminador.

[0034] Un “polinucleótido” es un polímero mono o bicatenario de bases desoxirribonucleótidas o ribonucleótidas leídas del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizar in vitro o preparar a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas.

[0035] El término “promotor” se usa en el presente documento para su significado reconocido en la materia para indicar una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que proporcionan la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Las secuencias promotoras se encuentran normalmente, pero no siempre, en las regiones 5' no codificantes de los genes.

[0036] El término “receptor” se usa en el presente documento para indicar una proteína asociada a la célula, o una subunidad de polipéptido de dicha proteína, que se une a una molécula bioactiva (el “ligando”) y media el efecto del ligando en la célula. La unión del ligando al receptor da como resultado un cambio conformacional en el receptor (y en algunos casos, multimerización del receptor, es decir, la asociación de subunidades de receptores idénticas o diferentes) que produce interacciones entre el o los dominios efectores y otra u otras moléculas en la célula. Estas interacciones a su vez conducen a alteraciones en el metabolismo de la célula. Los sucesos metabólicos que están conectados con las interacciones de receptor-ligando incluyen la transcripción de genes, fosforilación, desfosforilación, proliferación celular, producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de los lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. La expresión “polipéptido receptor” se usa para indicar las cadenas de polipéptidos receptores completas y partes de las mismas,

incluyendo los dominios funcionales aislados (p. ej., dominios de unión al ligando).

[0037] Una “secuencia de señal secretora” es una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un “péptido secretor”) que, como componente de un polipéptido más largo, dirige el polipéptido más largo a través de una ruta secretora de una célula en la que es sintetizado. El polipéptido más largo normalmente se escinde para separar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta en secretora.

[0038] Un “receptor soluble” es un polipéptido receptor que no está unido a una membrana celular. Los receptores solubles son, lo más habitualmente, polipéptidos receptores de unión al ligando que carecen de dominios transmembrana y citoplasmático. Los receptores solubles pueden comprender restos de aminoácidos adicionales, tales como marcadores de afinidad que proporcionan la purificación del polipéptido o proporcionan sitios para la unión del polipéptido a un sustrato, o secuencias de la región constante de inmunoglobulina. Muchos receptores de superficie celular tienen homólogos solubles naturales que se producen por proteólisis o se traducen de ARNm cortados y empalmados de forma alternativa. Se dice que los polipéptidos receptores carecen sustancialmente de segmentos de polipéptidos transmembrana e intracelulares, cuando carecen de suficientes partes de estos segmentos para proporcionar el anclaje a la membrana o la transducción de señales, respectivamente.

[0039] La expresión “variante de corte y empalme”, como se usa en el presente documento, indica formas alternativas de ARN transcrito a partir de un gen. La variación por corte y empalme surge de forma natural por el uso de sitios de corte y empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita, o de forma menos común 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 secuencias de aminoácidos alteradas. La expresión variante de corte y empalme también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante de corte y empalme de un ARNm transcrito a partir de un gen.

[0040] Los pesos moleculares y las longitudes de polímeros determinados por métodos analíticos imprecisos (p. ej., electroforesis en gel) se entenderá que son valores aproximados. Cuando dicho valor se expresa como “aproximadamente” X, se entenderá que el valor de X expuesto tiene una precisión de $\pm 10\%$.

[0041] Las subunidades de receptores de citoquinas se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio de unión al ligando y un dominio efector que está implicado típicamente en la transducción de señales. Los receptores de citoquinas multímeros incluyen homodímeros (p. ej., isoformas $\alpha\alpha$ y $\beta\beta$ del receptor de PDGF, receptor de eritropoyetina, MPL (receptor de trombopoyetina) y receptor de G-CSF), heterodímeros cuyas subunidades tienen cada una dominios de unión al ligando y efectores (p. ej., isoforma $\alpha\beta$ del receptor de PDGF), y multímeros que tienen subunidades componentes con funciones dispares (p. ej., receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 y GM-CSF). Algunas subunidades de receptores son comunes a una pluralidad de receptores. Por ejemplo, la subunidad AIC2B, que no puede unir el ligando por sí misma pero incluye un dominio de transducción de señales intracelular, es un componente de los receptores de IL-3 y GM-CSF. Muchos receptores de citoquinas se pueden poner en una de cuatro familias relacionadas basándose en sus estructuras y funciones. Los receptores hematopoyéticos de clase I, por ejemplo, se caracterizan por la presencia de un dominio que contiene restos de cisteína conservados y el patrón WSXWS. En algunos receptores hematopoyéticos están presentes dominios adicionales, que incluyen dominios de proteína quinasa; dominios de fibronectina de tipo III y dominios de inmunoglobulina, que se caracterizan por los bucles unidos por disulfuro. La estructura de los receptores de citoquinas se ha revisado en Urdal, *Ann. Reports Med. Chem.* 26: 221-228, 1991 y Cosman, *Cytokine* 5: 95-106, 1993. Se cree en general que bajo una presión selectiva para que los organismos adquieran nuevas funciones biológicas surgen nuevos miembros de las familias de receptores a partir del duplicado de los genes de receptores existentes conduciendo a la existencia de familias de múltiples genes. Por lo tanto, los miembros de las familias contienen vestigios de los genes ancestrales, y estas características se pueden explotar en el aislamiento y la identificación de miembros adicionales de las familias.

[0042] Los receptores de citoquinas de superficie celular se caracterizan además por la presencia de dominios adicionales. Estos receptores están anclados en la membrana celular por un dominio transmembrana caracterizado por una secuencia de restos de aminoácidos hidrófobos (típicamente aproximadamente 21-25 restos), que normalmente está flanqueada por restos con carga positiva (Lys o Arg). En el extremo contrario de la proteína desde el dominio extracelular y separado del mismo por el dominio transmembrana hay un dominio intracelular.

[0043] El receptor Zcytor11 es un receptor de citoquinas de clase II. Estos receptores normalmente se unen a citoquinas de haces de 4 hélices. La interleuquina-10 y los interferones tienen receptores de esta clase (p. ej., cadenas alfa y beta de interferón gamma y las cadenas alfa y beta de receptor de interferón alfa/beta). Los receptores de citoquinas de clase II se caracterizan por la presencia de uno o más módulos de receptores de citoquinas (CRM) en sus dominios extracelulares. Los CRM de los receptores de citoquinas de clase II son algo diferentes de los CRM de los receptores de citoquinas de clase I mejor conocidos. Aunque los CRM de clase II

contienen dos dominios de tipo fibronectina de tipo III, difieren en la organización.

[0044] Zcytor11, como todos los receptores de clase II conocidos, excepto la cadena alfa del receptor de interferón alfa/beta, solo tiene un CRM de clase II en su dominio extracelular. Zcytor11 es un receptor para una citoquina helicoidal de la clase interferón/IL-10. Como se ha expuesto antes, Zcytor11 es similar a la cadena α del receptor de interferón α . Uze y col. *Ce//* 60 255-264 (1996), El análisis de un clon de ADNc humano que codifica Zcytor11 (SEQ ID NO: 1) puso de manifiesto un marco de lectura abierto que codifica 574 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que comprende un dominio de unión al ligando extracelular de aproximadamente 211 restos de aminoácidos (restos 18-228 de la SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3), un dominio transmembrana de aproximadamente 23 restos de aminoácidos (restos 229-251 de la SEQ ID NO: 2), y un dominio intracelular de aproximadamente 313 restos de aminoácidos (restos 252 a 574 de la SEQ ID NO: 2). Los expertos en la materia reconocerán que estos límites de dominios son aproximados y se basan en los alineamientos con proteínas conocidas y predicciones de plegado de proteínas. Es posible la eliminación de restos de los extremos de los dominios.

[0045] Además, se ha mostrado que el receptor zcytor11 se une a un ligando llamado factor inducible de linfocitos T (TIF o IL-TIF) (véase la publicación WIPO WO 00/24758; Dumontier y col., *J. Immunol.* 164: 1814-1819, 2000; y Xie y col., *J. Biol. Chem.* pendiente de publicación M005304200). La secuencia de nucleótidos del IL-TIF humano está representada en la SEQ ID NO: 7 y la correspondiente secuencia del polipéptido se muestra en la SEQ ID NO: 8. Dentro de las realizaciones preferidas, la forma del receptor soluble de zcytor11, restos 18-228 de la SEQ ID NO: 2, (SEQ ID NO: 3), es un homodímero, heterodímero o multímero que antagoniza a los efectos del IL-TIF in vivo. Los anticuerpos contra dicho homodímero, heterodímero o multímero también sirven como antagonistas de la actividad de IL-TIF.

[0046] Se ha mostrado que el IL-TIF es inducido en presencia de IL-9, y se sospecha que está implicado en la promoción de respuestas inmunitarias de tipo Th1. La IL-9 estimula la proliferación, activación, diferenciación y/o inducción de la función inmunitaria en una variedad de formas y está implicada en el asma, mastocitosis pulmonar y otras enfermedades, y también activa las rutas STAT. Los antagonistas de la función de IL-TIF o IL-9 pueden tener un uso beneficioso contra dichas enfermedades humanas. La presente invención proporciona dichos nuevos antagonistas de IL-TIF.

[0047] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de una nueva proteína heterodímera de receptores soluble, que tiene la estructura de un receptor de citoquinas de clase II y anticuerpos contra la misma. El receptor soluble heterodímero incluye al menos una subunidad del receptor soluble zcytor11, descrita en la patente de EE.UU. de propiedad común 5.965.704. Un segundo polipéptido receptor soluble incluido en el receptor soluble heterodímero pertenece a la subfamilia de receptores que incluyen la interleuquina 10 (Liu Y y col., *J Immunol.* 152; 1821-1829, 1994 (EL-10R cDNA) (SEQ ID NO: 34)), los interferones (p. ej., cadenas alfa, beta del interferón gamma y cadenas alfa y beta del receptor del interferón alfa/beta), CRF2-4 (Nº de acceso en Genbank Z17227; SEQ ID NO: 33), y DIRS1 (publicación WIPO WO99/46379, Schering Corporation, 1999; SEQ ID NO: 35). Se mostró que el receptor zcytor11 junto con CRF2-4 y el receptor de IL-10 señala la ruta JAK-STAT en respuesta al ligando natural para el receptor zcytor11, IL-TIF (Xie y col., véase antes.). Como se describe en el presente documento, un receptor zcytor11 soluble heterodímero, como se ilustra por una realización preferida de un heterodímero de receptor zcytor11 soluble + receptor CRF2-4 (zcytor11/ CRF2-4), puede actuar como un potente antagonista del IL-TIF. Otras realizaciones incluyen el heterodímero soluble zcytor11/IL-10R, zcytor11/IL-9R, y otras subunidades de receptores de clase II, así como receptores multímeros incluyendo pero sin limitar zcytor11/CRF2-4/IL-10R y zcytor11/ CRF2-4/IL-9R.

[0048] El análisis de la distribución tisular del ARNm correspondiente al ADNc de zcytor11 mostró que el nivel de ARNm era más alto en el páncreas, seguido por niveles mucho menores en el timo, colon, hígado, piel, pulmón, riñón e intestino delgado. Por lo tanto, realizaciones particulares de la presente invención se dirigen hacia el uso de heterodímeros de zcytor11 solubles como antagonistas en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunitarias tales como la pancreatitis, diabetes de tipo I (DMDI), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, cáncer de colon e intestinal, diverticulosis, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, asma, enfermedades renales terminales, psoriasis, trasplante de órgano o médula ósea; y en las que se desee la inhibición de la inflamación, supresión inmunitaria, reducción de la proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (incluyendo linfocitos Th1 y Th2), supresión de respuesta inmunitaria contra un patógeno o antígeno o inhibición de la producción de citoquinas IL-TIF o IL-9.

[0049] Además, los anticuerpos que reconocen zcytoR11, heterodímeros y multímeros de zcytoR11/CRF2-4 solubles, descritos en el presente documento y/o los propios heterodímeros y multímeros de zcytoR11/CRF2-4 solubles, son útiles para:

1) antagonizar o bloquear la señalización a través de los receptores de IL-TIF en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como la DMDI, esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia grave, artritis reumatoide, y EII, para prevenir o inhibir la señalización en células inmunitarias (p. ej., linfocitos, monocitos, leucocitos) a través de zcytoR11 (Hughes C., y col., *J. Immunol.* 153: 3319-3325, 1994). Alternativamente, se puede
 5 usar un anticuerpo monoclonal (Mab) dirigido contra zcytor11 soluble, contra el heterodímero o multímero de zcytoR11/CRF2-4 soluble, como un antagonista para reducir las células inmunitarias no deseadas para tratar la enfermedad autoinmunitaria. El asma, la alergia y otras enfermedades atópicas se pueden tratar con un Mab contra zcytor11 soluble, heterodímeros de zcytoR11/CRF2-4 solubles, para inhibir la respuesta inmunitaria o reducir las células culpables. El bloqueo o la inhibición de la señalización a través de zcytoR11, usando los polipéptidos y
 10 anticuerpos de la presente invención, también puede beneficiar a enfermedades del páncreas, riñón, pituitaria y células neuronales. Se pueden beneficiar la DMDI, DMNDI, pancreatitis y carcinoma pancreático. ZcytoR11 puede servir como diana para la terapia del cáncer con Mab, en la que un Mab antagonizante inhibe el crecimiento del cáncer y dirige la muerte inmunomediada (Holliger P., y Hoogenboom, H.: *Nature Biotech.* 16: 1015-1016, 1998). Los Mab contra zcytoR11 soluble, y heterodímeros y multímeros de zcytoR11/CRF2-4 solubles, también pueden ser
 15 útiles para tratar nefropatías tales como glomeruloesclerosis, nefropatía membranosa, amiloidosis (que también afecta al riñón entre otros tejidos), glomerulonefritis de diferentes orígenes, enfermedades fibroproliferativas del riñón, así como disfunción renal asociada con LES, DMDI, diabetes de tipo II (DMNDI), tumores renales y otras enfermedades.

2) agonizar o iniciar la señalización a través de los receptores de IL-TIF en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como la DMDI, LES, miastenia grave, artritis reumatoide y EII. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra zcytor11 soluble, contra heterodímeros y multímeros de zcytoR11/CRF2-4 soluble, pueden señalar linfocitos u otras células inmunitarias para diferenciar, alterar la proliferación o cambiar la producción de citoquinas o proteínas de la superficie celular que mejoran la autoinmunidad. Específicamente, la modulación de una respuesta
 25 de linfocitos T auxiliares a un patrón alternativo de secreción de citoquinas, puede desviar una respuesta autoinmunitaria para mejorar la enfermedad (Smith J.A., y col., *J. Immunol.* 160: 4841-4849, 1998). Igualmente, se pueden usar anticuerpos monoclonales agonistas dirigidos contra zcytor11 soluble, heterodímeros y multímeros de zcytoR11/CRF2-4 solubles, para señalar, reducir y desviar las células inmunitarias implicadas en el asma, alergia y enfermedades atópicas. La señalización a través de zcytoR11 también puede beneficiar a enfermedades del
 30 páncreas, riñón, pituitaria y células neuronales. Se pueden beneficiar la DMDI, DMNDI, pancreatitis y carcinoma pancreático. ZcytoR11 puede servir como diana para la terapia del cáncer pancreático con Mab, en la que un Mab de señalización inhibe el crecimiento del cáncer y dirige la muerte inmunomediada (Tutt, A.L., y col., *J. Immunol.* 161: 3175-3185, 1998). Igualmente, el carcinoma de células renales se puede tratar con anticuerpos monoclonales contra receptores solubles que comprenden zcytoR11 de la presente invención.

[0050] Zcytor11 soluble, heterodímeros y multímeros de zcytoR11/CRF2-4 solubles descritos en el presente documento, se pueden usar para neutralizar/bloquear la actividad del IL-TIF en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, enfermedades atópicas, DMNDI, pancreatitis y disfunción renal como se ha descrito antes. Una forma soluble de zcytoR11 se puede usar para promover una respuesta de anticuerpos mediada por linfocitos Th y/o
 40 para promover la producción de IL-4 u otras citoquinas, por linfocitos u otras células inmunitarias.

[0051] Los receptores solubles descritos en el presente documento son útiles como antagonistas de la citoquina IL-TIF. Dichos defectos antagonistas se pueden lograr por la neutralización directa o unión del IL-TIF. Además de los usos como antagonistas, los receptores solubles de la presente invención se pueden unir al IL-TIF y
 45 actuar como proteínas transportadoras para la citoquina IL-TIF, con el fin de transportar el ligando a diferentes tejidos, órganos y células en el cuerpo. Como tales, los receptores solubles de la presente invención se pueden fusionar o acoplar a moléculas, polipéptidos o restos químicos que dirigen el complejo de receptor soluble-ligando a un sitio específico, tal como un tejido, célula del sistema inmunitario o tumor. Por lo tanto, los receptores solubles descritos en el presente documento se pueden usar para dirigir específicamente la acción del IL-TIF. Véase,
 50 Cosman, D. *Cytokine* 5: 95-106, 1993; y Fernandez-Botran, R. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 9: 497-513, 2000.

[0052] Además, los receptores solubles descritos en el presente documento se pueden usar para estabilizar el IL-TIF, para aumentar la biodisponibilidad, longevidad terapéutica y/o eficacia del ligando estabilizando al ligando frente a la degradación o eliminación, o dirigiendo al ligando a un sitio de acción en el cuerpo. Por ejemplo, el
 55 complejo de IL-6/IL-6R soluble estabiliza la IL-6 y puede señalar a través del receptor gp130. Véase, Cosman, D. véase antes., y Fernandez-Botran, R., véase antes.

[0053] Los polinucleótidos aislados pueden hibridar con regiones de tamaño similar de los nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la SEQ ID NO: 3 o una secuencia complementaria de la misma, en condiciones
 60 restrictivas. En general, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sea aproximadamente 5 °C inferior al punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica con una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (en condiciones de fuerza iónica y pH definidas) a la que 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda con la que se empareja perfectamente. Las condiciones restrictivas típicas son aquellas en las que la

concentración de sal es al menos aproximadamente 0,02 M a pH 7 y la temperatura es al menos aproximadamente 60 °C. Como se ha indicado previamente, los polinucleótidos aislados incluyen ADN y ARN. Los procedimientos para aislar el ADN y ARN son bien conocidos en la materia. En general, se prefiere aislar el ARN de tejido pancreático o prostático, aunque el ADNc también se puede preparar usando ARN de otros tejidos o aislar como ADN genómico.

- 5 El ARN total se puede preparar usando extracción con guanidina-HCl seguido de aislamiento por centrifugación en un gradiente de CsCl. (Chirgwin y col., *Biochemistry* 18: 52-94, (1979)). El poli(A) + ARN se prepara a partir del ARN total usando el procedimiento de Aviv y Leder *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408-1412, (1972). El ADN complementario (ADNc) se prepara a partir del poli(A) + ARN usando procedimientos conocidos. Después se identifican y aíslan los polinucleótidos que codifican los polipéptidos Zcytor11, por ejemplo, por hibridación o PCR.

10

[0054] Los expertos en la materia reconocerán que las secuencias descritas en la SEQ ID NO: 3 y los correspondientes nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 representan los alelos individuales del receptor Zcytor11 humano. Las variantes alélicas de estas secuencias se pueden clonar mediante hibridación con ADNc o bibliotecas genómica de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos estándar.

15

- [0055]** La memoria descriptiva describe receptores y polinucleótidos homólogos de otras especies ("ortólogos de especies"). Tienen un interés particular los receptores Zcytor11 de otras especies de mamíferos, incluyendo murina, porcina, ovina, bobina, canina, felina, equina y primates no humanos. Los ortólogos de especies del receptor Zcytor11 humano se pueden clonar usando la información y composiciones proporcionadas por la presente invención, en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, se pueden clonar un ADNc usando el ARNm obtenido de un tejido o tipo de célula que expresa el receptor. Las fuentes adecuadas de ARNm se pueden identificar por hibridación de transferencias Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias descritas en el presente documento. Después se prepara una biblioteca a partir del ARNm de un tejido o línea celular positiva. Se puede aislar entonces el ADNc que codifica el receptor por una variedad de procedimientos, tal como por hibridación con un ADNc completo o parcial de ser humano y otros primates, o con uno o más grupos de sondas degeneradas basadas en las secuencias descritas. También se puede clonar un ADNc usando la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Mullis, patente de EE.UU. n° 4.683.202), usando cebadores diseñados a partir de las secuencias descritas en el presente documento. En un procedimiento adicional, se puede usar la biblioteca de ADNc para transformar o transfectar células huésped, y se puede detectar la expresión del ADNc de interés con un anticuerpo contra el receptor. También se pueden aplicar técnicas similares al aislamiento de clones genómicos.

30

- [0056]** La memoria descriptiva describe polipéptidos receptores monómeros, homodímeros, heterodímeros y multímeros solubles aislados, que comprenden al menos una subunidad del receptor zcytor11 que es sustancialmente homóloga al polipéptido receptor de la SEQ ID NO: 3. Por "aislado" se entiende una proteína o polipéptido que se encuentra en unas condiciones distintas de su entorno natural, tal como fuera de la sangre y tejido animal. En una forma preferida, el polipéptido aislado carece sustancialmente de otros polipéptidos, en particular otros polipéptidos de origen animal. Se prefiere proporcionar los polipéptidos en una forma altamente purificada, es decir, más de 95 % puros, más preferiblemente más de 99 % puros. La expresión "sustancialmente homólogos" se usa en el presente documento para indicar polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de 50 %, preferiblemente 60 %, más preferiblemente al menos 80 % con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3. Dichos polipéptidos preferiblemente serán al menos 90 % idénticos y lo más preferiblemente 95 % o más idénticos a la SEQ ID NO: 3. El porcentaje de identidad de secuencia se determina por procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul y col., *Bull. Math. Bio.* 48: 603-616, (1986) y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919, (1992). Brevemente, se alinean dos secuencias de aminoácidos 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 "blossom 62" de Henikoff y Henikoff (véase antes) como se muestra en la tabla 2 (los aminoácidos se indican por los códigos estándar de una letra). El porcentaje de identidad se calcula entonces como:

45

$$\frac{\text{Número total de coincidencias idénticas}}{[\text{longitud de la secuencia más larga} + \text{el número de huecos introducidos en la secuencia más larga con el fin de alinear las dos secuencias}]} \times 100$$

Tabla 2

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

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

5 [0057] La identidad de las moléculas de polinucleótidos se determina por procedimientos similares usando una relación como la descrita antes.

[0058] Los expertos en la materia apreciarán que hay muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitudes "FASTA" de Pearson y Lipman es un procedimiento de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad que comparten una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento y la secuencia de aminoácidos de una variante putativa ztryp1. El algoritmo FASTA se describe en Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), y en Pearson, *Meth. Enzymol.* 183: 63 (1990).

15 [0059] Brevemente, FASTA caracteriza primero la similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia en cuestión (p. ej., SEQ ID NO: 3) y una secuencia de ensayo, que tienen la densidad de

identidades más alta (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup = 2), sin considerar las sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos conservativas. Después las 10 regiones con la mayor densidad de identidades se vuelven a puntuar comparando las 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 puntuación más alta. Si hay varias regiones con puntuaciones mayores que el valor de "corte" (calculado por una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor ktup), entonces las regiones iniciales recortadas se examinan para determinar si las regiones se pueden unir para formar un alineamiento aproximado con huecos. Finalmente, las regiones con la puntuación más alta 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 eliminaciones de aminoácidos. Los parámetros preferidos para el análisis FASTA son: ktup = 1, penalización de apertura de hueco = 10, penalización de extensión de hueco = 1, y matriz de sustitución = BLOSUM62. Estos parámetros se pueden introducir en un programa FASTA modificando la fila de la matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el apéndice 2 de Pearson, *Meth. Enzymol.*, véase antes.

[0060] FASTA también se puede usar para determinar la identidad de secuencia de moléculas de ácido nucleico usando una relación como se ha descrito antes. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor ktup puede estar en el intervalo entre 1 y 6, preferiblemente de 3 a 6, lo más preferiblemente 3, con los otros parámetros del programa FASTA ajustados por defecto.

