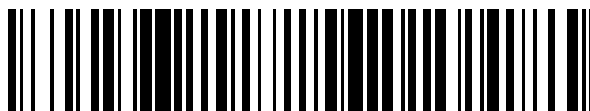


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 209**

51 Int. Cl.:

C07K 14/555 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2004 E 10173335 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 2251353**

54 Título: **Preparaciones homogéneas de IL-29**

30 Prioridad:

07.08.2003 US 493194 P

10.03.2004 US 551841 P

02.04.2004 US 559142 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2013

73 Titular/es:

ZYMOGENETICS, INC. (50.0%)

1201 Eastlake Avenue East

Seattle, WA 98102, US y

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (50.0%)

72 Inventor/es:

BRADY, LOWELL J.;

KLUCHER, KEVIN M.;

CHAN, CHUNG;

DONG, DENNIS L.;

LIU, HONG Y.;

SHEPPARD, PAUL O. y

BUKOWSKI, THOMAS R.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 405 209 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparaciones homogéneas de IL-29

Antecedentes de la invención

Las citocinas desempeñan importantes funciones en la regulación de la hematopoyesis y respuestas inmunitarias y pueden influir en el desarrollo de linfocitos. La familia de las citocinas de clase II humana incluye los subtipos interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), interferón γ (IFN- γ), IL-10, IL-19 (Patente de Estados Unidos 5.985.614), MDA-7 (Jiang y col., *Oncogene* 11, 2477-2486, (1995)), IL-20 (Jiang y col., *Oncogene* 11, 2477-2486, (1995)), IL-22 (Xie y col., *J. Biol. Chem.* 275, 31335-31339, (2000)) y AK-155 (Knappe y col., *J. Virol.* 74, 3881-3887, (2000)). La mayoría de las citocinas se unen y transducen señales a través de cualquiera de los receptores de citocinas de Clase I o Clase II. Los miembros de la familia de receptores de citocinas de clase II humana incluyen interferón- α R1 (IFN- α R1), interferón- γ R2 (IFN- γ R2), interferón- γ R1 (IFN- γ R1), interferón- γ R2 (IFN- γ R2), IL-10R (Liu y col., *J. Immunol.* 152, 1821-1829, (1994)), CRF2-4 (Lutfalla y col. *Genomics* 16, 366-373, (1993)), IL-20R β (Blumberg y col., *Cell* 104, 9-19, (2001)) (también, conocido como zcytor7 (Patente de Estados Unidos 5.945.511) y CRF2-8 (Kotenko y col., *Oncogene* 19, 2557-2565, (2000)), IL-20R β (Blumberg y col., *ibid.*, (2001)) (también, conocido como DIRS1 (documento PCT WO 99/46379)), IL-22RA1 (receptor- α 1 de IL-22, presentado al HUGO para su aprobación) (conocido también como IL-22R (Xie y col., *J. Biol. Chem.* 275, 31335-31339, (2000)), zcytor11 (Patente de Estados Unidos 5.965.704) y CRF2-9 (Kotenko y col., *Oncogene* 19, 2557-2565, (2000)) y factor tisular.

Los receptores de citocinas de clase II son típicamente heterodímeros compuestos por dos cadenas de receptores distintas, las subunidades de receptor α y β (Stahl y col., *Cell* 74, 587-590, (1993)). En general, las subunidades α son las proteínas de unión a citocinas primarias y las subunidades β se requieren para la formación de sitios de unión de alta afinidad, así como para la transducción de señales. Una excepción es el receptor IL-20 en el que