[0061] La tabla de BLOSUM62 (Tabla 2) es una matriz de sustitución de aminoácidos obtenida a partir de aproximadamente 2.000 alineamientos múltiples locales de segmentos de secuencias de proteína, que representan las regiones altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89: 10915 (1992)). Por consiguiente, se pueden usar las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 para definir sustituciones de aminoácidos conservativas que se pueden introducir en las secuencias de aminoácidos de la presente invención. Aunque se pueden diseñar sustituciones de aminoácidos basadas solamente en propiedades químicas (como se discute más adelante), la frase "sustitución de aminoácido conservativa" se refiere preferiblemente a una sustitución representada por un valor de BLOSUM62 mayor que -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos es conservativa si la sustitución se caracteriza por un valor de BLOSUM62 de 0, 1, 2 ó 3. De acuerdo con este sistema, las sustituciones de aminoácidos conservativas preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de al menos 1 (p. ej., 1, 2 ó 3), mientras que las sustituciones de aminoácidos conservativas más preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de al menos 2 (p. ej., 2 ó 3).

[0062] Las proteínas y polipéptidos sustancialmente homólogos se caracterizan por tener una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferiblemente de naturaleza poco importante, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativas (véase la tabla 3) y otras sustituciones que no afectan significativamente el plegado o la actividad de la proteína o el polipéptido; eliminaciones pequeñas, típicamente de 1 a aproximadamente 30 aminoácidos; y extensiones pequeñas amino- o carboxilo-terminales tal como un resto de metionina amino-terminal, un péptido conector pequeño de hasta aproximadamente 20-25 restos, o una extensión pequeña que facilita la purificación (un marcador de afinidad), tal como un segmento 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, *Gene* 67: 31, 1988), u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general Ford y col., *Protein Expression and Purification* 2: 95-107, (1991). Los ADN que codifican marcadores de afinidad están disponibles en proveedores comerciales (p. ej., *Pharmacia Biotech.*, Piscataway, NJ).

Tabla 3

Sustituciones de aminoácidos conservativas

Básicos:	arginina lisina histidina
Ácidos:	ácido glutámico ácido aspártico
Polares:	glutamina asparagina
Hidrófobos:	leucina isoleucina valina
Aromáticos:	fenilalanina triptófano tirosina
Pequeños:	glicina alanina

serina
treonina
metionina

[0063] Los aminoácidos esenciales en polipéptidos receptores se pueden identificar de acuerdo con procedimientos conocidos en la materia, tales como mutagénesis de sitio específico dirigida o mutagénesis de barrido con alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244, 1081-1085, (1989); Bass y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4498-4502, (1991)). En esta última técnica, se introducen mutaciones de alanina individuales en cada resto en la molécula, y se ensaya en las moléculas mutantes resultantes la actividad biológica (por ejemplo, unión al ligando y transducción de señales) para identificar los restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción de ligando-receptor también se pueden determinar por análisis de la estructura cristalina, determinada por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje de fotoafinidad. Véase, por ejemplo, de Vos y col., *Science* 255: 306-312, (1992); Smith y col., *J. Mol. Biol.* 224: 899-904, (1992); Wlodaver y col., *FEBS Lett* 309: 59-64, (1992). Las identidades de los aminoácidos esenciales también se pueden inferir a partir del análisis de homologías con receptores relacionados.

[0064] Se pueden hacer múltiples sustituciones de aminoácidos ensayarlas usando procedimientos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, *Science* 241: 53-57, (1988) o Bowie y Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156, (1989). Brevemente, estos autores describen procedimientos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionando el polipéptido funcional y después secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones posibles en cada posición. Otros procedimientos que se pueden usar incluyen la presentación en fagos, p. ej. Lowman y col., *Biochem.* 30: 10832-10837, (1991); Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.223.409; Huse, publicación WIPO WO 92/06204) y mutagénesis dirigida de la región (Derbyshire y col., *Gene* 46: 145, (1986); Ner y col. *DNA* 7: 127, (1988)).

[0065] Los procedimientos de mutagénesis descritos antes, se pueden combinar con procedimientos de cribado de alto rendimiento para detectar la actividad de receptores mutagenizados, clonados en células huésped. Los ensayos preferidos en relación con esto, incluyen ensayos de proliferación celular y ensayos de unión al ligando basados en biosensores, que se describen más adelante. Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican receptores activos o partes de los mismos (p. ej., fragmentos de unión al ligando) se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando un equipamiento moderno. Estos procedimientos permiten la determinación rápida de la importancia de los restos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

[0066] Usando los procedimientos discutidos antes, un experto en la materia puede preparar una variedad de polipéptidos que comprenden una subunidad del receptor soluble que es sustancialmente homóloga a la SEQ ID NO: 3 o variantes alélicas de la misma, y retener las propiedades de unión al ligando del receptor natural. Dichos polipéptidos pueden incluir aminoácidos adicionales de un dominio de unión al ligando extracelular de un receptor Zcytor11, así como parte o todos los dominios transmembrana e intracelulares. Dichos polipéptidos también pueden incluir segmentos de polipéptidos adicionales como se ha descrito antes en general.

[0067] Los polipéptidos receptores descritos en el presente documento, incluyendo receptores homodímeros, heterodímeros y multímeros solubles, receptores de longitud entera, fragmentos de receptores (p. ej., fragmentos de unión al ligando) y polipéptidos de fusión, se pueden producir en células huésped genéticamente modificadas de acuerdo con técnicas convencionales. Las células huésped adecuadas son aquellos tipos de células que se pueden transformar o transfectar con ADN exógeno y cultivar e incluyen bacterias, células fúngicas y células eucariotas superiores cultivadas. Se prefieren las células eucariotas, en particular las células cultivadas de organismos pluricelulares. Se describen técnicas para la manipulación de moléculas de ADN clonadas e introducción de ADN exógeno en una variedad de células huésped en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989), y Ausubel y col., citado antes, que se incorporan en el presente documento por referencia.

[0068] En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido receptor soluble Zcytor11, o una secuencia de ADN que codifica una subunidad adicional de un receptor soluble Zcytor11 heterodímero o multímero, p. ej., polipéptido CRF2-4 o IL10R, está operativamente unida a otros elementos genéticos necesarios para su expresión, que en general incluyen un promotor y terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. Normalmente, el vector también contendrá uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la materia reconocerán que en determinados sistemas los marcadores seleccionables se pueden proporcionar en vectores separados, y la replicación del ADN exógeno se puede proporcionar por integración en el genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es un problema de diseño rutinario para el experto en la materia. Muchos de dichos elementos están descritos en la bibliografía y están disponibles en proveedores

comerciales. Se pueden cotransfectar múltiples componentes de un complejo de receptores soluble en vectores de expresión individuales o pueden estar contenidos en un solo vector de expresión. Dichas técnicas de expresión de múltiples componentes de complejos de proteínas son bien conocidas en la materia.

- 5 **[0069]** Para dirigir un polipéptido receptor Zcytor11 homodímero, heterodímero y multímero a la ruta de secreción de una célula huésped, se proporciona una secuencia de señal secretora (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o presecuencia) en el vector de expresión. La secuencia de señal secretora puede ser la del receptor, o puede derivar de otra proteína secretada (p. ej., t-PA) o puede ser de síntesis nueva. La secuencia de señal secretora se une a la secuencia de ADN de Zcytor11 en el marco de lectura correcto. Las
- 10 secuencias de señales secretoras normalmente se sitúan 5' respecto a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque algunas secuencias de señales se pueden situar en cualquier otro sitio en la secuencia de ADN de interés (véase, p. ej., Welch y col., patente de EE.UU. nº 5.037.743; Holland y col., patente de EE.UU. nº 5.143.830).
- 15 **[0070]** Las células de mamífero cultivadas son los huéspedes preferidos. Los procedimientos para introducir ADN exógeno en células huésped de mamífero incluyen la 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: 841-845, (1982)), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel y col., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987)), y
- 20 transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson y col., *Focus* 15: 73, (1993); Ciccarone y col., *Focus* 15: 80, (1993)), que se incorporan en el presente documento por referencia. La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas se describe, por ejemplo, en Levinson y col., patente de EE.UU. nº 4.713.339; Hagen y col., patente de EE.UU. nº 4.784.950; Palmiter y col., patente de EE.UU. nº 4.579.821; y Ringold, patente de EE.UU. nº 4.656.134. Las células de mamífero cultivadas adecuadas incluyen las líneas celulares COS-1 (ATCC
- 25 Nº CRL 1650), COS-7 (ATCC Nº CRL 1651), BHK (ATCC Nº CRL 1632), BHK 570 (ATCC Nº CRL 10314), 293 (ATCC Nº CRL 1573; Graham y col., *J. Gen. Virol.* 36: 59-72, 1977) y ovario de hámster chino (p. ej. CHO-K1; ATCC Nº CCL 61). En la materia se conocen líneas celulares adecuadas adicionales, y están disponibles en depósitos públicos tales como la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. En general, se prefieren los promotores de transcripción fuerte, tales como los promotores de SV-40 o citomegalovirus. Véase, p. ej., patente de
- 30 EE.UU. nº 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los de los genes de metalotioneína (patentes de EE.UU. nº 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor principal tardío de adenovirus.

- [0071]** La selección con fármacos se usa en general para seleccionar las células de mamífero cultivadas en las que se ha insertado el ADN extraño. Dichas células normalmente se denominan "transfectantes". Las células que se
- 35 han cultivado en presencia del agente selectivo y son capaces de pasar el gen de interés a su progenie se denominan "transfectantes estables". Un marcador seleccionable preferido es un gen que codifica la resistencia al antibiótico neomicina. La selección se lleva a cabo en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similar. También se pueden usar sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, procedimiento que se denomina "amplificación". La amplificación se lleva a cabo cultivando transfectantes en
- 40 presencia de un nivel bajo del agente selectivo y después aumentando la cantidad del agente selectivo para seleccionar las células que producen niveles altos de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable amplificable preferido es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato. También se pueden usar otros genes de resistencia a fármacos (p. ej., resistencia a la higromicina, resistencia a múltiples fármacos, puromicina acetiltransferasa).

- 45 **[0072]** También se pueden usar otras células eucariotas superiores como huéspedes, incluyendo células de insectos, células de plantas y células aviares. La transformación de células de insectos y producción de polipéptidos extraños en las mismas se describe en Guarino y col., patente de EE.UU. nº 5.162.222; Bang y col., patente de EE.UU. nº 4.775.624; y publicación WIPO WO 94/06463, que se incorporan en el presente documento por
- 50 referencia. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como vector para expresar genes en células de plantas se ha revisado en Sinkar y col., *J. Biosci.* (Bangalore) 11: 47-58, (1987).

- [0073]** También se pueden usar células fúngicas, incluyendo células de levaduras, y en particular células del género *Saccharomyces*, en la presente invención, tal como para producir fusiones de polipéptidos o fragmentos de
- 55 receptores. Los procedimientos para transformar células de levaduras con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes de las mismas se describe, por ejemplo, en Kawasaki, patente de EE.UU. nº 4.599.311; Kawasaki y col., patente de EE.UU. nº 4.931.373; Brake, patente de EE.UU. nº 4.870.008; Welch y col., patente de EE.UU. nº 5.037.743; y Murray y col., patente de EE.UU. nº 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por el fenotipo determinado por el marcador seleccionable, normalmente la resistencia a un fármaco o la capacidad para
- 60 crecer en ausencia de un nutriente particular (p. ej., leucina). Un sistema vector preferido para usar en levaduras es el sistema vector POT1 descrito por Kawasaki y col. (patente de EE.UU. nº 4.931.373), que permite seleccionar las células transformadas por crecimiento en medio que contiene glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para usar en levaduras incluyen los de los genes de enzimas glicolíticas (véase, p. ej., Kawasaki, patente de EE.UU.

nº 4.599.311; Kingsman y col., patente de EE.UU. nº 4.615.974; y Bitter, patente de EE.UU. nº 4.977.092) y genes de la alcohol deshidrogenasa. Véase también las patentes de EE.UU. nº 4.990.446; 5.063.154; 5.139.936 y 4.661.454. Se conocen en la materia sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*. Véase, por ejemplo, Gleeson y col., *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459-3465, (1986) y Cregg, patente de EE.UU. nº 4.882.279. Se pueden usar células de *Aspergillus* de acuerdo con los procedimientos de McKnight y col., patente de EE.UU. nº 4.935.349. Se describen procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum*, en Sumino y col., patente de EE.UU. nº 5.162.228. Se describen procedimientos para transformar *Neurospora* en Lambowitz, patente de EE.UU. nº 4.486.533.

[0074] 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. Se conocen en la materia una variedad de medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos, y en general 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, según sea necesario. El medio de crecimiento en general seleccionará las células que contienen el ADN exógeno añadido, por ejemplo, mediante selección con fármaco o deficiencia de un nutriente esencial que es complementado por el marcador seleccionable que lleva el vector de expresión o cotransfectado en la célula huésped.

[0075] En otro aspecto, se produce un nuevo receptor soluble como se describe en el presente documento mediante una célula cultivada, y la célula se usa para cribar los ligandos para el receptor, incluyendo el ligando natural, IL-TIF, así como agonistas y antagonistas del ligando natural. Para resumir este procedimiento, un ADNc o gen que codifica el receptor se combina con otros elementos genéticos necesarios para su expresión (p. ej., un promotor de la transcripción), y el vector de expresión resultante se inserta en una célula huésped. Las células que expresan el ADN y producen el receptor funcional se seleccionan y se usan en una variedad de sistemas de cribado. Cada componente del complejo de receptores homodímero, heterodímero y multímero puede ser expresado en la misma célula.

[0076] Las células de mamífero adecuadas para usar en la expresión de receptores Zcytor11 y transducción de una señal mediada por el receptor, incluyen células que expresan otras subunidades de receptor que pueden formar un complejo funcional con Zcytor11. Estas subunidades pueden incluir las de la familia de receptores de interferones o de otros receptores de citoquinas de clase I o clase II, p. ej., CRF2-4, IL-10R, y IL-9R. También se prefiere usar una célula de la misma especie que el receptor que se va a expresar. En una realización preferida, la célula depende del factor de crecimiento hematopoyético suministrado de forma exógena para su proliferación. Las líneas celulares preferidas de este tipo son la línea celular TF-1 humana (ATCC nº CRL-2003) y la línea celular AML-193 (ATCC nº CRL-9589), que son líneas celulares leucémicas humanas dependientes del GM-CSF y BaF3 (Palacios y Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, (1985)) que es una línea de pre-linfocitos B murina dependiente de IL-3. Otras líneas celulares incluyen células BHK, COS-1 y CHO.

[0077] Las células huésped adecuadas se pueden diseñar para producir las subunidades de receptores necesarias u otros componentes celulares necesarios para la respuesta celular deseada. Este procedimiento es ventajoso porque las líneas celulares se pueden diseñar para expresar subunidades de receptores de cualquier especie, superando así las potenciales limitaciones que surgen de la especificidad de especies. Las especies ortólogas del ADNc del receptor humano se pueden clonar y usar en las líneas celulares de la misma especie, tales como un ADNc de ratón en la línea celular BaF3. Las líneas celulares que dependen de un factor de crecimiento hematopoyético, tal como GM-CSF o IL-3, se pueden diseñar así para convertirse en dependientes de IL-TIF.

[0078] Las células que expresan el receptor funcional se usan en ensayos de cribado. En la técnica se conocen una variedad de ensayos adecuados. Estos ensayos se basan en la detección de una respuesta biológica en una célula diana. Uno de dichos ensayos es un ensayo de proliferación celular. Las células se cultivan en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo y se detecta la proliferación, por ejemplo, midiendo la incorporación de timidina tritiada o por un ensayo colorimétrico basado en la rotura metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) (Mosman, *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63, (1983)). Un formato de ensayo alternativo usa células que se diseñan además para expresar un gen indicador. El gen indicador está unido a un elemento promotor que es sensible a la ruta ligada al receptor, y el ensayo detecta la activación de la transcripción del gen indicador. Un elemento promotor preferido en relación con esto, es un elemento de respuesta al suero, o SRE. Véase, p. ej., Shaw y col., *Cell* 56: 563-572, (1989). Uno de dichos genes indicadores preferido es un gen de luciferasa (de Wet y col., *Mol. Cell. Biol.* 7: 725, (1987)). La expresión del gen de luciferasa se detecta por luminiscencia usando procedimientos conocidos en la materia (p. ej., Baumgartner y col., *J. Biol. Chem.* 269: 29094-29101, (1994); Schenbom y Goiffin, *Promega_Notes* 41: 11, 1993). Están disponibles kits de ensayo de la actividad de luciferasa, por ejemplo, en Promega Corp., Madison, WI. Las líneas celulares diana de este tipo se pueden usar para cribar bibliotecas de compuestos químicos, medios de cultivo condicionados de células, caldos fúngicos, muestras de

suelo, muestras de agua, y similares. Por ejemplo, se puede ensayar en un banco de muestras de medios condicionados de células una célula diana para identificar células que producen el ligando. Las células positivas después se usan para producir una biblioteca de ADNc en un vector de expresión de mamífero, que se divide en grupos, se transfecta en células huésped y se expresa. Las muestras de medio de las células transfectadas después se ensayan con la posterior división de grupos, retransfección, subcultivo, y reensayo de las células positivas para aislar un ADNc clonado que codifica el ligando.

[0079] Un ligando natural para el receptor Zcytor11 también se puede identificar mediante mutagénesis de una línea celular que expresa el receptor de longitud completa y cultivo en condiciones que seleccionan el crecimiento o autocrino. Véase la publicación WIPO WO 95/21930. En un procedimiento típico, se lleva a cabo la mutagénesis de células BaF3 dependientes de IL-3 que expresan Zcytor11 y las subunidades adicionales necesarias, tal como con 2-etilmetanosulfonato (EMS). Después, se deja que las células se recuperen en presencia de IL-3, y después se transfieren a un medio de cultivo que carece de IL-3 e IL-4. Las células que sobreviven se criban de acuerdo con la producción de un IL-TIF, tal como mediante la adición de receptor soluble al medio de cultivo o mediante el ensayo de medios condicionados en las células BaF3 naturales y células BaF3 que expresan el receptor. Usando este procedimiento, se pueden identificar las células y tejidos que expresan IL-TIF.

[0080] Un procedimiento de cribado adicional proporcionado por la presente invención, incluye el uso de polipéptidos receptores híbridos. Estos polipéptidos híbridos son de una de dos clases. En la primera clase, el dominio intracelular de Zcytor11 que comprende aproximadamente los restos de 252 a 574 de la SEQ ID NO: 2, se une al dominio de unión al ligando de un segundo receptor. Se prefiere que el segundo receptor sea un receptor de citoquinas hematopoyético, tal como el receptor mpl (Souyri y col., Cell 63: 1137-1147, (1990)). El receptor híbrido puede comprender además un dominio transmembrana, que se puede obtener de cualquiera de los receptores. Después se inserta una construcción de ADN que codifica el receptor híbrido en una célula huésped. Las células que expresan el receptor híbrido se cultivan en presencia de un ligando para la unión al dominio y se ensaya la respuesta. Este sistema proporciona un medio para analizar la transducción de señales mediada por Zcytor11 usándose ligandos fácilmente disponibles. Este sistema también se puede usar para determinar si líneas celulares particulares son capaces de responder a señales transducidas por heterodímeros y multímeros de Zcytor11 de la presente invención. Una segunda clase de polipéptidos receptores híbridos comprende el dominio extracelular (unión al ligando) de Zcytor11 (aproximadamente los restos 18 a 228 de las SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3) con un dominio intracelular de un segundo receptor, preferiblemente un receptor de citoquinas hematopoyético, y un dominio transmembrana. Los heterodímeros y multímeros de Zcytor11 híbridos de los receptores de la presente invención de esta segunda clase, son expresados en células que se sabe que son capaces de responder a señales transducidas por el segundo receptor. Juntos, estas dos clases de receptores híbridos permiten la identificación de un tipo de célula sensible para el desarrollo de un ensayo para detectar un IL-TIF. Además, dichas células se pueden usar en presencia del IL-TIF para ensayar los antagonistas del receptor solubles de la presente invención en un ensayo de tipo competitivo. En dicho ensayo, una disminución de la proliferación o de la actividad de transducción de señales de IL-TIF en presencia de un receptor soluble de la presente invención demuestra la actividad antagonista. Además los ensayos de unión de receptor soluble-IL-TIF se puede usar para evaluar si un receptor soluble antagoniza la actividad de IL-TIF.

[0081] Las células que se encuentra que expresan el ligando, después se usan para preparar una biblioteca de ADNc a partir de la cual se puede aislar un ADNc que codifica el ligando como se ha descrito antes. Por lo tanto, la presente invención proporciona además de nuevos polipéptidos receptores, procedimientos para clonar ligandos polipeptídicos para los receptores.

[0082] La especificidad de tejido de la expresión de Zcytor11 sugiere una función en el desarrollo del páncreas, intestino delgado, colon y el timo. En vista de la especificidad de tejido observada para este receptor, los agonistas (incluyendo el ligando natural) y antagonistas tienen un enorme potencial en las aplicaciones tanto in vitro como in vivo. Los compuestos identificados como agonistas del receptor son útiles para estimular la proliferación y el desarrollo de células diana in vitro e in vivo. Por ejemplo, los compuestos agonistas son útiles como componentes de medios de cultivo celulares definidos, y se pueden usar solos o en combinación con otras citoquinas y hormonas para sustituir el suero que normalmente se usa en el cultivo celular. Los agonistas o antagonistas pueden ser útiles en la regulación específica del crecimiento y/o desarrollo de células pancreáticas, gastrointestinales o del timo en cultivo. Estos compuestos son útiles como reactivos de investigación para la caracterización de sitios de interacción de ligando-receptor. Los agonistas o antagonistas del receptor pueden encontrar aplicación in vivo en el tratamiento de enfermedades pancreáticas, gastrointestinales o del timo.

[0083] Los agonistas o antagonistas de Zcytor11 pueden incluir familias pequeñas de péptidos. Estos péptidos se pueden identificar usando condiciones de selección de afinidad que son conocidas en la materia, a partir de una población de candidatos presente en una biblioteca de péptidos. Las bibliotecas de péptidos incluyen bibliotecas combinatorias químicamente sintetizadas y presentadas sobre soporte sólido (Lam y col., *Nature* 354: 82-84 (1991)) o en disolución (Houghten y col., *BioTechniques* 13: 412-421, (1992)), expresadas entonces unidas a ADN

plasmídico (Cull y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869 (1992)) o expresadas y posteriormente presentadas en las superficies de virus o células (Boder y Wittrup, *Nature Biotechnology* 15: 553-557(1997); Cwirla y col. *Science* 276: 1696-1699 (1997)).

5 **[0084]** Zcytor11 homodímero, heterodímero y multímero también se puede usar en sistemas de diagnóstico para detectar los niveles en la circulación del ligando IL-TIF. En una realización relacionada, se pueden usar anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente a receptores solubles Zcytor11 de la presente invención, para detectar polipéptidos receptores en la circulación. Los niveles elevados o reducidos de ligando o polipéptidos receptores pueden ser indicativos de afecciones patológicas, incluyendo el cáncer.

10

[0085] Los polipéptidos receptores Zcytor11 homodímeros, heterodímeros y multímeros se pueden preparar expresando un ADN truncado que codifica el dominio extracelular, por ejemplo, un polipéptido que contiene la SEQ ID NO: 3 o la región correspondiente de un receptor no humano. Se prefiere que los polipéptidos del dominio extracelular se preparen de una forma que carezca sustancialmente de segmentos de polipéptidos transmembrana e intracelular. Por ejemplo, el extremo C del polipéptido receptor puede estar en el resto 228 de la SEQ ID NO: 2 o la correspondiente región de una variante alélica o un receptor no humano. Para dirigir la exportación del dominio del receptor desde la célula huésped, el ADN del receptor se une a un segundo segmento de ADN que codifica un péptido secretor, tal como un péptido secretor de t-PA. Para facilitar la purificación del dominio de receptor secretado, se puede fusionar al polipéptido receptor una extensión C-terminal, tal como un marcador de polihistidina, sustancia P, péptido FlagTM (Hopp y col., *Biotechnology* 6: 1204-1210, (1988); disponible en Eastman Kodak Co., New Haven, CT) u otro polipéptido o proteína para el que esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico. Además, los dominios de unión de citoquinas extracelulares de la subunidad que no son de Zcytor11 heterodímeros y multímeros también se preparan como antes.

25 **[0086]** En un procedimiento alternativo, un dominio extracelular del receptor de Zcytor11 u otro componente de receptor de citoquinas de clase I o II, se pueden expresar o como una fusión con regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina, típicamente un fragmento F_c, que contiene dos dominios de región constante y una región bisagra pero que carece de la región variable (véase, Sledziewski, AZ y col., patentes de EE.UU. n° 6.018.026 y 5.750.375). El Zcytor11 soluble o los heterodímeros y multímeros de Zcytor11/CRF2-4 solubles de la presente invención incluyen dichas fusiones. Dichas fusiones, típicamente son secretadas como moléculas multiméricas en las que las partes de Fc están unidas entre sí por disulfuro y dos polipéptidos de receptores están dispuestos muy cerca uno de otro. Las fusiones de este tipo se pueden usar para la purificación por afinidad del ligando cognado de la disolución, como una herramienta de ensayo in vitro, para bloquear señales in vitro mediante valoración específica del ligando, y como agonistas in vivo administrándolos por vía parenteral para la unión al ligando en la circulación y eliminación de la circulación. Para purificar el ligando, se añade una quimera de Zcytor11-Ig a una muestra que contiene el ligando (p. ej., medios de cultivo condicionados de células o extractos tisulares) en condiciones que facilitan la unión de receptor-ligando (típicamente temperatura, pH y fuerza iónica cercanos a los fisiológicos). El complejo de quimera-ligando después se separa mediante la mezcla usando proteína A, que está inmovilizada en un soporte sólido (p. ej., perlas de resina insolubles). Después se eluye el ligando usando técnicas químicas convencionales, tal como con una sal o gradiente de pH. De forma alternativa, la propia quimera se puede unir a un soporte sólido, llegando a cabo la unión y elución como antes. Las quimeras se pueden usar in vivo para regular las funciones gastrointestinales, pancreáticas o del timo. Las quimeras con una alta afinidad de unión se administran por vía parenteral (p. ej., por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa). Las moléculas de la circulación se unen al ligando y son eliminadas de la circulación por procesos fisiológicos normales. Para usar en ensayos, las quimeras se unen a un soporte y por la región F_c y se usan en un formato ELISA.

[0087] La presente memoria descriptiva describe una variedad de otras fusiones de polipéptidos y proteínas multímeras relacionadas que comprenden una o más fusiones de polipéptidos. Por ejemplo, se puede preparar un receptor Zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, como una fusión a una proteína que dimeriza como se describe en las patentes de EE.UU. 5.155.027 y 5.567.584. Las proteínas que dimerizan preferidas en relación con esto incluyen dominios de la región constante de inmunoglobulina, p. ej., IgGγ1, y la cadena ligera κ humana. El inmunoglobulina-receptor zcytor11 soluble o el polipéptido heterodímero inmunoglobulina-zcytor11 soluble, tal como las fusiones de inmunoglobulina-zcytor11-CRF-24 solubles se pueden expresar en células genéticamente modificadas para producir una variedad de análogos del receptor zcytor11 multímero. Se pueden fusionar dominios auxiliares a un receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, para dirigirlos a células, tejidos o macromoléculas específicos (por ejemplo, a colágeno o células que expresan el IL-TIF). Un polipéptido zcytor11 se puede fusionar con dos o más restos, tal como un marcador de afinidad para la purificación y un dominio para dirigirlo. Las fusiones de polipéptidos también pueden comprender uno o más sitios de escisión, en particular entre dominios. Véase, Tuan y col., *Connective Tissue Research* 34: 1-9, 1996.

[0088] Un sistema de ensayo preferido que usa un fragmento de receptor de unión al ligando, usa un instrumento biosensor disponible en el comercio (BIAcoreTM, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ), en el que el

fragmento de receptor se inmoviliza sobre la superficie de un chip de receptor. El uso de este instrumento se describe en Karlsson, *J. Immunol. Methods* 145: 229-240, (1991) y Cunningham y Wells, *J. Mol. Biol.* 234: 554-563, (1993). Se une un fragmento de receptor covalentemente, usando química de aminas o sulfidrilos, a fibras de dextrano que están unidas a una película de oro en la celda de flujo. Se pasa una muestra de ensayo a través de
5 celda. Si hay ligando presente en la muestra, se unirá al polipéptido del receptor inmovilizado, produciendo un cambio en el índice de refracción del medio, lo cual se detecta como un cambio en la resonancia de plasmones de superficie de la película de oro. Este sistema permite determinar las constantes de disociación y asociación, a partir de las cuales se puede calcular la afinidad de unión y evaluar la estequiometría de unión.

10 **[0089]** Los polipéptidos receptores de unión al ligando también se pueden usar en otros sistemas de ensayo conocidos en la materia. Dichos sistemas incluyen el análisis de Scatchard para determinar la afinidad de unión. Véase, Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-672, (1949) y ensayos calorimétricos (Cunningham y col., *Science* 253: 545-548, (1991); Cunningham y col., *Science* 254: 821-825, (1991)).

15 **[0090]** Un polipéptido de unión al ligando del receptor también se puede usar para la purificación del ligando IL-TIF. El polipéptido receptor se inmoviliza sobre 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. Los procedimientos para la unión de polipéptidos a soportes sólidos se conocen en la materia, e incluyen la química de aminas, activación por bromuro de cianógeno, activación por N-hidroxisuccinimida, activación por epóxido, activación por sulfhidrilo y activación por hidrazida. Los medios
20 resultantes en general se configurarán en forma de una columna, y los fluidos que contienen el ligando se pasan a través de la columna una o más veces, para permitir que el ligando se una al polipéptido receptor. Después el ligando se eluye usando cambios en la concentración salina o pH para alterar la unión de ligando-receptor.

25 **[0091]** Además, el receptor zcytor11 soluble o polipéptidos receptores heterodímeros de zcytor11 soluble, tales como zcytor11/CRF2-4 soluble, se pueden usar como un "sumidero de ligando", es decir, antagonista para unir el ligando in vivo o in vitro en aplicaciones terapéuticas u otras aplicaciones en las que no se desea la presencia del ligando. Por ejemplo, en los cánceres que expresan grandes cantidades de IL-TIF bioactivo, se pueden usar el receptor zcytor11 soluble o polipéptidos receptores heterodímeros y multímeros de zcytor11 solubles, tales como
30 zcytor11/CRK-4 soluble, como un antagonista directo del ligando in vivo, y puede ayudar a reducir el avance y los síntomas asociados con la enfermedad, y se puede usar junto con otras terapias (por ejemplo, quimioterapia) para potenciar el efecto de la terapia en la reducción del avance y los síntomas, y prevenir la recaída. Además, el receptor zcytor11 soluble o polipéptidos receptores heterodímeros de zcytor11 solubles, tales como zcytor11/CRF2-4 soluble, se pueden usar para ralentizar el avance de cánceres que expresan en exceso los receptores zcytor11, por unión
35 del ligando in vivo que de otra forma potenciaría la proliferación de estos cánceres.

[0092] Además, el receptor zcytor11 soluble o polipéptidos receptores heterodímeros de zcytor11 solubles, tales como zcytor11/CRF2-4 soluble, se pueden usar en aplicaciones in vivo o de diagnóstico para detectar los cánceres que expresan IL-TIF in vivo o en muestras de tejidos. Por ejemplo, el receptor zcytor11 soluble o
40 polipéptidos receptores heterodímeros de zcytor11 solubles, tales como zcytor11/CRF2-4 soluble, se pueden conjugar con un radiomarcador o un marcador fluorescente como se describe en el presente documento, y usar para detectar la presencia del IL-TIF en una muestra de tejido, usando un ensayo de unión de tipo ligando-receptor in vitro, o ensayo de generación de imágenes fluorescentes. Además, se puede administrar in vivo un receptor zcytor11 soluble o polipéptidos receptores heterodímeros de zcytor11 solubles, tales como zcytor11/CRF2-4 soluble,
45 radiomarcado, para detectar los tumores sólidos que expresan ligando mediante un procedimiento generación de radioimágenes conocido en la materia.

[0093] El receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, se pueden usar también para preparar anticuerpos que se unen a epítopos, péptidos o polipéptidos
50 contenidos en el antígeno. El polipéptido zcytor11 o un fragmento del mismo sirve como un antígeno (inmunógeno) para inocular a un animal y provocar una respuesta inmunitaria. Un experto en la materia reconocerá que los antígenos o epítopos inmunógenos pueden consistir en tramos de aminoácidos de un polipéptido más largo, de aproximadamente 10 aminoácidos y hasta aproximadamente la longitud entera del polipéptido o más largo dependiendo del polipéptido. Los antígenos adecuados incluyen el polipéptido zcytor11 codificado por la SEQ ID
55 NO: 3 o un fragmento de la misma de aminoácidos contiguos de 9 a 211 aminoácidos. Los péptidos preferidos para usar como antígenos son el dominio de unión a citoquinas, descrito en el presente documento, y péptidos hidrófilos de zcytor11 tales como los previstos por el experto en la materia a partir de una gráfica de hidrofobicidad, determinada por ejemplo, o partir del perfil de hidrofilia de Hopp/Woods basado en una ventana móvil de 6 restos, con restos G, S y T escondidos y restos H, Y y W expuestos ignorados, o a partir de la gráfica de Jameson-Wolf de
60 la SEQ ID NO: 3 usando un programa DNA*STAR. Además, los patrones conservados y las regiones variables entre los patrones conservados del receptor soluble zcytor11 son antígenos adecuados. Los antígenos adecuados también incluyen los polipéptidos zcytor11 descritos antes en combinación con otro dominio extracelular de citoquinas de clase I o II, como los que forman los polipéptidos heterodímeros de zcytor11 solubles, tales como

zcytor11/CRF2-4 soluble. Además, se pueden usar las correspondientes regiones del polipéptido receptor zcytor11 soluble de ratón (SEQ ID NO: 3) para generar anticuerpos contra el receptor zcytor11 soluble de ratón. Además, los anticuerpos generados de esta respuesta inmunitaria, se pueden aislar y purificar como se describe en el presente documento. Los procedimientos para preparar y aislar anticuerpos policlonales y monoclonales son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Cooligan, y col. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Hurrell, J. G. R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982.

- 10 **[0094]** Como será evidente para el experto en la materia, se pueden generar anticuerpos policlonales por la inoculación en una variedad de animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas, de un receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, o un fragmento del mismo. La inmunogenicidad de un polipéptido zcytor11 se puede aumentar 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 las fusiones de zcytor11 o una parte del mismo con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a la maltosa. El polipéptido inmunógeno puede ser una molécula de longitud completa o una parte de la misma. Si la parte del polipéptido es de "tipo hapteno", dicha parte se puede unir o conectar ventajosamente a un transportador macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o toxoide tetánico) para la inmunización.

- [0095]** Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión al antígeno, tales como los fragmentos proteolíticos F(ab')₂ y Fab. También están incluidos los anticuerpos o fragmentos intactos genéticamente modificados, tales como los anticuerpos quiméricos, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios y similares, así como péptidos y polipéptidos de unión al antígeno sintéticos. Los anticuerpos no humanos se pueden humanizar mediante injerto de CDR no humanas en las regiones de armazón y constante, o incorporando los dominios variables no humanos enteros (opcionalmente "cubriéndolos" con una superficie de tipo humano por sustitución de los restos expuestos, en el que el resultado es un anticuerpo "revestido"). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden retener restos no humanos en los dominios de la región de armazón variable humana para potenciar las características de unión adecuadas. Mediante la humanización de los anticuerpos, se puede aumentar la semivida biológica, y se reduce el potencial de reacciones inmunitarias adversas tras la administración a seres humanos.

- 35 **[0096]** Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si: 1) presentan un nivel umbral de actividad de unión, y 2) no tienen reacciones cruzadas significativas con moléculas de polipéptidos relacionadas. Se determina un nivel umbral de unión si los anticuerpos dirigidos contra el receptor zcytor11 soluble o dirigidos contra el polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como dirigidos contra zcytor11/CRF2-4 soluble, en el presente documento, se unen a un polipéptido péptido o epítipo del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, con una afinidad al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión para controlar el polipéptido (receptor zcytor11 no soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble). Se prefiere que los anticuerpos presenten una afinidad de unión (K_a) de 10^6 M⁻¹ o mayor, preferiblemente 10^7 M⁻¹ o mayor, más preferiblemente 10^8 M⁻¹ o mayor y lo más preferiblemente 10^9 M⁻¹ o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo la puede determinar fácilmente el experto en la materia, por ejemplo, por el análisis de Scatchard (Scatchard, G., *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949).

- [0097]** Si los anticuerpos dirigidos contra el receptor zcytor11 soluble o dirigidos contra el polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como dirigidos contra zcytor11/CRF2-4 soluble, no tienen reacciones cruzadas significativas con moléculas de polipéptidos relacionadas se muestra, por ejemplo, por la detección por el anticuerpo del polipéptido del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, pero no polipéptidos relacionados conocidos usando un análisis de transferencia Western (Ausubel y col., véase antes.). Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos son los descritos en la técnica anterior, tal como ortólogos y parólogos conocidos, y miembros conocidos similares de una familia de proteínas. El cribado también se puede hacer usando el receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, no humano, y polipéptidos mutantes del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble. Además, los anticuerpos se puede "cribar frente a" polipéptidos relacionados conocidos, para aislar una población que se une específicamente a los polipéptidos del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble. Por ejemplo, los anticuerpos producidos contra el receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, se adsorben en polipéptidos relacionados adheridos a la matriz insoluble; los anticuerpos específicos para el receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, fluirán a través de la matriz en las condiciones de tamponamiento adecuadas. El cribado permite aislar los anticuerpos policlonales y monoclonales que no tienen reacciones cruzadas

con los polipéptidos estrechamente relacionados conocidos (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, y col. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995). El cribado y aislamiento de anticuerpos específicos es bien conocido en la materia. 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. La unión específica de anticuerpos dirigidos contra el receptor zcytor11 soluble o dirigidos contra el polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como dirigidos contra zcytor11/CRF2-4 soluble, se pueden detectar por una serie de procedimientos de la materia y descritos a continuación.

10

[0098] Se puede usar una variedad de ensayos conocidos por el experto en la materia para detectar anticuerpos que se unen a proteínas o polipéptidos del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble. Los ensayos ilustrativos se describen con detalle en "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow and Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de dichos ensayos incluyen: la inmunoelectroforesis simultánea, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), inmunotransferencia o ensayo de transferencia Western, ensayo de inhibición o competición, y ensayo en sándwich. Además, se pueden cribar los anticuerpos que se unen a proteínas o polipéptidos del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, naturales frente a mutantes.

20

[0099] Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos útiles en el presente documento incluyen la exposición in vitro de linfocitos a proteína o péptido del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, y selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, por el uso de proteína o péptido del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, inmovilizado o marcado). Los genes que codifican polipéptidos que tienen potenciales dominios de unión para el polipéptido del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, se pueden obtener mediante el cribado aleatorio de bibliotecas de péptidos presentadas en fagos (presentación en fagos) o en bacterias, tales como *E. coli*. Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden obtener de una serie de formas, tal como por mutagénesis aleatoria y síntesis de polinucleótidos aleatoria. Estas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias se pueden usar para cribar los péptidos que interaccionan con una diana conocida que puede ser una proteína o polipéptido, tal como un ligando o receptor, una macromolécula biológica o sintética, o sustancias orgánica o inorgánica. Se conocen en la materia técnicas para crear y cribar dichas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias (Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.223.409; Ladner y col., patente de EE.UU. n° 4.946.778; Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.403.484 y Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.571.698) y las bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias y kits para el cribado de dichas bibliotecas están disponibles en el comercio, por ejemplo en Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Las bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias se pueden cribar usando secuencias del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, descritas en el presente documento, para identificar proteínas que se unen al receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble. Estos "polipéptidos de unión" que interaccionan con los polipéptidos del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, se pueden usar para marcar células; para aislar polipéptidos homólogos por purificación por afinidad; se pueden conjugar directa o indirectamente a fármacos, radionucleidos y similares. Estos polipéptidos de unión también se pueden usar en procedimientos analíticos tal como para cribar bibliotecas de expresión y neutralizar la actividad, p. ej., para bloquear la interacción entre el ligando IL-TIF y el receptor, o unión vírica a un receptor. Los polipéptidos de unión también se pueden usar para ensayos de diagnóstico para determinar los niveles en la circulación de polipéptidos del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble; para detectar o cuantificar los polipéptidos del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, como marcador de patología o enfermedad subyacente. Estos polipéptidos de unión también pueden actuar como "antagonistas" del receptor zcytor11 o polipéptido heterodímero de zcytor11, tal como zcytor11/CRF2-4, para bloquear la unión del receptor zcytor11 o polipéptido heterodímero de zcytor11, tal como zcytor11/CRF2-4, y la transducción de señales in vitro e in vivo. Otra vez, estos polipéptidos de unión dirigidos contra el receptor zcytor11 soluble o contra el polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como contra zcytor11/CRF2-4 soluble, serían útiles para inhibir la actividad de IL-TIF, así como la actividad de receptor o de unión a proteína. Los anticuerpos producidos contra las combinaciones heterodímeras o multímeras de la presente invención son realizaciones preferidas, ya que pueden actuar de forma más específica contra el IL-TIF, o de forma más potente que los anticuerpos producidos contra solo una subunidad. Además, la actividad antagonista y de unión de los anticuerpos de la presente invención se pueden ensayar en los ensayos de proliferación de IL-TIF y otros ensayos biológicos descritos en el presente documento.

60

[0100] Los anticuerpos contra el receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal

como zcytor11/CRF2-4 soluble, se pueden usar para marcar células que expresan el receptor zcytor11 o polipéptidos heterodímeros de zcytor11, tales como zcytor11/CRF2-4; para aislar el polipéptido del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, por purificación de afinidad; para ensayos de diagnóstico para determinar los niveles en la circulación de polipéptidos del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble; para detectar o cuantificar el receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, como marcador de una patología o enfermedad subyacente; en procedimientos analíticos que usan FACS; para cribar bibliotecas de expresión; para generar anticuerpos antiidiotípicos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear el receptor zcytor11 o polipéptido heterodímero de zcytor11, tal como zcytor11/CRF2-4, o la actividad de IL-TIF in vitro e in vivo. Los marcadores o etiquetas directas adecuadas incluyen radionucleidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas, y similares; los marcadores o etiquetas indirectos pueden usar biotina-avidina u otras parejas de complemento/anticomplemento como productos intermedios. Los anticuerpos del presente documento también se pueden conjugar directa o indirectamente a fármacos, toxinas, radionucleidos y similares, y usar estos conjugados para el diagnóstico in vivo o para aplicaciones terapéuticas. Además, los anticuerpos contra el receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, o fragmentos de los mismos se pueden usar in vitro para detectar el receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, desnaturalizado o no desnaturalizado, o fragmentos del mismo, en ensayos, por ejemplo, de transferencias Western u otros ensayos conocidos en la materia.

[0101] Los anticuerpos contra el receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, son útiles para marcar células que expresan los correspondientes receptores y ensayar sus niveles de expresión, para la purificación por afinidad, en ensayos de diagnóstico para determinar los niveles en la circulación de polipéptidos receptores solubles, procedimientos analíticos que usan la separación de células activadas por fluorescencia. Además, se pueden usar anticuerpos divalentes, y anticuerpos antiidiotípicos como agonistas para imitar el efecto del IL-TIF.

[0102] Los anticuerpos del presente documento también se pueden conjugar directa o indirectamente a fármacos, toxinas, radionucleidos y similares, y usar estos conjugados para el diagnóstico in vivo o para aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos o polipéptidos de unión que reconocen polipéptidos del receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, de la presente invención, para identificar o tratar tejidos u órganos que expresan una molécula anticomplementaria correspondiente (es decir, un receptor zcytor11 o receptor heterodímero de zcytor11, tal como zcytor11/CRF2-4). Más específicamente, anticuerpos dirigidos contra el receptor zcytor11 soluble o dirigidos contra el polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como dirigido contra zcytor11/CRF2-4 soluble, o fragmentos o porciones bioactivos del mismo, se pueden acoplar a moléculas detectables o citotóxicas y administrar a un mamífero que tenga células, tejidos u órganos que expresan moléculas receptoras del receptor zcytor11 soluble o receptor heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble.

[0103] Las moléculas detectables adecuadas se pueden unir directa o indirectamente a polipéptidos que se unen al receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, ("polipéptidos de unión", incluyendo péptidos de unión descritos antes), anticuerpos, o fragmentos o porciones bioactivos del mismo. Las moléculas detectables adecuadas incluyen radionucleidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas, y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas se pueden unir directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo, que incluyen toxinas bacterianas o vegetales (por ejemplo, toxina de la difteria, exotoxina de *pseudomonas*, ricina, abrina y similares), así como radionucleidos terapéuticos, tales como yodo-131, renio-188 o itrio-90 (unidos directamente al polipéptido o anticuerpo, o unidos indirectamente, por ejemplo por medio de un resto de quelación). Los polipéptidos de unión o anticuerpos también se pueden conjugar con fármacos citotóxicos, tales como adriamicina. Para la unión indirecta a una molécula detectable o citotóxica, la molécula detectable o citotóxica se puede conjugar con un miembro de una pareja complementaria/anticomplementaria, en la que el otro miembro está unido a la parte de polipéptido de unión o anticuerpo. Para estos propósitos, una pareja complementaria/anticomplementaria de ejemplo es la biotina/estreptavidina.

[0104] En otra realización, se pueden usar proteínas de fusión de polipéptido de unión-toxina o proteínas de fusión de anticuerpo-toxina para células marcadas o para la inhibición o ablación de tejido (por ejemplo, para tratar células o tejidos de cáncer). Alternativamente, si el polipéptido de unión tiene múltiples dominios funcionales (es decir, un dominio de activación o un dominio de unión a ligando, más un dominio dirigido), una proteína de fusión que incluye sólo el dominio de marcaje puede ser adecuada para dirigir una molécula detectable, una molécula citotóxica o una molécula complementaria a un tipo de célula o tejido de interés. En los casos en los que la proteína de fusión que incluye sólo un dominio incluye una molécula complementaria, la molécula anticomplementaria se puede conjugar a una molécula detectable o citotóxica. Las proteínas de fusión de dominio-molécula complementaria representan, por lo tanto, un vehículo dirigido genérico para el suministro específico en

células/tejidos de conjugados de molécula anticomplementaria-detectable/citotóxica genérica.

[0105] En otra realización, las proteínas de fusión de polipéptido de unión al receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble-citoquina o anticuerpo-citoquina, se pueden usar para potenciar la muerte in vivo de tejidos diana (por ejemplo, cánceres pancreático, de la sangre, linfóide, colon y médula ósea), si el polipéptido de unión-citoquina o anticuerpo dirigido contra el receptor zcytor11 soluble o dirigido contra el polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como dirigido contra zcytor11/CRF2-4 soluble, se dirige a la célula hiperproliferativa (Véase, en general, Hornick y col., *Blood* 89: 4437-47, 1997). Las proteínas de fusión descritas permiten dirigir una citoquina a un sitio de acción deseado, proporcionando así una concentración local elevada de citoquina. Los anticuerpos dirigidos contra el homodímero y heterodímero de zcytor11 adecuados se dirigen a una célula o tejido no deseado (es decir un tumor o una leucemia) y la citoquina fusionada media la lisis de la célula diana mejorada por las células efectoras. Las citoquinas adecuadas para este propósito incluyen la interleuquina 2 y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), por ejemplo.

[0106] Alternativamente, las proteínas de fusión de anticuerpo o polipéptido de unión al receptor zcytor11 soluble o polipéptido heterodímero de zcytor11 soluble, tal como zcytor11/CRF2-4 soluble, descritas en el presente documento, se pueden usar para potenciar la muerte in vivo de tejidos diana mediante la estimulación directamente de una ruta apoptótica modulada por el receptor zcytor11, dando como resultado la muerte celular de células hiperproliferativas que expresan el receptor zcytor11 o un receptor heterodímero de zcytor11, tal como el receptor zcytor11/CRF2-4 soluble.

[0107] La invención se ilustra más mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

25 **Ejemplo 1**

Construcción de vectores de expresión de mamíferos que expresan zcytor11 soluble

Receptores: zcytor11CEE, zcytor11CFLG, zcytor11CHIS y zcytor11-Fc4

A. Construcción del vector de expresión de mamífero de zcytor11 que contiene zcytor11CEE, zcytor11CFLG y zcytor11CHIS

[0108] Se prepara un vector de expresión para la expresión del dominio extracelular soluble del polipéptido zcytor11 (SEQ ID NO: 3), pC4zcytor11CEE, en el que la construcción se diseña para que exprese un polipéptido zcytor11 compuesto de la metionina de iniciación prevista y truncado adyacente al dominio transmembrana previsto, y con un marcador Glu-Glu C-terminal (SEQ ID NO: 4).

[0109] Se crea un fragmento de ADN de zcytor11 que comprende el dominio de unión de citoquinas extracelular de zcytor11 (SEQ ID NO: 3) usando la PCR y se purifica. El ADN escindido se subclona en un vector de expresión plasmídico que tiene un péptido señal, p. ej., el péptido señal de zcytor11 nativo, y se une a un marcador Glu-Glu (SEQ ID NO: 4) en el extremo C de la secuencia de polinucleótido que codifica el polipéptido zcytor11. Dicho vector de expresión de mamífero contiene un casete de expresión que tiene un promotor de mamífero, múltiples sitios de restricción para insertar secuencias codificantes, un codón de parada y un terminador de mamífero. El plásmido también puede tener un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador de SV40.

[0110] El inserto de restricción de zcytor11 digerido y el vector previamente digerido se ligan usando técnicas de biología molecular estándar, y se electroporan en células competentes tales como células competentes DH10B (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cultivan en placas LB que contienen ampicilina 50 mg/ml, y se incuban durante la noche. Las colonias se criban por análisis de restricción del ADN preparado a partir de colonias individuales. La secuencia inserto de clones positivos se verifica por análisis de secuencia. Se hace una preparación de plásmido a gran escala usando el kit QIAGEN® Maxi prep (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0111] Se usa el mismo procedimiento para preparar receptores homodímeros, heterodímeros o multímeros solubles de zcytor11 (que incluyen subunidades que no son de receptor zcytor11 soluble, tales como CRF2-4 o IL-10R soluble) con un marcador de his C-terminal, compuesto de 6 restos de His en una fila; y un marcador flag (SEQ ID NO: 5) C-terminal, zcytor11CFAG. Para construir estas construcciones, el vector mencionado antes tiene el marcador HIS o FLAG® en lugar del marcador glu-glu (SEQ ID NO: 4).

B. Construcción de expresión de mamífero del receptor zcytor11 soluble zcytor11-Fc4

[0112] Se construye un plásmido de expresión que contiene todo o parte de un polinucleótido que codifica zcytor11, por recombinación homóloga. Se aisló un fragmento de ADNc de zcytor11 usando la PCR, que incluye la secuencia de polinucleótido del dominio extracelular del receptor zcytor11. Los cebadores usados en la PCR para la producción del fragmento de zcytor11 son del extremo 5' al 3': (1) aproximadamente 40 pb de la secuencia flanqueadora del vector (5' del inserto) y aproximadamente 17 pb correspondientes al extremo 5' del dominio extracelular de zcytor11; y (2) aproximadamente 40 pb del extremo 5' de la secuencia de polinucleótido de Fc4 (SEQ ID NO: 6) y aproximadamente 17 pb correspondientes al extremo 3' del dominio extracelular de zcytor11. El fragmento Fc4 para la fusión con zcytor11 se genera por la PCR de una forma similar. Los dos cebadores usados en la producción del fragmento Fc4 incluyen: (1) un cebador 5' que consiste en aproximadamente 40 pb de la secuencia desde el extremo 3' del dominio extracelular de zcytor11 y aproximadamente 17 pb del extremo 5' (SEQ ID NO: 6); y (2) un cebador 3' que consiste en aproximadamente 40 pb de la secuencia del vector (3' del inserto) y aproximadamente 17 pb del extremo 3' de Fc4 (SEQ ID NO: 6). Después se lleva a cabo la amplificación por la PCR de cada una de las reacciones descritas antes usando condiciones estándar en la técnica.

[0113] Se obtiene un vector de expresión de ejemplo a partir del plásmido pCZR199 (depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, designado con el N° 98668), que se corta con SmaI (BRL). El vector de expresión se obtuvo del plásmido pCZR199, y es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor inmediato temprano del CMV, un intrón de consenso de la región variable del locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes, un codón de parada y un terminador de hormona de crecimiento humana. El vector de expresión también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor, potenciador y origen de replicación de SV40, un gen de DHFR y el terminador de SV40. El vector de expresión usado se construyó a partir de pCZR199 por la sustitución del promotor de metalotioneína por el promotor temprano intermedio del CMV.

[0114] Se combinan células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con aproximadamente 1 µg de cada uno de los insertos de zcytor11 y Fc4, y 100 ng de vector de expresión digerido con SmaI (BRL) y se electroporan. Las mezclas de levadura/ADN se electropulsan, por ejemplo a 0,75 kV (5 kV/cm), "infinitos" ohmios, 25 µF. Se añaden a cada cubeta 600 µl de sorbitol 1,2 M y la levadura se cultiva en partes alícuotas en placas URA-D y se incuban a 30 °C.

[0115] Después de aproximadamente 48 h, se recogen los transformantes de levadura Ura + de una sola placa, se aísla el ADN, y se transforma en células de *E. coli* electrocompetentes (p. ej., DH10B, GibcoBRL), y se cultivan en placa usando procedimientos estándar. Los clones individuales que albergaban la construcción de expresión correcta para zcytor11-Fc4 se identifican por digestión de restricción para verificar la presencia del inserto zcytor11-Fc4 y confirmar que se han unido correctamente entre sí varias secuencias de ADN. El inserto de clones positivos se somete a análisis de secuencia. El ADN de plásmido de escala mayor se aísla usando el kit Qiagen Maxi (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0116] Se usan procedimientos similares para preparar subunidades que no son de zcytor 11 de receptores heterodímeros y multímeros, tales como CRF2-4 y IL-10R marcados con Fc4.

45 **Ejemplo 2**Transfección y expresión de polipéptidos receptores solubles

[0117] Se cultivan células BHK 570 (ATCC N° CRL-10314), DG-44 CHO, u otras células de mamífero, con aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células/pocillo (placa de 6 pocillos) en 800 µl del medio exento de suero (SF) adecuado (p. ej., DMEM, Gibco/BRL alto contenido en glucosa) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Las células se transfectan con plásmidos de expresión que contienen zcytor11CEE, zcytor11CFLG, zcytor11CHIS o zcytor11-Fc4 (Ejemplo 1), o subunidades que no son de zcytor11 de receptores heterodímeros y multímeros, tales como CRF2-4 y IL-10R marcados con -CEE, -CFLG, -CHIS, o -Fc4, usando Lipofectina™ (Gibco BRL), en medio exento de suero (SF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aíslan clones individuales que expresan los receptores solubles, se criban y se cultivan en medio de cultivo celular, y se purifican usando técnicas estándar.

Ejemplo 360 Expresión del receptor soluble zcytor 11 en *E. coli*A. Construcción del vector de expresión pCZR225 que expresa el polipéptido de fusión huzcytor11/MBP-6H

[0118] Se construye un plásmido de expresión que contiene un polinucleótido que codifica un receptor zcytor11 soluble fusionado en el extremo C a proteína de unión a maltosa (MBP), por recombinación homóloga. El polipéptido de fusión contiene una parte de MBP N-terminal de aproximadamente 388 aminoácidos fusionada al receptor zcytor11 soluble (SEQ ID NO: 3). Se aísla un fragmento de ADNc de zcytor11 (SEQ ID NO: 1) usando la PCR como se describe en el presente documento. Se usan dos cebadores en la producción del fragmento de zcytor11 en una reacción de la PCR estándar: (1) uno contiene aproximadamente 40 pb de la secuencia flanqueadora del vector y aproximadamente 25 pb que corresponden al extremo amino de zcytor11, y (2) otro que contiene aproximadamente 40 pb del extremo 3' que corresponde a la secuencia del vector flanqueador y aproximadamente 25 pb que corresponden al extremo carboxilo de zcytor11. Se llevan 2 µl de la reacción de PCR de 100 µl a un gel de agarosa al 1,0 % con 1 x tampón de TBE para el análisis, y se observa el fragmento aproximado esperado. El resto de la reacción de PCR se combina con el segundo tubo de PCR y se hace precipitar con 400 µl de etanol absoluto. El ADN precipitado se usa para la recombinación en el vector receptor cortado con Sma1 pTAP98 para producir la construcción que codifica la fusión MBP-zcytor11, como se describe a continuación.

[0119] El plásmido pTAP98 se obtiene 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 la MBP) seguido de un marcador His, un sitio de escisión de trombina, un sitio de clonación y el terminador *rrnB*. El vector pTAP98 se construye usando recombinación homóloga en levaduras. Se recombinan 100 ng de pMAL-c2 cortado con EcoR1 con 1 µg de pRS316 cortado con PvuI, 1 µl de conector y 1 µg de pRS316 cortado con Sca1/EcoR1, en una reacción de PCR. Los productos de la PCR se concentran por precipitación con etanol al 100 %.

[0120] Se combinan células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con aproximadamente 10 µl de una mezcla que contiene aproximadamente 1 µg del producto de la PCR anterior el receptor zcytor11, y 100 ng de vector pTAP98 digerido con SmaI, y se electroporan usando procedimientos estándar y se cultivan en placas URA-D y se incuban a 30 °C.

[0121] Después de aproximadamente 48 horas, los transformantes de levadura Ura + de una sola placa se recogen, se aísla el ADN y se transforman en células de *E. coli* electrocompetentes (p. ej., MC1061, Casadaban y col., *J. Mol. Biol.* 138, 179-207), y se cultivan en placas MM/CA + AMP 100 mg/l (Pryor y Leiting, *Protein Expression and Purification* 10: 309-319, 1997), usando procedimientos estándar. Las células se cultivan en MM/CA con ampicilina 100 µg/ml durante 2 horas, agitando, a 37°C. Se induce 1 ml de cultivo con IPTG 1 mM. 2-4 horas más tarde se mezclan 250 µl de cada cultivo con 250 µl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 250 µl de tampón de 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 mezclan con flujo vortical durante 1 min y se calientan a 65 °C durante 10 min. Se cargan 20 µl por fila en un gel PAGE al 4 %-12 % (NOVEX). Los geles se desarrollan en 1Xtampón de MES. Los clones positivos se denominan pCZR225 y se someten a análisis de secuencia.

[0122] Se usa 1 µl de ADN de secuenciación para transformar la cepa BL21. Las células se electropulsan a 2,0 kV, 25 µF y 400 ohms. Después de electroporación, 0,6 ml de MMICA con ampicilina 100 mg/l. Las células se cultivan en MM/CA y se inducen con ITPG como se ha descrito antes. Los clones positivos se usan para cultivarlos para la purificación de proteínas de la proteína de fusión huzcytor11/MBP-6H.

Ejemplo 4

Anticuerpos policlonales contra el receptor zcytor11 soluble

[0123] Se preparan anticuerpos policlonales por inmunización de conejos blancos de Nueva Zelanda hembras con el polipéptido huzcytor11/MBP-6H purificado (Ejemplo 3), o el receptor soluble zcytor11CEE recombinante purificado (Ejemplo 1). Se da a cada uno de los conejos una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 200 mg de proteína purificada en adyuvante completo de Freund (Pierce, Rockford, IL) seguida de inyecciones IP de refuerzo de 100 mg de proteína purificada en adyuvante incompleto de Freund cada 3 semanas. De 7 a 10 días después de la administración de la tercera inyección de refuerzo, se saca sangre a los animales y se recoge el suero. Después se administra refuerzo y se saca sangre a los conejos cada 3 semanas.

[0124] Los anticuerpos policlonales específicos para zcytor11 se purifican por afinidad a partir del suero de conejo usando una columna de proteína CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB) que se prepara usando aproximadamente 10 mg del polipéptido huzcytor11/MBP-6H purificado por gramo de CNBr-SEPHAROSE, seguido de 20X diálisis en PBS durante la noche. Los anticuerpos específicos de zcytor11 se caracterizan por un control de valoración ELISA usando 1 mg/ml del antígeno de proteína adecuado como diana para el anticuerpo. El límite de detección inferior (LDI) de los anticuerpos de conejo dirigidos contra zcytor11 purificados por afinidad se determina

usando procedimientos estándar.

Ejemplo 5

5 Anticuerpos monoclonales contra el receptor zcytor11

- [0125]** Los anticuerpos monoclonales contra el receptor zcytor11 soluble se preparan inmunizando ratones BalbC macho (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) con las proteínas zcytor11 solubles recombinantes purificadas descritas en el presente documento. Se administra a cada uno de los ratones una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 20 mg de proteína purificada en adyuvante completo de Freund (Pierce, Rockford, IL) seguida de inyecciones IP de refuerzo de 10 mg de proteína purificada en adyuvante incompleto de Freund cada 2 semanas. De 7 a 10 días después de la administración de la tercera inyección de refuerzo, se saca sangre a los animales y se recoge el suero, y se evalúa la titulación de anticuerpos.
- [0126]** Se recogen los esplenocitos de ratones con titulación alta y se fusionan con células de mieloma SP2/0 murinas usando PEG 1500 (Boehringer Mannheim, Reino Unido) en dos procedimientos de fusión separados usando una relación de fusión de esplenocitos a células de mieloma 4: 1 (Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Press). Después de 10 días de crecimiento después de la fusión, se identifican los hibridomas que producen anticuerpo por ELISA usando proteína receptora zcytor11 soluble recombinante purificada (Ejemplo 6C) como una diana para el anticuerpo y por FACS usando células Baf3 que expresan la secuencia de zcytor11 (Ejemplo 8) como una diana para el anticuerpo. Los hibridomas positivos resultantes por ambos procedimientos se clonan tres veces limitando la dilución.

Ejemplo 6

25 Evaluación de la heterodimerización del receptor zcytor11 usando el ensayo ORIGEN

- [0127]** El receptor zcytor11 soluble zcytor11CFLAG (Ejemplo 1) o gp130 (Hibi, M. y col., *Cell* 63: 1149-1157, 1990) se biotinilan por reacción con un exceso molar de 5 veces de sulfo-NHS-LC-Biotina (Pierce, Inc., Rockford, IL) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El receptor zcytor11 soluble y otra subunidad de receptor soluble, por ejemplo el receptor IL-10R (sIL-10R) o CRF2-4 (CRF2-4) soluble (R&D Systems, Minneapolis, MN), o el receptor zcytor11 soluble (patente de EE.UU. nº 5.965.704) se marcan con un exceso molar de 5 veces de Ru-BPY-NHS (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las formas biotinilada y marcada con Ru-BPY-NHS del receptor zcytor11 soluble se pueden designar respectivamente receptor Bio-zcytor11 y Ru-zcytor11; las formas biotinilada y marcada con Ru-BPY-NHS de la otra subunidad de receptor soluble se pueden designar de forma similar. Los ensayos se pueden llevar a cabo usando medios condicionados de células que expresan un ligando, tal como IL-TIF, que se une a los receptores heterodímeros de zcytor11, o usando IL-TIF purificado.
- [0128]** Para la caracterización de la unión al receptor inicial, se ensaya un panel de citoquinas o medio condicionado para determinar si pueden mediar la homodimerización del receptor zcytor11 y si pueden mediar la heterodimerización del receptor zcytor11 con las subunidades de receptores solubles descritas antes. Para hacer esto, se combinan 50 µl de medio condicionado o TBS-B que contiene citoquina purificada, con 50 µl de TBS-B (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, BSA 1 mg/ml, pH 7,2) que contiene p. ej., 400 ng/ml de receptor Ru-zcytor11 y Bio-zcytor11, o 400 ng/ml de receptor Ru-zcytor11 y p. ej., Biogp130, o 400 ng/ml de p. ej., Ru-CRF2-4 y Bio-zcytor11. Después de incubación durante 1 h a temperatura ambiente, se añaden 30 µg de perlas magnéticas de 2,8 mm revestidas con estreptavidina (Dynal, Inc., Oslo, Noruega) y la reacción se incuba durante una hora adicional a temperatura ambiente. Después se añaden 200 µl de tampón de ensayo ORIGEN (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) y se mide la extensión de la asociación del receptor usando un analizador M8 ORIGEN (Igen, Inc.).

50 Ejemplo 7

Construcción para generar un heterodímero de receptores zcytor11

- [0129]** Se construyó un vector que expresaba un heterodímero de zcytor11 humano secretado. En esta construcción, el dominio extracelular de unión a citoquinas de zcytor11 se fusionó con la cadena pesada de la IgG gamma 1 (IgG γ 1) con un marcador Glu-Glu (SEQ ID NO: 4) en el extremo C, mientras se fusionaba la parte extracelular de la subunidad del receptor de citoquinas heterómero (p. ej., un componente del receptor de CRF2-4, IL-9, IL-10 IL-4) con la cadena pesada de la IgG gamma 1 (IgG γ 1) con un marcador His en el extremo C.

60 A. Construcción de vectores de fusión de IgG gamma 1 6-His e IgG gamma 1 Glu-Glu

- [0130]** La cadena pesada de la IgG γ 1 con un marcador 6-His C-terminal (SEQ ID NO: 13) se clonó en el vector

de expresión de mamífero pZP-9 (depósito en ATCC n° 98668) de modo que se puede clonar en el mismo cualquier dominio extracelular de receptor de citoquinas deseado que tenga un sitio 5' EcoRI y 3' BamHI, dando como resultado una fusión del dominio extracelular N-terminal-IgG γ 1 C-terminal. El fragmento de IgG γ 1 usado en esta construcción se hizo usando la PCR para aislar la IgG γ 1 usando los cebadores oligonucleótidos ZC29.239 (SEQ ID NO: 14) y ZC29.232 (SEQ ID NO: 15). Los productos de la PCR se purificaron usando procedimientos descritos en el presente documento y se digirieron con XhoI y BamHI (Boehringer-Mannheim) y posteriormente se purificaron en gel. La parte extracelular de CRF2-4 (SEQ ID NO: 18) se amplificó usando la PCR, usando los cebadores oligonucleótidos ZC39.319 (SEQ ID NO: 16) y ZC39.325 (SEQ ID NO: 17). Los productos de la PCR se purificaron usando procedimientos descritos en el presente documento y se digirieron con EcoRI y BamHI (Boehringer-Mannheim) y posteriormente se purificaron en gel. El fragmento de IgG γ 1 BamHI/XhoI y el fragmento de CRF2-4 EcoRI/BamHI obtenidos antes, después se ligaron entre sí en pZP-9 previamente digerido con EcoRI y XhoI para dar una construcción que tenía la parte extracelular del dominio de unión de citoquinas extracelular de CRF2-4 fusionado con la IgG γ 1 con un marcador 6-HIS en el extremo C. Esta construcción posteriormente se modificó para introducir un sitio de escisión de trombina 3' de CRF2-4 y 5' del marcador 6-HIS. Esto se hizo usando la construcción anterior como molde en la PCR con los cebadores oligonucleótidos ZC38.981 (SEQ ID NO: 20) y ZC39.042 (SEQ ID NO: 21). Los productos de la PCR se purificaron usando procedimientos descritos en el presente documento y se digirieron con SacII y XhoI. Este fragmento SacII/XhoI se ligó en la construcción descrita antes que se había digerido previamente con SacII y XhoI. La secuencia del polinucleótido del dominio de unión de citoquinas extracelular de CRF2-4 fusionado con IgG γ 1 con un marcador 6-HIS se muestra en la SEQ ID NO: 22 y la correspondiente secuencia del polipéptido se muestra en la SEQ ID NO: 23.

[0131] La cadena pesada de la IgG γ 1 con un marcador Glu-Glu C-terminal (SEQ ID NO: 4) se clonó en el vector de expresión de mamífero Zem228R (depósito en ATCC n° 69446) de modo que se puede clonar en el mismo cualquier dominio extracelular de receptor de citoquinas deseado que tenga un sitio 5' EcoRI y 3' BamHI, dando como resultado una fusión del dominio extracelular de citoquinas N-terminal-IgG γ 1 C-terminal. El fragmento de IgG γ 1 usado en esta construcción se hizo usando la PCR para aislar la secuencia de IgG γ 1 usando los cebadores oligonucleótidos ZC29238 (SEQ ID NO: 24) y ZC29231 (SEQ ID NO: 25). Los productos de la PCR se purificaron usando procedimientos descritos en el presente documento y se digirieron con XhoI y EcoRI (Boehringer-Mannheim) y posteriormente se purificaron en gel. La parte extracelular de hzcytor11 (SEQ ID NO: 1) se amplificó usando la PCR, usando los cebadores oligonucleótidos ZC39335 (SEQ ID NO: 26) y ZC28981 (SEQ ID NO: 27). Los productos de la PCR se purificaron usando procedimientos descritos en el presente documento y se digirieron con EcoRI y BamHI (Boehringer-Mannheim) y posteriormente se purificaron en gel. El fragmento de IgG γ 1 BamHI/XhoI y los fragmentos de hzcytor11 EcoRI/BamHI obtenidos antes, después se ligaron entre sí en Zem228R previamente digerido con EcoRI y XhoI para dar una construcción que tenía el dominio extracelular de hzcytor11 fusionado con la IgG γ 1 con un marcador de epítipo Glu-Glu en el extremo C. Esta construcción posteriormente se modificó para introducir un sitio de escisión de trombina 3' de CRF2-4 y 5' del marcador 6-HIS. Esto se hizo usando la construcción anterior como molde en la PCR con los cebadores oligonucleótidos ZC38981 (SEQ ID NO: 27) y ZC39043 (SEQ ID NO: 28). Los productos de la PCR se purificaron usando procedimientos descritos en el presente documento y se digirieron con SacII y XhoI. Este fragmento SacII/XhoI se ligó en la construcción descrita antes que se había digerido previamente con SacII y XhoI. La secuencia del polinucleótido del dominio de unión de citoquinas extracelular de hzcytor11 fusionado con IgG γ 1 con un marcador Glu-Glu se muestra en la SEQ ID NO: 29 y la correspondiente secuencia del polipéptido se muestra en la SEQ ID NO: 30.

B. Coexpresión de zcytor11 y el dominio extracelular de la subunidad del receptor de citoquinas heterodímero

[0132] Se cotransfectaron 16 μ g de cada uno de los vectores anteriores en células de mamífero, p. ej., células BHK-570 (ATCC N° CRL-10314) usando el reactivo LipofectaminePlus™ (Gibco/BRL), según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron durante 10 días en DMEM + FBS al 5 % (Gibco/BRL) que contenía metotrexato 1 μ M (MTX) (Sigma, St. Louis, MO) y G418 0,5 mg/ml (Gibco/BRL) durante 10 días. La mezcla resultante de transfectantes se seleccionó otra vez en MTX 10 μ M y G418 0,5 mg/ml durante 10 días.

[0133] La mezcla resultante de células doblemente seleccionadas se usó para generar la proteína receptora soluble zcytor11/CRF2-4. Se usaron 3 depósitos (Nunc, Dinamarca) de esta mezcla para generar 10 litros de medio condicionado exento de suero. Estos medios condicionados se pasaron por una columna de níquel seguido de una columna de Glu-Glu para purificar los heterodímeros de los homodímeros.

Ejemplo 8

Determinación de las subunidades de receptores que heterodimerizan o multimerizan con el receptor zcytor11

[0134] Usando procedimientos estándar descritos en el presente documento, las células quiméricas BaF3/MPL-zcytor11 se transfectan con una subunidad de receptor de citoquinas heterodímera adicional y sirven

como una línea celular de bioensayo para medir la respuesta de transducción de señales de complejos heterodímeros de receptores zcytor11, al indicador luciferasa en presencia de TPO. En presencia de TPO, las células BaF3/MPL-zcytor11 no producen señal, lo que sugiere que el receptor zcytor11 debe heterodimerizar para producir la señal. La transfección de la línea celular BaF3/MPL-zcytor11 y fusión adicional de MLP-receptor de citoquinas de clase I que produce señal en presencia del ligando TPO, determina qué subunidades de receptores de citoquinas heterodímeros son necesarias para la señalización del receptor zcytor11. El uso de las fusiones de MLP-receptor para este propósito alivia el requisito de la presencia de un ligando natural para el receptor zcytor11.

[0135] Las fusiones de MLP-receptor de citoquinas de clase I se hacen de acuerdo con el ejemplo 5, usando el dominio extracelular y dominios transmembrana del receptor MPL y el dominio de señalización intracelular del receptor de citoquinas de clase I. La línea celular de bioensayo BaF3/MPL-zcytor11 cotransfectada con una fusión individual de MLP-receptor de citoquinas de clase I de acuerdo con el ejemplo 6, forma una línea celular BaF3/MPL-zcytor11/MLP-receptor de citoquinas de clase I. Los complejos de receptores incluyen, pero sin limitar, el receptor zcytor11 en combinación con una fusión de MLP-receptor de citoquinas que comprende uno o más de, por ejemplo, un componente del receptor CRF2-4, IL-9, IL-10 IL-4. Después se ensaya cada línea celular de complejo de receptores independiente en presencia de TPO y se mide la proliferación usando procedimientos rutinarios (p. ej., ensayo de azul Alamar). La línea celular de bioensayo BaF3/MPL-zcytor11 sirve como control para la actividad de fondo de la luciferasa, y por lo tanto se usa como un valor base para comparar la señalización por diferentes combinaciones de complejos de receptores. Además, la línea celular de BaF3/MPL-receptor de citoquinas de clase I se puede construir para controlar los efectos de la homodimerización de MLP-receptor de citoquinas de clase I para aquellos receptores de citoquinas de clase I que se sabe que producen señal tras la homodimerización. Se espera que la TPO en presencia del complejo de receptores correcto, aumente la proliferación de la línea celular BaF3/MPL-zcytor11/MLP-receptor de citoquinas de clase I en aproximadamente 5 veces respecto al valor base o más en presencia de TPO.

[0136] Ensayos de proliferación similares usan zcytor11 de longitud completa (SEQ ID NO: 2) para cribar subunidades que no son de zcytor11 adicionales que señalizan complejos heterodímeros y multímeros. Se transfectan células que expresan zcytor11 de longitud completa (SEQ ID NO: 2) con una subunidad que no es de zcytor11 y se ensaya la proliferación en presencia del ligando IL-TIF. Las células que expresan los componentes de los receptores zcytor11 heterodímeros y multímeros deben proliferar en presencia de IL-TIF.

Ejemplo 9

Reconstitución del receptor zcytor11 in vitro

[0137] Para identificar los componentes implicados en el complejo de señalización de zcytor11, se llevan a cabo estudios de reconstitución del receptor como sigue. Las células BHK 570 (ATCC N° CRL-10314) transfectadas, usando procedimientos estándar descritos en el presente documento, con un plásmido de vector de expresión de mamífero con indicador de luciferasa, sirven de línea celular de bioensayo para medir la respuesta de transducción de señal de un complejo de receptor zcytor11 transfectado, al indicador luciferasa en presencia de IL-TIF. Las células BHK no expresan de forma endógena el receptor zcytor11. Un vector de expresión de mamífero con el indicador luciferasa ilustrativo es el plásmido KZ134 que se construyó con oligonucleótidos complementarios que contienen los elementos de unión al factor de transcripción STAT de 4 genes. Un elemento inducible c-fos Sis modificado (m67SIE, o hSIE) (Sadowski, H. y col., *Science* 261: 1739-1744, 1993), p21 SIE1 del gen p21 WAF1 (Chin, Y. y col., *Science* 272: 719-722, 1996), el elemento de respuesta de la glándula mamaria del gen de 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 estándar, en un vector receptor con el indicador luciferasa de luciérnaga con un promotor c-fos (Poulsen, L.K. y col., *J. Biol. Chem.* 273: 6229-6232, 1998) digerido con las mismas enzimas y que contenía un marcador seleccionable de neomicina. El plásmido KZ134 se usa para la transfección estable de células BHK o BaF3, usando procedimientos de transfección y selección estándar para hacer una línea celular BHK/KZ134 o BaF3/KZ134, respectivamente.

[0138] La línea celular de bioensayo se transfecta solo con el receptor zcytor11, o se cotransfecta con el receptor zcytor11 junto con una de una variedad de otras subunidades de receptores conocidas. Los complejos de receptores incluyen, pero sin limitar, el receptor zcytor11 solo, diferentes combinaciones del receptor zcytor11 con uno o más componentes de los receptores CRF2-4, IL-9, IL-10 IL-4, subunidades de receptores de citoquinas de clase II, o componentes del receptor de IL-2 (IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ), receptor de zcytor11 con uno o más componentes de receptores de la familia de receptores de IL-4/IL-13 (IL-4R α , IL-13R α , IL-13R α'), así como otros receptores de interleuquina (p. ej., IL-15 R α , IL-7R α , IL-9R α , IL-21R (zcytor11)). Después se ensaya cada línea celular de complejo de receptores independiente en presencia de medio condicionado de citoquinas o citoquinas purificadas y se mide la actividad de la luciferasa usando procedimientos rutinarios. La línea celular de bioensayo no

transfectada sirve de control para la actividad de fondo de la luciferasa, y por lo tanto se usa como un valor base para comparar la señalización por las diferentes combinaciones de complejos de receptores. Se espera que el medio condicionado de citoquinas o las citoquinas que se unen al receptor zcytor11 en presencia del complejo de receptores correcto produzca una lectura de la luciferasa de aproximadamente 5 veces frente al valor de fondo o mayor.

[0139] Como alternativa, se puede llevar a cabo un ensayo similar en el que las líneas celulares Baf3/zcytor11-mpl y Baf3/zeytor11 se cotransfectan como se ha descrito antes y se mide la proliferación.

10 **Ejemplo 10**

Construcción para generar IL-TIF marcado con CEE

[0140] Se diseñaron oligonucleótidos para generar un fragmento por PCR que contenía la secuencia Kozak y la región codificante de IL-TIF, sin su codón de parada. Estos oligonucleótidos se diseñaron con un sitio KpnI en el extremo 5' y un sitio BamHI en el extremo 3' para facilitar la clonación en pHZ200-CEE, el vector de referencia para la expresión de mamífero de las proteínas marcadas con Glu-Glu en el C-terminal (SEQ ID NO: 4). El vector pHZ200 contiene un promotor MT-1.

[0141] Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo usando la polimerasa Turbo Pfu (Stratagene) para amplificar un fragmento de ADNc de IL-TIF. En la reacción de la PCR se usaron aproximadamente 20 ng de molde de polinucleótido de IL-TIF humano (SEQ ID NO: 7), y los oligonucleótidos ZC28590 (SEQ ID NO: 9) y ZC28580 (SEQ ID NO: 10). Las condiciones de reacción de la PCR eran las siguientes: 95°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 95°C durante 60 segundos, 55°C durante 60 segundos, y 72°C durante 60 segundos; y 72°C durante 10 minutos; seguido de mantenimiento a 4°C. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se purificaron usando un kit de extracción en gel de QiaQuick™ (Qiagen). El fragmento de ADN aislado, aproximadamente 600 pb, se digirió con KpnI y BamHI (Boehringer-Mannheim), se purificó en gel como antes y se ligó en pHZ200-CEE que se había digerido previamente con KpnI y BamHI.

[0142] Se electroporó aproximadamente 1 µl de la reacción de ligación en células competentes DH10B ElectroMax™ (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cultivaron en placas LB que contenían ampicilina 100 µg/ml, y se incubaron durante la noche. Se recogieron las colonias y se cribaron por PCR usando los oligonucleótidos ZC28590 (SEQ ID NO: 9) y ZC28580 (SEQ ID NO: 10), con las condiciones de la PCR descritas antes. Después se secuenciaron los clones que contenía insertos para confirmar los insertos de IL-TIF sin error. Se llevaron a cabo Maxipreps de la construcción pHZ200-IL-TIF-CEE correcta, verificada por análisis de secuencia.

Ejemplo 11

Transfección y expresión de polipéptidos de IL-TIF

[0143] Se cultivaron células BHK 570 (ATCC N° CRL-10314), con aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células/pocillo (placa de 6 pocillos) en 800 µl de medio DMEM exento de suero (SF) (DMEM, Gibco/BRL con alto contenido de glucosa) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Las células se transfectaron con un plásmido de expresión que contenía el IL-TIF'-CEE descrito antes (Ejemplo 10), usando Lipofectina™ (Gibco BRL), en medio DMEM exento de suero (SF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0144] Las células se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 5 horas, después se transfirieron a placas MAXI separadas 150 mm en un volumen final de 30 ml de DMEM/suero bovino fetal al 5 % (FBS) (Hyclone, Logan, UT). Las placas se incubaron a 37°C, CO₂ al 5 %, durante la noche, y la mezcla de ADN: Lipofectina™ se sustituyó por medio de selección (FBS al 5 %/DMEM con metotrexato 1 µM (MTX)) al día siguiente.

[0145] Aproximadamente 10-12 días después de la transfección, las colonias se recogieron mecánicamente en placas de 12 pocillos en 1 ml de FCS al 5 %/DMEM con MTX 5 µM, y después se cultivaron hasta confluencia. Después se ensayaron los niveles de expresión en las muestras de colonias de clones con expresión positiva en medio condicionado por SDS-PAGE y análisis Western. Se seleccionó un clon con expresión alta y se expandió para la generación extensa de medio condicionado para la purificación del IL-TIF-CEE expresado por las células (Ejemplo 12).

Ejemplo 12Purificación del polipéptido de IL-TIF-CEE de células BHK 570

5 **[0146]** Salvo que se indique otra cosa, todas las operaciones se llevaron a cabo a 4 °C. El siguiente procedimiento se usó para purificar el polipéptido de IL-TIF que contenía el marcador GluGlu C-terminal (EE) (SEQ ID NO: 4). Se concentró el medio condicionado de células BHK que expresaban IL-TIF-CEE (Ejemplo 11) con un cartucho espiral Amicon S10Y3 en un ProFlux A30. Se añadió una disolución de inhibidor de proteasa al medio condicionado concentrado hasta concentraciones finales de ácido etilendiaminotetraacético 2,5 mM (EDTA, Sigma
10 Chemical Co. St. Louis, MO), leupeptina 0,003 mM (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), pepstatina 0,001 mM (Boehringer-Mannheim) y Pefabloc 0,4 mM (Boehringer-Mannheim). Se sacaron muestras para el análisis y el volumen aparente se congeló a -80 °C hasta empezar la purificación. Las concentraciones totales de proteína diana del medio condicionado concentrado se determinaron por SDS-PAGE y análisis de transferencia Western con el anticuerpo dirigido contra EE conjugado con HRP.

15 **[0147]** Se vertió una columna de aproximadamente 100 ml de G-Sepharose con anticuerpo contra EE (preparada como se describe a continuación) en una columna de vidrio Waters AP-5 de 5 cm x 10 cm. La columna se empaquetó con flujo y se equilibró en un sistema BioCad Sprint (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4. El medio condicionado concentrado se descongeló, se
20 esterilizó por filtración a través de 0,2 µm, se ajustó el pH a 7,4, y después se cargó en la columna durante la noche con un caudal de aproximadamente 1 ml/min. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna (VC) de disolución salina taponada con fosfato (PBS, pH 7,4), el tapón se eluyó con 200 ml de PBS (pH 6,0) que contenía el péptido EE 0,5 mg/ml (Anaspec, San Jose, CA) a 5 ml/min. El péptido EE usado tiene la secuencia EYMPME (SEQ ID NO: 4). La columna se lavó con 10 VC de PBS, después se eluyó con 5 VC de glicina 0,2 M, pH 3,0. El pH de la columna
25 eluida con glicina se ajustó a 7,0 con 2 VC de 5X PBS, después se equilibró en PBS (pH 7,4). Se recogieron fracciones de 5 ml a lo largo de toda la cromatografía por elución y se siguió la absorbancia a 280 y 215 nm; las mezclas del paso y del lavado también se guardaron y se analizaron. Se analizó en las fracciones con pico de elución del polipéptido EE la proteína diana por SDS-PAGE con tinción con plata y transferencia Western con el anticuerpo dirigido contra EE conjugado con HRP. Las fracciones de elución del polipéptido de interés se mezclaron
30 y se concentraron de 60 ml a 5,0 ml usando un concentrador de centrifugación de membrana con corte de exclusión de peso molecular de 10.000 Dalton (Millipore, Bedford, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0148] Para separar el IL-TIF-CEE de otras proteínas que purifican conjuntamente, las fracciones de elución mezcladas del polipéptido concentradas se sometieron a una columna POROS HQ-50 (resina de intercambio
35 aniónico fuerte de PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) a pH 8,0. Se vertió una columna de 1,0 x 6,0 cm y se empaquetó con fluido en un sistema BioCad Sprint. La columna se cargó con el contraíón y después se equilibró en TRIS 20 mM pH 8,0 (Tris(Hidroximetil-aminometano)). La muestra se diluyó 1: 13 (para reducir la fuerza iónica de la PBS) y después se cargó en una columna Poros HQ a 5 ml/min. La columna se lavó con 10 VC con Tris 20 mM pH 8,0 y después se eluyó con 40 VC de gradiente de Tris 20 mM/cloruro sódico 1 M (NaCl) a 10 ml/min. Se recogieron
40 fracciones de 1,5 ml a lo largo de toda la cromatografía y se siguió la absorbancia a 280 y 215 nm. Las fracciones de picos de elución se analizaron por SDS-PAGE con tinción con plata. Las fracciones de interés se mezclaron y se concentraron hasta 1,5-2 ml usando un concentrador de centrifugación de membrana con corte de exclusión de peso molecular de 10.000 Dalton (Millipore, Bedford, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 **[0149]** Para separar el polipéptido IL-TIF-CEE del péptido EE libre y cualquier proteína que purifica conjuntamente contaminante, las fracciones mezcladas concentradas se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño molecular en una columna Sephadex S200 de 1,5 x 90 cm (Pharmacia, Piscataway, NJ) equilibrada y cargada con PBS con un caudal de 1,0 ml/min usando un sistema BioCad Sprint. Se recogieron fracciones de 1,5 ml a lo largo de toda la cromatografía y se siguió la absorbancia a 280 y 215 nm. Las fracciones de picos se
50 caracterizaron por SDS-PAGE con tinción con plata y solo se mezclaron las fracciones más puras. Este material representaba el polipéptido IL-TIF-CEE purificado.

[0150] Este material purificado se sometió finalmente a una columna de 4 ml ActiClean Etox (Sterogene) para separar cualquier endotoxina restante. La muestra se pasó por la columna de gravedad equilibrada con PBS 4
55 veces, y después la columna se lavó con un solo volumen de 3 ml de PBS, que se mezcló con la muestra "limpiada". Después el material se esterilizó por filtración a través de 0,2 µm y se conservó a -80 °C hasta que se dividió en partes alícuotas.

[0151] En los geles de SDS-PAGE con tinción con plata y azul Coomassie y sometidos a transferencia
60 Western, el polipéptido IL-TIF-CEE era una banda principal. La concentración de proteína del material purificado se llevó a cabo por análisis de BCA (Pierce, Rockford, IL) y la proteína se dividió en partes alícuotas y se conservó a -80 °C de acuerdo con procedimientos estándar.

[0152] Para preparar la Sepharosa con anticuerpo dirigido contra EE, un volumen de lecho de 100 ml de G-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) se lavó 3 veces con 100 ml de PBS que contenía azida sódica al 0,02 % usando una unidad de filtración de 0,45 μ m de 500 ml Nalgene. El gel se lavó con 6,0 volúmenes de trietanolamina 200 mM, pH 8,2 (TEA, Sigma, St. Louis, MO), y se añadió un volumen igual de disolución de anticuerpo contra EE que contenía 900 mg de anticuerpo. Después de incubación durante una noche a 4 °C, se separó el anticuerpo no unido lavando la resina con 5 volúmenes de TEA 200 mM como se ha descrito antes. La resina se volvió a suspender en 2 volúmenes de TEA, se transfirió a un envase adecuado y se añadió dimetilpimilimidato-2HCl (Pierce, Rockford, IL) disuelto en TEA hasta una concentración final de 36 mg/ml de gel de proteína G-Sepharose. El gel se sacudió a temperatura ambiente durante 45 min y el líquido se separó usando la unidad de filtración descrita antes. Después los sitios no específicos del gel se bloquearon por incubación durante 10 min, a temperatura ambiente con 5 volúmenes de etanolamina 20 mM en TEA 200 mM. Después el gel se lavó con 5 volúmenes de PBS que contenía azida sódica al 0,02 % y esta disolución se conservó a 4 °C.

15 **Ejemplo 13**

Efectos in vivo del polipéptido IL-TIF

[0153] Los ratones (hembra, C57B1, 8 semanas de edad; Charles River Labs, Kingston, NY) se dividieron en 3 grupos. Previamente se hizo un adenovirus que expresaba el polipéptido IL-TIF (SEQ ID NO: 8) usando procedimientos estándar. El día 0, se administró adenovirus parental o con IL-TIF al primer (n = 8) y segundo (n = 8) grupos, respectivamente, por la vena de la cola, recibiendo cada ratón una dosis de $\sim 1 \times 10^{11}$ partículas en 0,1 ml de volumen. El tercer grupo (n = 8) no recibió tratamiento. El día 12, los ratones se pesaron y se extrajo sangre de los ratones. Se analizó en las muestras el recuento sanguíneo completo (CBC) y la química del suero. Se detectaron en las muestra de sangre aumentos estadísticamente significativos de los recuentos de neutrófilos y plaquetas en las muestras de sangre del grupo al que se administró el adenovirus con IL-TIF con respecto al grupo tratado con el adenovirus parental. También, los recuentos de linfocitos y glóbulos rojos eran significativamente menores en el grupo al que se administró el adenovirus con IL-TIF con respecto al grupo tratado con el adenovirus parental. Además, los ratones tratados con el adenovirus con IL-TIF redujeron el peso corporal, mientras que los ratones tratados con el adenovirus parental ganaron peso. El nivel de SAA y globulina había aumentado y el nivel de glucosa había disminuido. Los ratones con adeno-zcyto18 presentaron síndrome de desgaste. En resumen, zcyto18 produce respuesta de fase aguda (APR) que refleja la actividad proinflamatoria de las citoquinas TNF- α , IL-1, y gp130.

[0154] Los resultados sugerían que el IL-TIF es un factor proinflamatorio que está implicado en la respuesta inmunitaria e inflamatoria in vivo. La distribución tisular del receptor de IL-TIF (zcytor11) indicaba que la expresión elevada del IL-TIF en la circulación o tejidos específicos puede conducir a determinadas enfermedades inflamatorias agudas/crónicas, tales como la pancreatitis, EII (enfermedad de Chron, colitis), asma, ESRD (enfermedad renal en etapa terminal), artritis reumatoide, psoriasis y enfermedades autoinmunitarias (GVHD, lupus, septicemia).

[0155] Los resultados sugerían que el IL-TIF afecta a la hematopoyesis, es decir, la formación de células sanguíneas in vivo. Como tal, el IL-TIF podría tener actividades biológicas que afectan a diferentes hemocitoblastos, dando como resultado el aumento o disminución de determinadas células sanguíneas diferenciadas en un linaje específico. Por ejemplo, parece que el IL-TIF reduce los linfocitos, lo cual se debe probablemente a la inhibición de las células progenitoras implicadas que dan lugar a células linfoides. El IL-TIF también disminuye los glóbulos rojos. Estos descubrimientos están de acuerdo con los efectos inhibidores del IL-TIF en la proliferación y/o el crecimiento de mielohemocitoblastos (Ejemplo 13), apoyando la idea de que el IL-TIF podría tener una función en la anemia, infección, inflamación y/o enfermedades inmunitarias al influir en las células sanguíneas implicadas en ese proceso. Los antagonistas contra el IL-TIF, tales como los anticuerpos o receptores solubles zcytor11 de la presente invención, se podrían usar como reactivos terapéuticos en estas enfermedades.

[0156] Además, estos experimentos que usan el adenovirus con IL-TIF en ratones sugieren que el exceso de expresión de IL-TIF aumenta el nivel de neutrófilos y plaquetas in vivo. Se puede imaginar que haya otros factores (tales como citoquinas y genes modificadores) implicados en las respuestas al IL-TIF en el sistema entero del animal. Sin embargo, estos datos apoyan firmemente la implicación del IL-TIF en la hematopoyesis. Por lo tanto, el IL-TIF y sus receptores son reactivos/dianas adecuados para el diagnóstico y tratamiento de una variedad de trastornos, tales como la inflamación, trastornos inmunitarios, infección, anemia, cánceres hematopoyéticos y otros cánceres, y similares.

Ejemplo 14

Identificación de células que expresan zcytor11 usando hibridación in situ

[0157] Se aislaron tejidos humanos específicos y se cribó la expresión de zcytor11 por hibridación in situ. Los diferentes tejidos humanos preparados, seccionados y sometidos a hibridación in situ, incluían apéndice, cerebro, cartílago, colon, intestino, riñón, hígado, pulmón, ganglios linfáticos, linfoma, ovario, páncreas, placenta, próstata, piel, bazo y timo. Los tejidos se fijaron en formalina tamponada al 10 % y se bloquearon en parafina usando técnicas estándar. Los tejidos se seccionaron en 4 a 8 micrómetros. Los tejidos se prepararon usando un protocolo estándar ("Development of non-isotopic in situ hybridization" at The Laboratory of Experimental Pathology (LEP), NIEHS, Research Triangle Park, NC; dirección web <http://dir.niehs.nih.gov/dirlep/ish.html>). Brevemente, las secciones de tejidos se desparafinaron con HistoClear (National Diagnostics, Atlanta, GA) y después se deshidrataron con etanol. Al día siguiente se digirieron con proteinasa K (50 µg/ml) (Boehringer Diagnostics, Indianapolis, IN) a 37°C durante 2 a 7 minutos. A esta etapa le siguió la acetilación y rehidratación de los tejidos.

[0158] Se diseñó una sonda in situ contra la secuencia de zcytor11 humano (nucleótidos 234-1105 en la SEQ ID NO: 1), y se aisló de un plásmido que contenía la SEQ ID NO: 1 usando procedimientos estándar. Se usó la ARN polimerasa T7 para generar una sonda de sentido contrario. La sonda se marcó con digoxigenina (Boehringer) usando un sistema de transcripción In vitro (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0159] La hibridación in situ se llevó a cabo con una sonda de zcytor11 marcado con digoxigenina (anterior). La sonda se añadió a los portaobjetos en una concentración de 1 a 5 pmol/ml durante 12 a 16 horas a 60 °C. Posteriormente los portaobjetos se lavaron en 2XSSC y 0,1XSSC a 55 °C. Las señales se amplificaron usando la amplificación de señal con tiramida (TSA) (TSA, kit indirecto in situ; NEN) y se visualizaron con el kit de sustrato Vector Red (Vector Lab) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

[0160] Se observaron señales en varios tejidos ensayados: los ganglios linfáticos que contienen células en la paracorteza de los folículos eran fuertemente positivos. En las muestras de linfoma, hay poca o no hay señal en las muestras ensayadas. En el bazo, se vieron señales positivas en células mononucleares dispersas en la periferia de folículos que eran positivas. En el timo, se vieron señales positivas en células mononucleares dispersas tanto en la corteza como en la médula que eran positivos. En el hígado fetal, se observó una señal fuerte en una población mixta de células mononucleares en espacios sinusoides. Algunas células mononucleares de la circulación también eran positivas. Los hepatocitos eran negativos. En el apéndice inflamado, las células mononucleares en las placas de Peyer y los sitios de infiltración eran positivos. En el intestino, las células en la lámina propia y placas de Peyer eran fuertemente positivas. Las células de los ganglios nerviosos en los músculos eran positivos. En el pulmón normal, zcytor11 era expresado en el epitelio alveolar y las células mononucleares en el tejido intersticial y la circulación. En el tejido del carcinoma de pulmón, se observaba una señal débil en las células de carcinoma y las células mononucleares en la periferia de los sitios de carcinoma. En el carcinoma de ovario, las células del epitelio eran fuertemente positivas. Algunas células intersticiales, con mayor probabilidad las células mononucleares, también eran positivas. No se observaba señal en el ovario normal. En el riñón, los podocitos y las células epiteliales simples en la capa parietal de la cápsula de Bowman en los corpúsculos renales eran positivos. Las células epiteliales cúbicas de los túbulos convolutos distales también eran positivos. En las muestras de páncreas tanto normales como con pancreatitis, las células acinares y algunas células mononucleares en el mesenterio eran positivas. También pude haber señal débil en un subconjunto de células en los islotes pancreáticos. En el primer periodo de la placenta (8 semanas), se observó señal en los trofoblastos. En la piel, se observó señal fuerte en los queratinocitos y células mononucleares en los infiltrados inflamados en la dermis superficial. En el cerebro, la mayoría de las neuronas en el lóbulo temporal eran positivas, sin embargo, el lóbulo frontal aparece negativo. En el cartílago articular, los condrocitos eran positivos. Otros tejidos ensayados incluyendo el ovario normal, melanoma de piel, carcinoma de próstata y BPH eran negativos.

[0161] En resumen, los datos in situ estaban de acuerdo con los datos de expresión descritos antes para zcytor11. Se observó la expresión de zcytor11 de forma predominante y consistente por una población mixta de células mononucleares. Un subconjunto del epitelio también era positivo. Estos resultados confirmaban la presencia de expresión de zcytor11 en células inmunitarias y señalaba una función en la inflamación, enfermedad autoinmunitaria, u otra función inmunitaria, por ejemplo, en la unión de citoquinas proinflamatorias, incluyendo, pero sin limitar, IL-TIF. Además, la detección de la expresión de zcytor11 se puede usar, por ejemplo, como marcador para células mononucleares en muestras histológicas.

[0162] Zcytor11 es expresado en células mononucleares, incluyendo tejidos normales (ganglios linfáticos, bazo, timo, páncreas, riñón, hígado y pulmón), y tejidos anormales (apéndice inflamado, carcinoma de pulmón, carcinoma de ovario, pancreatitis, piel inflamada y carcinoma de próstata). Es notable que las células plasmáticas en los ganglios linfáticos, intestino y carcinoma de pulmón son positivas para zcytor11. Las células plasmáticas son linfocitos inmunológicamente activados responsables de la síntesis de anticuerpos. Además IL-TIF es expresado en linfocitos T activados y la expresión de zcytor11 se detecta solo en células CD19 + en reposo (pero no en activadas) (Ejemplo 13). Por lo tanto, zcytor11 se puede usar como marcador o como diana para aislar determinados linfocitos, tales como leucocitos mononucleares y un tipo limitado de leucocitos activados, tales como CD19 + en reposo.

[0163] Además, la presencia de expresión de zcytor11 en células inmunitarias tales como linfocitos T CD8 + y linfocitos B CD19 + mostró que zcytor11 puede estar implicado en las reacciones de defensa inmunitarias del cuerpo contra invasores extraños: tales como microorganismos o restos celulares, y podría tener una función en las respuestas inmunitarias durante la inflamación y formación de cáncer. La activación del receptor zcytor11 puede producir enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias tales como GVHD, septicemia y lupus.

[0164] Además, como se describe en el presente documento, el epitelio de diferentes tejidos era positivo para la expresión de zcytor11, tales como la piel, riñón, intestino, hepatocitos (epitelios derivados del endodermo), epitelio alveolar pulmonar (epitelios derivados de endodermo) y epitelio de carcinoma de ovario (epitelio derivado de mesodermo). La respuesta inflamatoria en esos tejidos puede producir enfermedades inflamatorias agudas/crónicas, tales como psoriasis (piel), enfermedad renal en la etapa terminal ESRD (riñón), EII (enfermedad de Chron, colitis) (intestino), y asma/alergia respiratoria/bronquitis crónica (pulmón). La expresión en el epitelio de zcytor11 podría estar alterada en respuestas inflamatorias y/o cánceres en el hígado y el pulmón. Por lo tanto, el ligando para zcytor11, tal como el IL-TIF, o un fragmento del mismo de unión al receptor, se podría usar como marcador para seguir los cambios en estos tejidos como resultado de una inflamación o cáncer. Además, el análisis de la expresión de zcytor11 in situ muestra que el epitelio de ovario normal es negativo para la expresión de zcytor11, mientras que es fuertemente positivo en el epitelio del carcinoma de ovario, proporcionando pruebas adicionales de que los polipéptidos IL-TIF, o un fragmento de los mismos de unión al receptor, se pueden usar como un marcador de diagnóstico y/o diana terapéutica para el diagnóstico y el tratamiento de cánceres de ovario, y carcinoma de ovario, como se describe en el presente documento.

[0165] También se detectó zcytor11 en otros tejidos, tal como en células acinares en el páncreas (tejidos normal y pancreatitis), trofoblastos en placenta (derivados de ectodermo), condrocitos en cartílago (derivados de mesodermo), y células de los ganglios en el intestino (derivadas de ectodermo). Como tal, zcytor11 puede estar implicado en la diferenciación y/o funciones normales de las células correspondientes en estos órganos. Como tal, las potenciales utilidades de zcytor11 incluyen el mantenimiento del metabolismo normal y embarazo, formación ósea/homeostasis y función fisiológica del intestino, y similares. Además, la regulación positiva de IL-TIF puede causar potencialmente la respuesta inflamatoria en esos tejidos que conduce a determinadas enfermedades inflamatorias como la pancreatitis, artritis reumatoide, EII (colitis y enfermedad de Chron).

Ejemplo 15

Distribución tisular de zcytor11 humano en paneles de tejidos usando transferencia Northern y PCR

A. Distribución tisular de zcytor11 humano en paneles de tejidos usando la PCR

[0166] Se cribó en un panel de ADNc de tejidos humanos la expresión de zcytor11 usando la PCR. El panel se hizo en el propio laboratorio y contenía 94 ADNc Marathon y las muestras de ADNc de diferentes tejidos y líneas celulares humanas normales y cancerosas se muestran a continuación en la tabla 4. Además de la reacción de la PCR, el procedimiento usado fue como el mostrado en el ejemplo 12. Las reacciones de la PCR se ajustaron usando los oligonucleótidos ZC14.666 (SEQ ID NO: 11) y ZC14.742 (SEQ ID NO: 12), mezcla de ADNc polimerasas Advantage 2 (Clontech, Palo Alto, CA), y colorante Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). La amplificación se llevó a cabo como sigue: 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos, 40 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 51°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguido de 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. El tamaño de fragmento de ADN previsto correcto se observó en la vejiga, cerebro, cuello uterino, colon, cerebro fetal, corazón fetal, riñón fetal, hígado fetal, pulmón fetal, piel fetal, corazón, riñón, hígado, pulmón, melanoma, ovario, páncreas, placenta, próstata, recto, glándula salival, intestino delgado, testículos, timo, tráquea, medula espinal, tiroides, tumor pulmonar, tumor ovárico, tumor rectal, y tumor de estómago. La expresión de zcytor11 no se observó en otros tejidos y líneas celulares en este panel.

[0167] También se ensayó como antes un panel de la 1ª cadena del ADNc (Human Blood Fractions MTC Panel, Clontech, Palo Alto, CA). El panel contenía las siguientes muestras: células mononucleares, células mononucleares activadas, células CD4 + en reposo, células CD4 + activadas, células CD8 + en reposo, células CD8 + activadas, células CD14 + en reposo, células CD19 + en reposo y células CD19 + activadas. Todas las muestras excepto las de CD8 + activadas y CD19 + activadas mostraban expresión de zcytor11.

Tabla 4

Tejido	nº de muestras	Tejido	nº de muestras
glándula suprarrenal	1	vejiga	1
médula ósea	3	cerebro	2
cuello uterino	1	colon	1
cerebro fetal	3	corazón fetal	2
riñón fetal	1	hígado fetal	2
pulmón fetal	1	piel fetal	1
corazón	2	músculo fetal	1
riñón	2	hígado	1
pulmón	1	ganglios linfáticos	1
glándula mamaria	1	melanoma	1
ovario	1	páncreas	1
pituitaria	2	placenta	3
próstata	3	recto	1
glándula salival	2	músculo esquelético	1
intestino delgado	1	médula espinal	2
bazo	1	útero	1
estómago	1	biblioteca de adipocitos	1
testículos	5	islotes	1
timo	1	próstata SMC	1
tiroides	2	RPMI 1788	1
tráquea	1	WI37	1
tumor esofágico	1	tumor pulmonar	1
tumor hepático	1	tumor ovárico	1
tumor rectal	1	tumor estomacal	1
tumor uterino	2	biblioteca de CD3 +	1
biblioteca de HeCAT	1	biblioteca de HPV	1
biblioteca de HPVS	1	biblioteca de MG63	1
K562	1		

5 B. Distribución tisular de zcytor11 humano en paneles de tejidos y líneas celulares humanas usando la RT-PCR

[0168] Se cribó en un panel de ARN de líneas celulares humanas la expresión de zcytor11 usando la RT-PCR. Los paneles se hicieron en el propio laboratorio y contenían 84 ARN de diferentes tejidos y líneas celulares humanas normales y cancerosas como se muestra a continuación en las tablas 5-8. Los ARN se prepararon a partir de tejidos y líneas celulares del laboratorio o adquiridas usando el kit RNAeasy Midi o Mini (Qiagen, Valencia, CA). El panel se preparó en un formato de 96 pocillos con 100 ng de ARN por muestra. Las reacciones de la RT-PCR se llevaron a cabo usando los oligonucleótidos ZC14.666 (SEQ ID NO: 11) y ZC14.742 (SEQ ID NO: 12), colorante Rediload y el sistema SUPERScript One Step RT-PCR (Life Technologies, Gaithersburg, MD). La amplificación se llevó a cabo como sigue: un ciclo a 50° durante 30 minutos seguido de 45 ciclos a 94°, 15 segundos; 52°, 30 segundos; 72°, 30 segundos; y después se terminó con una extensión final a 72° durante 7 minutos. De 8 a 10 µl del producto de reacción de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa usando un gel de agarosa al 4 %. El tamaño de fragmento de ADNc previsto correcto se observó en la glándula suprarrenal, vejiga, mama, bronquio, colon normal, cáncer de colon, duodeno, endometrio, esófago, cáncer gástrico, cáncer gastroesofágico, ventrículo del corazón, íleo, riñón normal, cáncer renal, hígado, pulmón, ganglios linfáticos, páncreas, parótidas, piel, intestino delgado, estómago, tiroides, y útero. Las líneas celulares que mostraban expresión de zcytor11 eran A-431, CaCO2 diferenciadas, DLD-1, HBL-100, HCT-15, HepG2, HepG2 + IL6, HuH7, y NHEK nº1-4. No se observó expresión de zcytor11 en los otros tejidos y líneas celulares ensayados en este panel. El patrón de expresión de zcytor11 muestra expresión en tejidos específicos y tumores específicos de tejidos. Un experto en la materia reconocerá que los polinucleótidos, polipéptidos, anticuerpos y parejas de unión de la presente invención se pueden usar como un diagnóstico para detectar cáncer o tejido canceroso en una biopsia, tejido, o muestra histológica, en particular en tejidos en los que se expresa zcytor11. Dichos usos de diagnóstico para las moléculas de la presente invención se conocen en la materia y se describen en el presente documento.

[0169] Además, debido a que el patrón de expresión de zcytor11, uno de los receptores de IL-TIF, muestra expresión en determinados tejidos específicos, también se pueden usar parejas de unión incluyendo el ligando natural, IL-TIF, como diagnóstico para detectar tejidos específicos (normales o anormales), cáncer o tejido canceroso en una biopsia, tejido u otras muestras histológicas, en particular tejidos en los que se expresan los

receptores de IL-TIF. IL-TIF también se puede usar para localizar otros tejidos en los que se expresan sus receptores, p. ej., zcytor11 y CRF2-4. Además, dichas parejas de unión se podrían conjugar con agentes quimioterapéuticos, restos tóxicos y similares, para dirigir la terapia al sitio del tumor o tejido enfermo. Dicho diagnóstico y terapia dirigida se conocen en la materia y se describen en el presente documento.

5

[0170] Los patrones de expresión de zcytor11 (antes) indicaban tejidos diana y tipos de células para la acción del IL-TIF, y por lo tanto, antagonistas del IL-TIF, tal como los receptores zcytor11 solubles de la presente invención. El zcytor11 en general se expresa en tres sistemas fisiológicos: sistema digestivo, sistema reproductivo femenino, y sistema inmunitario. Además, el patrón de expresión del receptor (zcytor11) indicaba que un antagonista de IL-TIF de los receptores zcytor11 solubles de la presente invención tendría aplicación terapéutica para enfermedades humanas en dos áreas: la inflamación (p. ej., EII, enfermedad de Chron, pancreatitis) y cáncer (p. ej., ovario, colon). Es decir, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se pueden usar para antagonizar los efectos inflamatorios y otros efectos inducidos por citoquinas de la interacción de IL-TIF con células que expresan el receptor zcytor11.

15

[0171] Además, la expresión de zcytor11 aparecían con regulación negativa o ausente en un tejido de colitis ulcerativa, línea celular hepática HepG2 inducida por IL-6, linfocitos T CD8 + activados y linfocitos B CD19 + . Estos experimentos de RT-PCR demuestran que las células de sangre periférica CD19 + , linfocitos B, expresan receptores para IL-TIF, en concreto zcytor11. Los receptores zcytor11 solubles de la presente invención actuarían como un antagonista para neutralizar los efectos de IL-TIF en los linfocitos B. Esto sería beneficioso en enfermedades en las que los linfocitos B son los jugadores clave: enfermedades autoinmunitarias incluyendo lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia grave, enfermedad compleja inmunitaria, y cánceres de linfocitos B que son exacerbados por el IL-TIF. Las enfermedades autoinmunitarias en las que los linfocitos B contribuyen a la patología de la enfermedad serían dianas para la terapia con el receptor soluble zcytor11: esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y artritis reumatoide como ejemplos. La terapia con el receptor soluble zcytor11 sería beneficiosa para suprimir o inhibir linfocitos B que producen IgE en enfermedades atópicas incluyendo el asma, alergia y dermatitis atópica en la que la producción de IgE contribuye a la patogénesis de la enfermedad.

25

[0172] Los tumores malignos de linfocitos B pueden presentar una pérdida de regulación de citoquinas, tales como IL-TIF. La administración de los receptores zcytor11 solubles de la presente invención después de la extirpación quirúrgica o quimioterapia, pueden ser útiles para tratar la enfermedad residual mínima en pacientes con tumores malignos de linfocitos B. La pérdida de regulación puede conducir a mantener o aumentar la expresión de zcytoR11. Creando así una diana para los anticuerpos monoclonales terapéuticos dirigidos a zcytoR11 que comprenden receptores, tales como los descritos en el presente documento.

35

Tabla 5

Tejido	n° de muestras	Tejido	n° de muestras
glándula suprarrenal	6	duodeno	1
vejiga	3	endometrio	5
cerebro	2	endometrio canceroso	1
meningioma cerebral	1	cáncer gástrico	1
mama	1	esófago	7
mama canceroso	4	gastroesofágico	1
mama normal adyacente a cáncer	5	aorta del corazón	1
bronquio	3	ventrículo izquierdo del corazón	4
colon	15	ventrículo derecho del corazón	2
colon canceroso	1	ventrículo del corazón	1
colon normal adyacente a cáncer	1	íleo	3
colon colitis ulcerativa	1	riñón	15
		riñón canceroso	1

Tabla 6

Tejido	nº de muestras	Tejido	nº de muestras
293	1	HBL-100	1
C32	1	Hs-294T	1
HaCat 1	1	Molt4	1
HaCat 2	1	RPMI	1
HaCat 3	1	U-937	1
HaCat 4	1	A-375	1
WI-38	1	HCT-15	1
WI-38 + 2 um ionomicina 1	1	HT-29	1
WI-38 + 2 um ionomicina 2	1	MRC-5	1
WI-38 + 5 um ionomicina 1	1	RPT-1	1
WI-38 + 5 um ionomicina 2	1	RPT-2	1
Caco-2,	1	WM-115	1
Caco-2, diferenciadas	1	A-431	1
DLD-1	1	WERI-Rb-1	1
HRE	1	HEL-92.1.7	1
HRCE	1	HuH-7	1
MCF7	1	MV-4-11	1
PC-3	1	U-138	1
TF-1	1	CCRF-CEM	1
5637	1	Y-79	1
143B	1	A-549	1
ME-180	1	EL-4	1
epitelio prostático	1	HeLa 229	1
U-2 OS	1	HUT 78	1
T-47D	1	NCI-H69	1
Mg-63	1	SaOS2	1
Raji	1	USMC	1
U-373 MG	1	UASMC	
A-172	1	AoSMC	1
CRL-1964	1	UtSMC	1
CRL-1964 + ácido butírico	1	HepG2	1
HUVEC	1	HepG2- IL6	1
SK-Hep-1	1	NHEK L	1
SK-Lu-1	1	NHEK 2	1
Sk-MEL-2	1	NHEK 3	1
K562	1	NHEK 4	1
BeWo	1	ARPE-19	1
FHS74.Int	1	G-361	1
HL-60	1	HISM	1
Malme 3M	1	3AsubE	1
FHC	1	INT407	1
HREC	1		

Tabla 7

Tejido	nº de muestras	Tejido	nº de muestras
hígado	10	pulmón	13
ganglios linfáticos	1	pulmón canceroso	2
linfoma	4	pulmón normal adyacente a cáncer	1
adenoma mamario	1	músculo	3
glándula mamaria	3	neuroblastoma	1
melinorioma	1	epiplón	2
sarcoma osteogénico	2	ovario	6
páncreas	4	ovario canceroso	2
piel	5	parótida	7
sarcoma	2	glándula salival	4

5

Tabla 8

Tejido	nº de muestras	Tejido	nº de muestras
intestino delgado	10	útero	11
bazo	3	cáncer uterino	1
linfoma de bazo	1	tiroides	9
estómago	13		
cáncer estomacal	1		

C. Distribución tisular de zcytor11 en tejido Origene™ humano y paneles MTC de fracciones de sangre humana usando la RT-PCR

10

[0173] Se cribó en un panel de ARN de tejidos humanos, tejido humano Origene™ y paneles MTC de fracciones de sangre humana (Origene Technologies, Rockville, MD; and Clontech, Palo Alto, CA) la expresión de zcytor11 usando la RT-PCR. Los paneles contenía 24 ARN de diferentes tejidos humanos normales en concentraciones crecientes como se muestra en las siguientes tablas 9-10. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo usando los oligonucleótidos ZC37693 (SEQ ID NO: 31) y ZC37449 (SEQ ID NO: 32), usando el kit de PCR Advantage (Clontech). La amplificación se llevó a cabo como sigue: 1 ciclo a 94°C durante 2 min; 35 ciclos a 94°C durante 15 se, 72°C durante 1,5 min; después 72°C durante 2 min; seguido de mantenimiento a 4°C. De 8 a 10 µl de producto de reacción de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa estándar usando un gel de agarosa al 4 %.

20

[0174] Usando el panel Origene, como se muestra en la tabla 9, se observó el tamaño de fragmento de ADNc (440 pb) previsto correcto en todos los tejidos excepto de bazo, músculo, placenta, PBL, médula ósea y cerebro fetal. Sin embargo, había específicamente expresión alta en el intestino delgado, colon, riñón, piel, pulmón, páncreas e hígado. También se observó expresión débil de zcytor 11 en ovario, útero, próstata, cerebro, corazón, testículos, estómago y tiroides. No se observó expresión de zcytor11 en los otros tejidos y líneas celulares ensayadas en este panel. El patrón de expresión de zcytor11 muestra expresión en tejidos específicos. Un experto en la materia reconocerá que los polinucleótidos, polipéptidos, anticuerpos y parejas de unión de la presente invención se pueden usar como un diagnóstico para detectar tejidos, cáncer o tejido canceroso en una biopsia, tejido, o muestra histológica, en particular en tejidos en los que se expresa zcytor11. Dichos usos de diagnóstico para las moléculas de la presente invención se conocen en la materia y se describen en el presente documento.

30

[0175] Usando el panel MTC de fracciones de sangre humanas, como se muestra en la tabla 10, se observó el tamaño de fragmento de ADNc (440 pb) previsto correcto en células mononucleares, células CD8 + en reposo, células CD19 + en reposo y placenta. No se observó la expresión de zcytor11 en los otros tejidos y líneas celulares ensayadas en este panel, incluyendo las células CD8 + y CD19 + activadas. El patrón de expresión de zcytor11 muestra expresión en tejidos específicos. Un experto en la materia reconocerá que los polinucleótidos, polipéptidos, anticuerpos y parejas de unión de la presente invención se pueden usar como un diagnóstico para detectar tejidos, cáncer o tejido canceroso en una biopsia, tejido, o muestra histológica, en particular en tejidos en los que se expresa zcytor11. Dichos usos de diagnóstico para las moléculas de la presente invención se conocen en la materia y se describen en el presente documento.

40

Tabla 9

Tejido	1 pg ADNc	10 pg ADNc	100 pg ADNc	1 ng ADNc
Cerebro				X
Corazón				X
Riñón			X	X
Bazo				
Hígado			X	X
Colon			X	X
Pulmón			X	X
Intestino delgado		X	X	X
Músculo				
Estómago			X	X
Testículos	X		X	X
Placenta			X	
Glándula salival				X
Glándula tiroidea			X	X
Glándula suprarrenal			X	X
Páncreas	X	X	X	X
Ovario				X
Útero				X
Próstata				X
Piel			X	X
PBL				
Médula ósea				
Cerebro fetal				
Hígado fetal		X	X	X

5

Tabla 10

1 ng ADNc	Expresión
Células mononucleares	X
Células CD8 + en reposo	X
Células CD4 + en reposo	
Células CD14 + en reposo	
Células CD19 + en reposo	X
Células CD19 + activadas	
Células mononucleares activadas	
Células CD4 + activadas	
Células CD8 + activadas	
Placenta humana	X
Control sin patrón	
ADNc de zcytor11	X

D. Distribución tisular de zcytor11 en células inmunitarias primarias humanas y líneas celulares inmunitarias usando la RT-PCR

10

[0176] Se cribó la expresión de zcytor11 en un panel de ARN de poblaciones de células inmunitarias humanas primarias y líneas celulares inmunitarias humanas, usando la RT-PCR. Los paneles se hicieron en el laboratorio y contenían 24 ARN de diferentes poblaciones de células y líneas celulares en reposo y activadas como se muestra en la siguiente tabla 11. Todas las poblaciones de células inmunitarias primarias se aislaron de la sangre de varios donantes anónimos. Después se aislaron diferentes subconjuntos de células inmunitarias (CD4 + , CD8 + , CD14 + , CD19 + , y CD56 +) usando micropelotas y el sistema de separación celular magnético de Miltenyi Biotec. Los ARN se prepararon a partir de poblaciones de CD19 + y CD56 + en su estado de reposo usando un kit RNeasy Midiprep™ (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las poblaciones de CD4 + y CD8 + se activaron usando anticuerpo dirigido contra CD3 unido a placa 200 ng/ml y anticuerpo dirigido contra CD28 soluble 5 µg/ml y se recogieron las células para aislar el ARN a las 0, 4 y 16 h. Las muestras de CD19 + se aislaron de amígdala humana y se activaron con ionomicina 0,5 µg/ml y PMA 10 ng/ml. Después, se recogieron células a las 0, 4 h y 24 h y se aisló el ARN. Los monocitos CD14 + humanos se activaron con LPS 0,1 µg/ml o LPS 1,0 µg/ml

15

20

durante 20 h. Después se recogieron las células en reposo y activadas y se aisló el ARN. Además, se aisló el ARN de las líneas celulares de monocitos humanos en reposo y activados (LPS 10,0 µg/ml) HL-60, THP-1 y U937. También se ensayaron los ARN de Raji, Ramos, Daudi, y Jurkat en reposo.

- 5 **[0177]** Las reacciones de la RT-PCR usaron el sistema Superscript One-Step RT-PCR con Platinum Taq. Cada 25 µl de reacción consistían en lo siguiente: 12,5 µl de 2X tampón de reacción, 0,5 µl (20 pmol.µl) de ZC14.666 (SEQ ID NO: 11), 0,5 µl (20 pmol/ µl) de ZC14.742 (SEQ ID NO: 12), 0,4 µl de mezcla de RT/Taq polimerasa, 10 µl de RNasa exenta de agua, 1,0 µl de ARN molde (100 ng/µl). (Life Technologies, Gaithersburg, MD). La amplificación se llevó a cabo como sigue: 1 ciclo a 50° durante 30 minutos seguido de 35 ciclos a 94°, 30 segundos; 52°, 30 segundos; 72°, 60 segundos; después se terminó con una extensión final a 72° durante 7 minutos. De 8 a 10 µl de producto de reacción de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa estándar usando un gel de agarosa al 2 %. Se observó el tamaño de fragmento de ADNc previsto correcto en linfocitos B CD19 + en reposo y mucho menos en linfocitos B CD19 + activados, linfocitos T CD8 + en reposo, células NK CD56 + y monocitos CD14 + activados. Las líneas celulares que mostraban expresión de zcytor11 eran Jurkat, THP-1 activadas y HL-60 activadas. No se observó expresión de zcytor11 en los otros tejidos y líneas celulares en este panel. Estos resultados demuestran la expresión de zcytor11 en varias poblaciones de células inmunitarias y líneas celulares inmunitarias.

Tabla 11

20

Tejido	nº de muestras	Tejido	nº de muestras
CD19 + de CMSP en reposo	1	CD14 + LPS 0,1 µg/ml	1
CD19 + en reposo de amígdala	1	CD 14 + LPS 1,0 µg/ml	1
CD19 + de amígdala -- 4 h de activación	1	Raji	1
CD19 + de amígdala -16 h de activación	1	Ramos	1
CD4 + en reposo	1	Daudi	1
CD4 + 4 h de activación	1	Jurkat	1
CD4 + 16 h de activación	1	U937	1
CD8 + en reposo	1	U937 activadas	1
CD8 + 4 h de activación	1	THP-1	1
CD8 + 16 h de activación	1	THP-1 activadas	1
CD56 + en reposo	1	HL-60	1
CD14 + en reposo	1	HL-60 activadas	1

Ejemplo 16

- Construcción de células BaF3 que expresan el receptor CRF2-4 (células BaF3/CRF2-4) y células BaF3 que expresan el receptor CRF2-4 con el receptor zcytor11 (células BaF3/CRF2-4/zcytor11)

- 30 **[0178]** Se construyeron células BaF3 que expresaban el receptor CFR2-4 de longitud completa, usando 30 µg de un vector de expresión con CFR2-4, descrito a continuación. Las células BaF3 que expresaban el receptor CFR2-4 se designaron BaF3/CFR2-4. Estas células se usaron como control, y después se transfectoraron con el receptor zcytor11 de longitud completa (patente de EE.UU. n° 5.965.704) y se usaron para construir un cribado de la actividad de IL-TIF, como se describe a continuación.

A. Construcción de células BaF3 que expresan el receptor CRF2-4

- 35 **[0179]** La secuencia de ADNc de longitud completa de CRF2-4 (n° de acceso en Genbank Z17227) se aisló de una biblioteca de ADNc de la línea celular Daudi, y después se clonó en un vector de expresión pZP7P.

- 40 **[0180]** BaF3, una línea celular prelinfoide dependiente de interleuquina 3 (IL-3) se obtuvo de médula ósea murina (Palacios y Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot y col., *Mol. Cell. Biol.* 6: 4133-4135, 1986), se mantuvo en medio completo (medio RPMI (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) complementado con suero de ternero fetal inactivado con calor al 10 %, IL-3 murina (mIL-3) 2 ng/ml (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 CRF2-4/pZP7P y se purificó usando el kit Qiagen Maxi Prep (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la electroporación, las células BaF3 se lavaron una vez en medio RPMI exento de suero y después se volvieron a suspender en medio RPMI exento de suero con una densidad celular de 10⁷ células/ml. Se mezcló 1 ml de las células BaF3 resuspendidas con 30 µg del ADN plasmídico de CRF2-4/pZP7P y se transfirieron a cámaras de electroporación desechables separadas (GIBCO BRL). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se administró a las células dos choques en serie (800 IFad/300 V; 1180 IFad/300 V) suministrados con un

aparato de electroporación (CELL-PORATOR™; GIBCO BRL). Después de un tiempo de recuperación de 5 min, las células electroporadas se transfirieron a 50 ml de medio completo y se pusieron en un incubador durante 15-24 horas (37°C, CO₂ al 5 %). Después las células se centrifugaron y se volvieron a suspender en 50 ml de medio completo que contenía puomicina 2 µg/ml en un matraz T-162 para aislar la mezcla resistente a la puomicina. Se ensayó en las mezclas de las células BaF3 transfectadas, en lo sucesivo denominadas células BaF3/CRF2-4, la capacidad de señalización descrita a continuación. Además, estas células se transfectaron adicionalmente con el receptor zcytor11 como se describe a continuación.

B. Construcción de células BaF3 que expresan los receptores CRF2-4 y zcytor11

10 **[0181]** Se construyeron células BaF3/CRF2-4 que expresaban el receptor zcytor11 de longitud completa de acuerdo con el ejemplo 5A anterior, usando 30 µg de vector de expresión de zcytor11, descrito en el ejemplo 6 anterior. Después de la recuperación, los transfectantes se seleccionaron usando zeocina 200 µg/ml y puomicina 2 µg/ml. Las células BaF3/CRF2-4 que expresaban el receptor zcytor11 se designaron células BaF3/CRF2-4/zcytor11. 15 Esas células se usaron para cribar la actividad de IL-TIF así como la actividad antagonista descrita en el Ejemplo 17.

Ejemplo 17

20 Cribado de la actividad de CRF2-4-zcytor11-Fc usando células BaF3/CRF2-4/zcytor11 en un ensayo de proliferación de azul Alamar

[0182] Las células BaF3/CRF2-4/zcytor11 (Ejemplo 16) se centrifugaron y se lavaron en PBS 2 veces para asegurar la eliminación de la mL-3, y después se centrifugaron una tercera vez y se volvieron a suspender en medio completo (RPMI 1640, FBS al 10 %, GlutaMAX al 1 %, piruvato sódico al 1 %) descrito en el ejemplo 16 anterior, 25 pero sin mL-3 (en lo sucesivo denominado "medio exento de mL-3"). Después se contaron las células en un hemocitómetro. Las células se cultivaron en un formato de 96 pocillos con 5000 células por pocillo en un volumen de 50 µl por pocillo usando el medio exento de mL-3.

[0183] La proteína IL-TIF se diluyó hasta 200 pg/ml en medio exento de mL-3 y también en medio condicionado de CRF2-4/zcytor11 en una concentración de aproximadamente 0,4 µg/ml que se hizo a partir de células BHK transfectadas (Ejemplo 7). El CM de CRF2-4/zcytor11 se diluyó en el medio exento de mL-3/IL-TIF mediante diluciones seriadas 1: 2 hacia abajo en las 8 filas en la placa de 96 pocillos, dejando un volumen de 50 µl en cada pocillo. Después este se añadió a los 50 µl de células, para una concentración final de IL-TIF de 100 pg/ml en todos los pocillos, y concentraciones finales de CRF2-4/zcytor11-Fc de aproximadamente 200, 100, 50, 25, 12,5, 35 6,25, 3,1 y 1,6 ng/ml, y un volumen total de ensayo de 100 µl. Las placas de ensayo se incubaron a 37°C, CO₂ al 5 % durante 4 días, momento en el que se añadió azul Alamar (Accumed, Chicago, IL) con 20 µl/pocillo. Las placas se incubaron otra vez a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 horas. El azul Alamar da una lectura fluorométrica basada en el número de células vivas, y por lo tanto es una medición directa de la proliferación celular en comparación con un control negativo. Las placas se leyeron en un contador Wallac Victor 2 1420 Multilabel (Wallac, Turku, Finlandia) a 40 las longitudes de onda de 530 (excitación) y 590 (emisión). Los resultados confirmaron una inhibición dependiente de la dosis de CRF2-4/zcytor11-Fc del efecto proliferativo de IL-TIF en células BaF3/CRF2-4/zcytor11. El IL-TIF solo, estimulaba las células 30 veces frente al valor de fondo. CRF2-4/zcytor11-Fc inhibían completamente esta proliferación en concentraciones de 25-200 ng/ml, inhibían parcialmente la proliferación a 3,1-12,5 ng/ml, y la inhibición casi no se detectaba a 1,6 ng/ml. Se hizo la misma configuración con mL-TIF, y se generaron resultados 45 similares.

Ejemplo 18

50 Análisis por citometría de flujo de transfectantes BaF3 que expresan zcytor11 solo, CRF2-4 solo, zcytor11/CRF2-4 o zcytor11/pDIRS1

[0184] Se generaron células BaF3 transfectadas con zcytor11 solo, CRF2-4 solo, zcytor11/CRF2-4 o zcytor11/pDIRS1 con cada receptor de citoquinas respectivo, como se ha descrito (Ejemplo 16). Brevemente, se transfectaron 30 µg de zcytor11/pZP7Z en células BaF3 usando electroporación, y se seleccionaron los 55 transfectantes estables (BaF3/zcytor11) con zeocina 200 µg/ml. De forma similar las células BaF3 transfectadas con CRF2-4/pZP7P (BaF3/CRF2-4) se seleccionaron con puomicina 2 µg/ml. Posteriormente, se transfectaron 30 µg de CRF2-4/pZP7P en células BaF3/zcytor11 usando electroporación, y se seleccionó la línea celular estable (BaF3/zcytor11/CRF2-4) con zeocina 200 µg/ml y puomicina 2 µg/ml. Igualmente, se transfectaron 30 µg de pDIRS1/pZP7P en células BaF3/zcytor11 usando electroporación, y se seleccionó la línea celular estable 60 (BaF3/zcytor11/pDIRS1) con zeocina 200 µg/ml y puomicina 2 µg/ml. Los transfectantes BHK se generaron usando los mismos vectores de expresión zcytor11, CRF2-4, o pDIRS1 para los transfectantes BaF3. Se transfectó ADN en células BHK usando Lipofectamina™ (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante,

la selección empezó 48 h después de la transfección seguido del mismo protocolo para la selección de BaF3.

[0185] La biotilación de la proteína IL-TIF-CEE humana (Ejemplo 12) se hace como sigue: se añadieron 1,6 ul de Tween20 al 10 %, 50 ul de ácido bórico 1 M (pH 8,5), y 42 ul de EZ-unido a Sulfo-NHS-LC-biotina 0,9 mg/ml (Pierce, Rockford, IL) disuelto en DMSO a 100 ul de IL-TIF-CEE 2,2 mg/ml. Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, la reacción se inactivó con 10 ul de glicina 2 M durante 10 minutos.

[0186] Para ensayar las propiedades de unión del ligando IL-TIF a varios componentes de receptores potenciales, las células BaF3 y BHK se transfectaron con plásmidos de expresión que incluían zcytoR11 solo, CRF2-4 solo (nº de acceso en Genbank Z17227), zcytoR11 (SEQ ID NO: 1) y CRF2-4, o zcytoR11 y pDIRS1 (publicación WIPO WO99/46379, Schering Corporation, 1999), como se ha descrito antes. Se incluyeron células BaF3 y BHK no transfectadas como controles. Las células se volvieron a suspender en tampón de lavado de FACS (WB: PBS/BSA al 1 % complementado con UltraSerum humano al 3 % (Gemini BioProducts, Calabasas, CA)) se contaron y se dividieron en partes alícuotas 1×10^6 de cada tipo en tubos de poliestireno de 5 ml. Las células se lavaron y sedimentaron, después se incubaron durante 20 min en hielo con 100 µl de WB solo, o WB más proteína zcyto10 biotinilada 10 µg/ml o 1 µg/ml. Las células se lavaron con 1,5 ml de WB y se sedimentaron, y después se incubaron con 100 µl de estreptavidina conjugada con ficoeritrina 2,5 µg/ml (PE-SA, PharMingen, San Diego, CA) durante otros 20 min en hielo. Las células se volvieron a lavar como antes, se volvieron a suspender en 0,4 ml de WB y se analizaron en un FACScan usando el software CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

[0187] El biotina-IL-TIF se unió de una forma dependiente de la dosis a las 3 líneas celulares BaF3 transfectadas que contenían zcytor11 (es decir, transfectadas solo con zcytor11 o en combinación con CRF2-4 o DIRS 1), pero no a la línea parental o al transfectante BaF3 x CRF2-4. Se obtuvieron los mismos resultados con los correspondientes transfectantes de BHK

LISTA DE SECUENCIAS

[0188]

30 < 110 > ZymoGenetics, Inc.
 < 120 > RECEPTORES DE CITOQUINAS ZCYTOR11 SOLUBLES
 < 130 > P25267EP-D2-PCT-DRM/PJG
 < 140 > EP 06017328.3
 < 141 > 2001-08-08
 35 < 150 > US 60/223.827
 < 151 > 2000-08-08
 < 150 > US 60/250.876
 < 151 > 2000-12-01
 < 160 > 35
 40 < 170 > FastSEQ para Windows Versión 3.0
 < 210 > 1
 < 211 > 2831
 < 212 > ADN
 < 213 > Homo sapien
 45 < 220 >
 < 221 > CDS
 < 222 > (39)...(1755)
 < 400 > 1

ES 2 381 650 T3

tagaggccaa gggaggggctc tgtgccagcc ccg atg agg acg ctg ctg acc atc	54
Met Arg Thr Leu Leu Thr Ile	
1 5	
ttg act gtg gga tcc ctg gct gct cac gcc cct gag gac ccc tcg gat	102
Leu Thr Val Gly Ser Leu Ala Ala His Ala Pro Glu Asp Pro Ser Asp	
10 15 20	
ctg ctc cag cac gtg aaa ttc cag tcc agc aac ttt gaa aac atc ctg	150
Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu	
25 30 35	
acg tgg gac agc ggg cca gag ggc acc cca gac acg gtc tac agc atc	198
Thr Trp Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile	
40 45 50 55	
gag tat aag acg tac gga gag agg gac tgg gtg gca aag aag ggc tgt	246
Glu Tyr Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys	
60 65 70	
cag cgg atc acc cgg aag tcc tgc aac ctg acg gtg gag acg ggc aac	294
Gln Arg Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn	
75 80 85	

ES 2 381 650 T3

ctc acg gag ctc tac tat gcc agg gtc acc gct gtc agt gcg gga ggc Leu Thr Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly	342
90 95 100	
cgg tca gcc acc aag atg act gac agg ttc agc tct ctg cag cac act Arg Ser Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr	390
105 110 115	
acc ctc aag cca cct gat gtg acc tgt atc tcc aaa gtg aga tcg att Thr Leu Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile	438
120 125 130 135	
cag atg att gtt cat cct acc ccc acg cca atc cgt gca ggc gat ggc Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly	486
140 145 150	
cac cgg cta acc ctg gaa gac atc ttc cat gac ctg ttc tac cac tta His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu Phe Tyr His Leu	534
155 160 165	
gag ctc cag gtc aac cgc acc tac caa atg cac ctt gga ggg aag cag Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly Gly Lys Gln	582
170 175 180	
aga gaa tat gag ttc ttc ggc ctg acc cct gac aca gag ttc ctt ggc Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly	630
185 190 195	
acc atc atg att tgc gtt ccc acc tgg gcc aag gag agt gcc ccc tac Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr	678
200 205 210 215	
atg tgc cga gtg aag aca ctg cca gac cgg aca tgg acc tac tcc ttc Met Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr Tyr Ser Phe	726
220 225 230	
tcc gga gcc ttc ctg ttc tcc atg ggc ttc ctc gtc gca gta ctc tgc Ser Gly Ala Phe Leu Phe Ser Met Gly Phe Leu Val Ala Val Leu Cys	774
235 240 245	
tac ctg agc tac aga tat gtc acc aag ccg cct gca cct ccc aac tcc Tyr Leu Ser Tyr Arg Tyr Val Thr Lys Pro Pro Ala Pro Pro Asn Ser	822
250 255 260	
ctg aac gtc cag cga gtc ctg act ttc cag ccg ctg cgc ttc atc cag Leu Asn Val Gln Arg Val Leu Thr Phe Gln Pro Leu Arg Phe Ile Gln	870
265 270 275	
gag cac gtc ctg atc cct gtc ttt gac ctc agc ggc ccc agc agt ctg Glu His Val Leu Ile Pro Val Phe Asp Leu Ser Gly Pro Ser Ser Leu	918
280 285 290 295	
gcc cag cct gtc cag tac tcc cag atc agg gtg tct gga ccc agg gag Ala Gln Pro Val Gln Tyr Ser Gln Ile Arg Val Ser Gly Pro Arg Glu	966
300 305 310	
ccc gca gga gct cca cag cgg cat agc ctg tcc gag atc acc tac tta	1014

ES 2 381 650 T3

Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Gln	Arg	His	Ser	Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Tyr	Leu	
			315					320					325			
ggg	cag	cca	gac	atc	tcc	atc	ctc	cag	ccc	tcc	aac	gtg	cca	cct	ccc	1062
Gly	Gln	Pro	Asp	Ile	Ser	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Asn	Val	Pro	Pro	Pro	
		330					335					340				
cag	atc	ctc	tcc	cca	ctg	tcc	tat	gcc	cca	aac	gct	gcc	cct	gag	gtc	1110
Gln	Ile	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Tyr	Ala	Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Glu	Val	
	345					350					355					
ggg	ccc	cca	tcc	tat	gca	cct	cag	gtg	acc	ccc	gaa	gct	caa	ttc	cca	1158
Gly	Pro	Pro	Ser	Tyr	Ala	Pro	Gln	Val	Thr	Pro	Glu	Ala	Gln	Phe	Pro	
	360				365					370					375	
ttc	tac	gcc	cca	cag	gcc	atc	tct	aag	gtc	cag	cct	tcc	tcc	tat	gcc	1206
Phe	Tyr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ile	Ser	Lys	Val	Gln	Pro	Ser	Ser	Tyr	Ala	
				380					385					390		
cct	caa	gcc	act	ccg	gac	agc	tgg	cct	ccc	tcc	tat	ggg	gta	tgc	atg	1254
Pro	Gln	Ala	Thr	Pro	Asp	Ser	Trp	Pro	Pro	Ser	Tyr	Gly	Val	Cys	Met	
			395				400						405			
gaa	ggg	tct	ggc	aaa	gac	tcc	ccc	act	ggg	aca	ctt	tct	agt	cct	aaa	1302
Glu	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Lys	
		410					415					420				
cac	ctt	agg	cct	aaa	ggg	cag	ctt	cag	aaa	gag	cca	cca	gct	gga	agc	1350
His	Leu	Arg	Pro	Lys	Gly	Gln	Leu	Gln	Lys	Glu	Pro	Pro	Ala	Gly	Ser	
	425					430					435					
tgc	atg	tta	ggg	ggc	ctt	tct	ctg	cag	gag	gtg	acc	tcc	ttg	gct	atg	1398
Cys	Met	Leu	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Val	Thr	Ser	Leu	Ala	Met	
	440				445					450					455	
gag	gaa	tcc	caa	gaa	gca	aaa	tca	ttg	cac	cag	ccc	ctg	ggg	att	tgc	1446
Glu	Glu	Ser	Gln	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu	His	Gln	Pro	Leu	Gly	Ile	Cys	
				460					465					470		
aca	gac	aga	aca	tct	gac	cca	aat	gtg	cta	cac	agt	ggg	gag	gaa	ggg	1494
Thr	Asp	Arg	Thr	Ser	Asp	Pro	Asn	Val	Leu	His	Ser	Gly	Glu	Glu	Gly	
			475					480					485			
aca	cca	cag	tac	cta	aag	ggc	cag	ctc	ccc	ctc	ctc	tcc	tca	gtc	cag	1542
Thr	Pro	Gln	Tyr	Leu	Lys	Gly	Gln	Leu	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Val	Gln	
		490					495					500				
atc	gag	ggc	cac	ccc	atg	tcc	ctc	cct	ttg	caa	cct	cct	tcc	ggg	cca	1590
Ile	Glu	Gly	His	Pro	Met	Ser	Leu	Pro	Leu	Gln	Pro	Pro	Ser	Gly	Pro	
	505					510					515					
tgt	tcc	ccc	tcg	gac	caa	ggg	cca	agt	ccc	tgg	ggc	ctg	ctg	gag	tcc	1638
Cys	Ser	Pro	Ser	Asp	Gln	Gly	Pro	Ser	Pro	Trp	Gly	Leu	Leu	Glu	Ser	
	520				525					530					535	
ctt	gtg	tgt	ccc	aag	gat	gaa	gcc	aag	agc	cca	gcc	cct	gag	acc	tca	1686
Leu	Val	Cys	Pro	Lys	Asp	Glu	Ala	Lys	Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Thr	Ser	

540	545	550	
gac ctg gag cag ccc aca gaa ctg gat tct ctt ttc aga ggc ctg gcc			1734
Asp Leu Glu Gln Pro Thr Glu Leu Asp Ser Leu Phe Arg Gly Leu Ala 555 560 565			
ctg act gtg cag tgg gag tcc tgaggggaat gggaaaggct tgggtgcttcc Leu Thr Val Gln Trp Glu Ser 570			1785
tccctgtccc taccagtggt cacatccttg gctgtcaatc ccatgcctgc ccatgccaca cactctgcga tctggcctca gacgggtgcc cttgagagaa gcagaggag tggcatgcag ggcccctgcc atgggtgcgc tctcaccgg aacaaagcag catgataagg actgcagcgg gggagctctg gggagcagct tgtgtagaca agcgcgtgct cgctgagccc tgcaaggcag aaatgacagt gcaaggagga aatgcaggga aactcccag gtccagagcc ccacctccta acaccatgga ttcaaagtgc tcagggaatt tgccctctcct tgccccattc ctggccagtt tcacaatcta gctcgacaga gcatgaggcc cctgcctctt ctgtcattgt tcaaagggtgg gaagagagcc tggaaaagaa ccaggcctgg aaaagaacca gaaggaggct gggcagaacc agaacaacct gcacttctgc caaggccagg gccagcagga cggcaggact ctaggaggagg gtgtggcctg cagctcattc ccagccaggg caactgcctg acgttgacag atttcagctt cattcctctg atagaacaaa gcgaaatgca ggtccaccag ggaggagagac acacaagcct tttctgcagg caggagtttc agaccctatc ctgagaatgg ggtttgaaag gaagggtgagg gctgtggccc ctggacgggt acaataacac actgtactga tgtcacaact ttgcaagctc tgccttgggt tcagcccatc tgggctcaaa ttccagcctc accactcaca agctgtgtga cttcaaacaa atgaaatcag tgcccagaac ctgcggttcc tcatctgtaa tgtggggatc ataacaccta cctcatggag ttgtggtgaa gatgaaatga agtcatgtct ttaaagtgtc taatagtgcc tgggtacatgg gcagtgccta ataaacggta gctattttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa atagcggccg cctcga			1845 1905 1965 2025 2085 2145 2205 2265 2325 2385 2445 2505 2565 2625 2685 2745 2805 2831

< 210 > 2
 < 211 > 574
 5 < 212 > PRT
 < 213 > Homo sapien
 < 400 > 2

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

His	Asp	Leu	Phe	Tyr	His	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Asn	Arg	Thr	Tyr	Gln
				165					170					175	
Met	His	Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Tyr	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Thr
			180					185					190		
Pro	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Gly	Thr	Ile	Met	Ile	Cys	Val	Pro	Thr	Trp
		195					200					205			
Ala	Lys	Glu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Met	Cys	Arg	Val	Lys	Thr	Leu	Pro	Asp
	210					215					220				
Arg	Thr	Trp	Thr	Tyr	Ser	Phe	Ser	Gly	Ala	Phe	Leu	Phe	Ser	Met	Gly
225					230					235					240
Phe	Leu	Val	Ala	Val	Leu	Cys	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Val	Thr	Lys
				245					250					255	
Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Asn	Ser	Leu	Asn	Val	Gln	Arg	Val	Leu	Thr	Phe
			260					265					270		
Gln	Pro	Leu	Arg	Phe	Ile	Gln	Glu	His	Val	Leu	Ile	Pro	Val	Phe	Asp
		275					280					285			
Leu	Ser	Gly	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Gln	Pro	Val	Gln	Tyr	Ser	Gln	Ile
	290					295					300				
Arg	Val	Ser	Gly	Pro	Arg	Glu	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Gln	Arg	His	Ser
305					310					315					320
Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Tyr	Leu	Gly	Gln	Pro	Asp	Ile	Ser	Ile	Leu	Gln
				325					330					335	
Pro	Ser	Asn	Val	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Tyr	Ala
			340					345					350		
Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Glu	Val	Gly	Pro	Pro	Ser	Tyr	Ala	Pro	Gln	Val
		355					360					365			
Thr	Pro	Glu	Ala	Gln	Phe	Pro	Phe	Tyr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ile	Ser	Lys
	370					375					380				
Val	Gln	Pro	Ser	Ser	Tyr	Ala	Pro	Gln	Ala	Thr	Pro	Asp	Ser	Trp	Pro
385					390					395					400
Pro	Ser	Tyr	Gly	Val	Cys	Met	Glu	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Ser	Pro	Thr
				405					410					415	
Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Lys	His	Leu	Arg	Pro	Lys	Gly	Gln	Leu	Gln
			420					425					430		
Lys	Glu	Pro	Pro	Ala	Gly	Ser	Cys	Met	Leu	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln
		435					440					445			
Glu	Val	Thr	Ser	Leu	Ala	Met	Glu	Glu	Ser	Gln	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu
	450					455					460				
His	Gln	Pro	Leu	Gly	Ile	Cys	Thr	Asp	Arg	Thr	Ser	Asp	Pro	Asn	Val
465					470					475					480
Leu	His	Ser	Gly	Glu	Glu	Gly	Thr	Pro	Gln	Tyr	Leu	Lys	Gly	Gln	Leu
				485					490					495	
Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Val	Gln	Ile	Glu	Gly	His	Pro	Met	Ser	Leu	Pro
			500					505					510		
Leu	Gln	Pro	Pro	Ser	Gly	Pro	Cys	Ser	Pro	Ser	Asp	Gln	Gly	Pro	Ser
		515					520					525			
Pro	Trp	Gly	Leu	Leu	Glu	Ser	Leu	Val	Cys	Pro	Lys	Asp	Glu	Ala	Lys
	530					535					540				
Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Thr	Ser	Asp	Leu	Glu	Gln	Pro	Thr	Glu	Leu	Asp
545					550					555					560
Ser	Leu	Phe	Arg	Gly	Leu	Ala	Leu	Thr	Val	Gln	Trp	Glu	Ser		
				565					570						

< 210 > 3

< 211 > 211

5 < 212 > PRT

ES 2 381 650 T3

< 213 > Homo sapiens
< 400 > 3

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

Ser	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Gln	Met	Ile	Val	His	Pro	Thr	Pro	Thr	Pro
		115					120					125			
Ile	Arg	Ala	Gly	Asp	Gly	His	Arg	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Ile	Phe	His
	130					135					140				
Asp	Leu	Phe	Tyr	His	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Asn	Arg	Thr	Tyr	Gln	Met
145					150					155				160	
His	Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Tyr	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Thr	Pro
				165					170					175	
Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Gly	Thr	Ile	Met	Ile	Cys	Val	Pro	Thr	Trp	Ala
			180					185					190		
Lys	Glu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Met	Cys	Arg	Val	Lys	Thr	Leu	Pro	Asp	Arg
		195					200					205			
Thr	Trp	Thr													
		210													

5

< 210 > 4
< 211 > 6
< 212 > PRT
< 213 > Secuencia artificial
10 < 220 >
< 223 > marcador peptídico Glu-Glu
< 400 > 4

Glu	Tyr	Met	Pro	Met	Glu
1				5	

15

< 210 > 5
< 211 > 8
< 212 > PRT
< 213 > Secuencia artificial
20 < 220 >
< 223 > péptido marcado con Flag
< 400 > 5

ES 2 381 650 T3

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

< 210 > 6
 < 211 > 699
 5 < 212 > ADN
 < 213 > Homo sapiens
 < 400 > 6

gagcccagat	cttcagacaa	aactcacaca	tgcccaccgt	gcccagcacc	tgaagccgag	60
ggggcaccgt	cagtcttcct	cttcccccca	aaacccaagg	acaccctcat	gatctcccgg	120
acccttgagg	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	180
aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	240
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaat	300
ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc	catcctccat	cgagaaaacc	360
atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagaa	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccgg	420
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc	480
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	540
cccgtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca	agctcaccgt	ggacaagagc	600
aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	660
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaataa			699

10 < 210 > 7
 < 211 > 1116
 < 212 > ADN
 < 213 > homo sapiens
 15 < 220 >
 < 221 > CDS
 < 222 > (21)...(557)
 < 400 > 7

tcgagttaga attgtctgca atg gcc gcc ctg cag aaa tct gtg agc tct ttc	53
Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe	
1 5 10	
ctt atg ggg acc ctg gcc acc agc tgc ctc ctt ctc ttg gcc ctc ttg	101
Leu Met Gly Thr Leu Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu	
15 20 25	
gta cag gga gga gca gct gcg ccc atc agc tcc cac tgc agg ctt gac	149
Val Gln Gly Gly Ala Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp	
30 35 40	
aag tcc aac ttc cag cag ccc tat atc acc aac cgc acc ttc atg ctg	197
Lys Ser Asn Phe Gln Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu	
45 50 55	
gct aag gag gct agc ttg gct gat aac aac aca gac gtt cgt ctc att	245
Ala Lys Glu Ala Ser Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile	
60 65 70 75	
ggg gag aaa ctg ttc cac gga gtc agt atg agt gag cgc tgc tat ctg	293
Gly Glu Lys Leu Phe His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu	
80 85 90	
atg aag cag gtg ctg aac ttc acc ctt gaa gaa gtg ctg ttc cct caa	341
Met Lys Gln Val Leu Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln	

ES 2 381 650 T3

95	100	105	
tct gat agg ttc cag cct tat atg cag gag gtg gtg ccc ttc ctg gcc			389
Ser Asp Arg Phe Gln Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala			
110	115	120	
agg ctc agc aac agg cta agc aca tgt cat att gaa ggt gat gac ctg			437
Arg Leu Ser Asn Arg Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu			
125	130	135	
cat atc cag agg aat gtg caa aag ctg aag gac aca gtg aaa aag ctt			485
His Ile Gln Arg Asn Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu			
140	145	150	155
gga gag agt gga gag atc aaa gca att gga gaa ctg gat ttg ctg ttt			533
Gly Glu Ser Gly Glu Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe			
160	165	170	
atg tct ctg aga aat gcc tgc att tgaccagagc aaagctgaaa aatgaataac			587
Met Ser Leu Arg Asn Ala Cys Ile			
175			
taacccccctt tccctgctag aaataacaat tagatgcccc aaagcgattt tttttaacca			647
aaaggaagat gggaagccaa actccatcat gatgggtgga ttccaaatga acccctgcgt			707
tagttacaaa ggaaaccaat gccacttttg ttataagac cagaaggtag actttctaag			767
catagatatt tattgataac atttcattgt aactggtgtt ctatacacag aaaacaattt			827
atTTTTTaaa taattgtctt tttccataaa aaagattact ttccattcct ttaggggaaa			887
aaacccctaa atagcttcat gtttccataa tcagtacttt atatttataa atgtatttat			947
tattattata agactgcatt ttattttatat cattttatta atatggattt atttatagaa			1007
acatcattcg atattgctac ttgagtgtaa ggctaataatt gatatttatg acaataatta			1067
tagagctata acatgtttat ttgacctcaa taaacacttg gatatccta			1116

- < 210 > 8
 5 < 211 > 179
 < 212 > PRT
 < 213 > homo sapiens
 < 400 > 8

ES 2 381 650 T3

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

145					150					155					160
Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn
				165					170					175	
Ala	Cys	Ile													

< 210 > 9
 < 211 > 36
 5 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC28590
 < 400 > 9

10 ttgggtacct ctgcaatggc cgccctgcag aaatct 36

< 210 > 10
 < 211 > 33
 15 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC28580
 < 400 > 10

20 ttgggatcca atgcaggcat ttctcagaga cat 33

< 210 > 11
 < 211 > 18
 25 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC14666
 < 400 > 11

30

agccaccaag atgactga 18

< 210 > 12
 < 211 > 22
 5 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC14742
 < 400 > 12

10 tgcatttggg aggtgcgggt ga 22

< 210 > 13
 < 211 > 6
 15 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > marcador His
 < 400 > 13

20

His His His His His His
 1 5

< 210 > 14
 < 211 > 63
 25 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC29239
 < 400 > 14

30 gaggccggat ccggttcggg ttcgggttcg gagccagat catcagacaa aactcacaca 60
 tgc 63

< 210 > 15
 < 211 > 65
 35 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC29232
 < 400 > 15

40 cgactgactc gagtcagtga tggatgatgt gatggccacc tgatccttta ccgggagaca 60
 gggag 65

< 210 > 16
 < 211 > 37
 45 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC39319
 < 400 > 16

50 atcggaattc gcagaagcca tggcgtggag ccttggg 37

< 210 > 17
 < 211 > 28
 55 < 212 > ADN

< 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC39325
 < 400 > 17

5 cagtggatcc ggaggggacc gtttcgtc 28

< 210 > 18
 < 211 > 660
 10 < 212 > ADN
 < 213 > Homo sapiens
 < 220 >
 < 221 > CDS
 < 222 > (1)...(660)
 15 < 400 > 18

atg gcg tgg agt ctt ggg agc tgg ctg ggt ggc tgc ctg ctg gtg tca	48
Met Ala Trp Ser Leu Gly Ser Trp Leu Gly Gly Cys Leu Leu Val Ser	
1 5 10 15	
gca ttg gga atg gta cca cct ccc gaa aat gtc aga atg aat tct gtt	96
Ala Leu Gly Met Val Pro Pro Pro Glu Asn Val Arg Met Asn Ser Val	
20 25 30	
aat ttc aag aac att cta cag tgg gag tca cct gct ttt gcc aaa ggg	144
Asn Phe Lys Asn Ile Leu Gln Trp Glu Ser Pro Ala Phe Ala Lys Gly	
35 40 45	
aac ctg act ttc aca gct cag tac cta agt tat agg ata ttc caa gat	192
Asn Leu Thr Phe Thr Ala Gln Tyr Leu Ser Tyr Arg Ile Phe Gln Asp	
50 55 60	
aaa tgc atg aat act acc ttg acg gaa tgt gat ttc tca agt ctt tcc	240
Lys Cys Met Asn Thr Thr Leu Thr Glu Cys Asp Phe Ser Ser Leu Ser	
65 70 75 80	
aag tat ggt gac cac acc ttg aga gtc agg gct gaa ttt gca gat gag	288
Lys Tyr Gly Asp His Thr Leu Arg Val Arg Ala Glu Phe Ala Asp Glu	
85 90 95	
cat tca gac tgg gta aac atc acc ttc tgt cct gtg gat gac acc att	336
His Ser Asp Trp Val Asn Ile Thr Phe Cys Pro Val Asp Asp Thr Ile	
100 105 110	
att gga ccc cct gga atg caa gta gaa gta ctt gat gat tct tta cat	384
Ile Gly Pro Pro Gly Met Gln Val Glu Val Leu Asp Asp Ser Leu His	
115 120 125	
atg cgt ttc tta gcc cct aaa att gag aat gaa tac gaa act tgg act	432
Met Arg Phe Leu Ala Pro Lys Ile Glu Asn Glu Tyr Glu Thr Trp Thr	
130 135 140	
atg aag aat gtg tat aac tca tgg act tat aat gtg caa tac tgg aaa	480
Met Lys Asn Val Tyr Asn Ser Trp Thr Tyr Asn Val Gln Tyr Trp Lys	
145 150 155 160	
aac ggt act gat gaa aag ttt caa att act ccc cag tat gac ttt gag	528
Asn Gly Thr Asp Glu Lys Phe Gln Ile Thr Pro Gln Tyr Asp Phe Glu	
165 170 175	
gtc ctc aga aac ctg gag cca tgg aca act tat tgt gtt caa gtt cga	576
Val Leu Arg Asn Leu Glu Pro Trp Thr Thr Tyr Cys Val Gln Val Arg	
180 185 190	
ggg ttt ctt cct gat cgg aac aaa gct ggg gaa tgg agt gag cct gtc	624
Gly Phe Leu Pro Asp Arg Asn Lys Ala Gly Glu Trp Ser Glu Pro Val	
195 200 205	
tgt gag caa aca acc cat gac gaa acg gtc ccc tcc	660
Cys Glu Gln Thr Thr His Asp Glu Thr Val Pro Ser	

- < 210 > 19
 < 211 > 220
 < 212 > PRT
 5 < 213 > Homo sapiens
 < 400 > 19

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

His	Ser	Asp	Trp	Val	Asn	Ile	Thr	Phe	Cys	Pro	Val	Asp	Asp	Thr	Ile
			100					105					110		
Ile	Gly	Pro	Pro	Gly	Met	Gln	Val	Glu	Val	Leu	Asp	Asp	Ser	Leu	His
		115					120					125			
Met	Arg	Phe	Leu	Ala	Pro	Lys	Ile	Glu	Asn	Glu	Tyr	Glu	Thr	Trp	Thr
	130					135					140				
Met	Lys	Asn	Val	Tyr	Asn	Ser	Trp	Thr	Tyr	Asn	Val	Gln	Tyr	Trp	Lys
145					150					155					160
Asn	Gly	Thr	Asp	Glu	Lys	Phe	Gln	Ile	Thr	Pro	Gln	Tyr	Asp	Phe	Glu
				165					170					175	
Val	Leu	Arg	Asn	Leu	Glu	Pro	Trp	Thr	Thr	Tyr	Cys	Val	Gln	Val	Arg
			180					185					190		
Gly	Phe	Leu	Pro	Asp	Arg	Asn	Lys	Ala	Gly	Glu	Trp	Ser	Glu	Pro	Val
		195				200						205			
Cys	Glu	Gln	Thr	Thr	His	Asp	Glu	Thr	Val	Pro	Ser				
	210					215					220				

- 10 < 210 > 20
 < 211 > 18
 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 15 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC38931
 < 400 > 20

acaaagccgc gggaggag 18

- 20 < 210 > 21
 < 211 > 82
 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 25 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC39042
 < 400 > 21

ctgactcgag	tcaagtgatgg	tgatgggtgat	ggccacctga	tccggaacca	cgcggaacca	60
gtttaccccg	agacagggag	ag				82

- < 210 > 22
 < 211 > 1428
 < 212 > ADN
 5 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 221 > CDS
 < 222 > (1)...(1928)
 < 223 > dominio extracelular de unión a citoquinas de CRF2-4 fusionado con IgGg1 con un marcador 6-HIS
 10 < 400 > 22

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

aac ggt act gat gaa aag ttt caa att act ccc cag tat gac ttt gag	528
Asn Gly Thr Asp Glu Lys Phe Gln Ile Thr Pro Gln Tyr Asp Phe Glu	
165 170 175	
gtc ctc aga aac ctg gag cca tgg aca act tat tgt gtt caa gtt cga	576
Val Leu Arg Asn Leu Glu Pro Trp Thr Thr Tyr Cys Val Gln Val Arg	
180 185 190	
ggg ttt ctt cct gat cgg aac aaa gct ggg gaa tgg agt gag cct gtc	624
Gly Phe Leu Pro Asp Arg Asn Lys Ala Gly Glu Trp Ser Glu Pro Val	
195 200 205	
tgt gag caa aca acc cat gac gaa acg gtc ccc tcc gga tcc ggt tcg	672
Cys Glu Gln Thr Thr His Asp Glu Thr Val Pro Ser Gly Ser Gly Ser	
210 215 220	
ggg tgc ggt tcg gag ccc aga tca tca gac aaa act cac aca tgc cca	720
Gly Ser Gly Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro	
225 230 235 240	
ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc	768
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe	
245 250 255	
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc ccg acc cct gag gtc	816
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	
260 265 270	
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc	864
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	
275 280 285	
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg	912
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	
290 295 300	
ccg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc	960
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	
305 310 315 320	
gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc	1008
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	
325 330 335	
tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc	1056
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	
340 345 350	
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg	1104
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	
355 360 365	
gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc	1152
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	
370 375 380	

ES 2 381 650 T3

ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg	1200
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	
385 390 395 400	
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc	1248
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	
405 410 415	
ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag	1296
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	
420 425 430	
ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac	1344
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	
435 440 445	
tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa ctg gtt ccg cgt	1392
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Leu Val Pro Arg	
450 455 460	
ggt tcc gga tca ggt ggc cat cac cat cac cat cac	1428
Gly Ser Gly Ser Gly Gly His His His His His His	
465 470 475	

- < 210 > 23
- < 211 > 476
- 5 < 212 > PRT
- < 213 > Homo sapiens
- < 400 > 23

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

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

< 210 > 24
 < 211 > 63
 5 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC29328
 < 400 > 24

10

tcagagggat ccggttcggg ttcgggttcg gagcccagat catcagacaa aactcacaca	60
tgc	63

< 210 > 25
 < 211 > 65
 15 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC29231
 < 400 > 25

cgactgactc gagctactcc ataggcatat actcgccacc tgatccttta cccggagaca 60
gggag 65

- < 210 > 26
5 < 211 > 70
< 212 > ADN
< 213 > Secuencia artificial
< 220 >
< 223 > Cebador oligonucleótido ZC39335
10 < 400 > 26

atcggaattc gcagaagcca tgaggacgct gctgaccatc ttgactgtgg ggtccctggc 60
tgctcacgcc 70

- < 210 > 27
15 < 211 > 26
< 212 > ADN
< 213 > Secuencia artificial
< 220 >
< 223 > Cebador oligonucleótido ZC28981
20 < 400 > 27

ttgggctcc ctgagctctg gtggaa 26

- < 210 > 28
25 < 211 > 80
< 212 > ADN
< 213 > Secuencia artificial
< 220 >
< 223 > Cebador oligonucleótido ZC39043
30 < 400 > 28

ctgactcgag ctactccata ggcataatact cgccacctga tccggaacca cgcggaacca 60
gtttacccgg agacagggag 80

- < 210 > 29
35 < 211 > 1452
< 212 > ADN
< 213 > Secuencia artificial
< 220 >
< 223 > dominio extracelular de unión a citoquinas de hzcytor11 fusionado con IgGg1 con un marcador Glu-Glu
40 < 221 > CDS
< 222 > (1)...(1452)
< 400 > 29

atg agg acg ctg ctg acc atc ttg act gtg gga tcc ctg gct gct cac 48
Met Arg Thr Leu Leu Thr Ile Leu Thr Val Gly Ser Leu Ala Ala His
1 5 10 15

45

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

ES 2 381 650 T3

Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu		
				245					250					255			
ggg	gca	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	816	
Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
			260					265					270				
atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	864	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		
		275					280						285				
cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	912	
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu		
	290					295					300						
gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	960	
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr		
305					310					315					320		
tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	1008	
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn		
				325					330					335			
ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	tcc	tcc	1056	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser		
			340					345					350				
atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	1104	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
		355					360					365					
gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	1152	
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
	370					375					380						
agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	1200	
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val		
385					390					395					400		
gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	1248	
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro		
				405					410					415			
ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	1296	
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr		
			420					425					430				
gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	1344	
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val		
		435					440					445					
atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	1392	
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu		
	450					455					460						

ES 2 381 650 T3

[illegible]

5 < 210 > 30
 < 211 > 484
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial
 < 400 > 30

Met	Arg	Thr	Leu	Leu	Thr	Ile	Leu	Thr	Val	Gly	Ser	Leu	Ala	Ala	His
1				5					10					15	
Ala	Pro	Glu	Asp	Pro	Ser	Asp	Leu	Leu	Gln	His	Val	Lys	Phe	Gln	Ser
			20					25					30		
Ser	Asn	Phe	Glu	Asn	Ile	Leu	Thr	Trp	Asp	Ser	Gly	Pro	Glu	Gly	Thr
	35					40					45				
Pro	Asp	Thr	Val	Tyr	Ser	Ile	Glu	Tyr	Lys	Thr	Tyr	Gly	Glu	Arg	Asp
	50					55					60				
Trp	Val	Ala	Lys	Lys	Gly	Cys	Gln	Arg	Ile	Thr	Arg	Lys	Ser	Cys	Asn
65					70					75					80
Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Gly	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Val
				85					90					95	
Thr	Ala	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Ser	Ala	Thr	Lys	Met	Thr	Asp	Arg
			100					105					110		
Phe	Ser	Ser	Leu	Gln	His	Thr	Thr	Leu	Lys	Pro	Pro	Asp	Val	Thr	Cys
		115					120					125			
Ile	Ser	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Gln	Met	Ile	Val	His	Pro	Thr	Pro	Thr
	130					135					140				
Pro	Ile	Arg	Ala	Gly	Asp	Gly	His	Arg	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Ile	Phe
145					150					155					160
His	Asp	Leu	Phe	Tyr	His	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Asn	Arg	Thr	Tyr	Gln
				165					170					175	
Met	His	Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Tyr	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Thr
			180					185					190		
Pro	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Gly	Thr	Ile	Met	Ile	Cys	Val	Pro	Thr	Trp
		195					200					205			
Ala	Lys	Glu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Met	Cys	Arg	Val	Lys	Thr	Leu	Pro	Asp
	210					215					220				
Arg	Thr	Trp	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Glu	Pro	Arg	Ser
225					230						235				240
Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu
				245					250					255	
Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
			260				265						270		
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
		275					280					285			
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
	290					295					300				
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
				310						315					320
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
				325					330					335	

Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser		
			340					345					350				
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
		355					360					365					
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
	370					375					380						
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val		
385					390					395					400		
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro		
				405					410					415			
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr		
			420					425					430				
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val		
	435					440					445						
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu		
	450				455						460						
Ser	Pro	Gly	Lys	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Glu	Tyr		
465					470					475					480		
Met	Pro	Met	Glu														

< 210 > 31
 < 211 > 22
 5 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC37693
 < 400 > 31

10 cccagacac ggtctacagc at 22

< 210 > 32
 < 211 > 23
 15 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador oligonucleótido ZC37449
 < 400 > 32

20 gggtcaggcc gaagaactca tat 23

< 210 > 33
 < 211 > 199
 25 < 212 > PRT
 < 213 > Homo sapiens
 < 400 > 33

ES 2 381 650 T3

Met	Val	Pro	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Arg	Met	Asn	Ser	Val	Asn	Phe	Lys
1				5					10					15	
Asn	Ile	Leu	Gln	Trp	Glu	Ser	Pro	Ala	Phe	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Thr
		20						25					30		
Phe	Thr	Ala	Gln	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Arg	Ile	Phe	Gln	Asp	Lys	Cys	Met
		35					40					45			
Asn	Thr	Thr	Leu	Thr	Glu	Cys	Asp	Phe	Ser	Ser	Leu	Ser	Lys	Tyr	Gly
	50					55					60				
Asp	His	Thr	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Glu	Phe	Ala	Asp	Glu	His	Ser	Asp

65					70				75					80	
Trp	Val	Asn	Ile	Thr	Phe	Cys	Pro	Val	Asp	Asp	Thr	Ile	Ile	Gly	Pro
				85					90					95	
Pro	Gly	Met	Gln	Val	Glu	Val	Leu	Ala	Asp	Ser	Leu	His	Met	Arg	Phe
			100					105					110		
Leu	Ala	Pro	Lys	Ile	Glu	Asn	Glu	Tyr	Glu	Thr	Trp	Thr	Met	Lys	Asn
		115					120					125			
Val	Tyr	Asn	Ser	Trp	Thr	Tyr	Asn	Val	Gln	Tyr	Trp	Lys	Asn	Gly	Thr
	130					135					140				

Asp	Glu	Lys	Phe	Gln	Ile	Thr	Pro	Gln	Tyr	Asp	Phe	Glu	Val	Leu	Arg
145					150					155					160
Asn	Leu	Glu	Pro	Trp	Thr	Thr	Tyr	Cys	Val	Gln	Val	Arg	Gly	Phe	Leu
				165					170					175	
Pro	Asp	Arg	Asn	Lys	Ala	Gly	Glu	Trp	Ser	Glu	Pro	Val	Cys	Glu	Gln
			180					185					190		
Thr	Thr	His	Asp	Glu	Thr	Val									
		195													

- < 210 > 34
- < 211 > 211
- 5 < 212 > PRT
- < 213 > Homo sapiens
- < 400 > 34

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

Thr	Arg	Gln
	210	

- < 210 > 35
- < 211 > 201
- 5 < 212 > PRT
- < 213 > Homo sapiens
- < 400 > 35

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

REIVINDICACIONES

1. Uso de un antagonista de la actividad de IL-TIF para fabricar un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria o inmunitaria en un mamífero, en el que dicho antagonista es un anticuerpo que se une específicamente a un complejo heterodímero de receptores que tiene una primera subunidad de receptor que consiste en un polipéptido zcytoR11 como se muestra en la SEQ ID NO: 3 y una segunda subunidad de receptor que consiste en un receptor CRF2-4 soluble; en el que dicha enfermedad se selecciona de la artritis reumatoide, psoriasis y enfermedad atópica.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad atópica es el asma.
3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
4. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo intacto o fragmento de anticuerpo genéticamente modificado.
- 15 5. El uso de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo intacto o fragmento de anticuerpo genéticamente modificado se selecciona de un anticuerpo quimérico, un fragmento Fv y un anticuerpo de una cadena.
- 20 6. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
7. Un antagonista de la actividad de IL-TIF para usar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o inmunitaria en un mamífero, en el que dicho antagonista es un anticuerpo que se une específicamente a un complejo heterodímero de receptores que tiene una primera subunidad de receptor que consiste en un polipéptido zcytoR11 como se muestra en la SEQ ID NO: 3 y una segunda subunidad de receptor que consiste en un receptor CRF2-4 soluble; en el que dicha enfermedad se selecciona de la artritis reumatoide, psoriasis y enfermedad atópica.
- 25 8. Un antagonista para usar según la reivindicación 7, en el que la enfermedad atópica es el asma.
- 30 9. Un antagonista para usar según la reivindicación 7 u 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
10. Un antagonista para usar según la reivindicación 7 u 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo intacto o fragmento de anticuerpo genéticamente modificado.
- 35 11. Un antagonista para usar según la reivindicación 10, en el que el anticuerpo intacto o fragmento de anticuerpo genéticamente modificado se selecciona de un anticuerpo quimérico, un fragmento Fv y un anticuerpo de una cadena.
- 40 12. Un antagonista para usar de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.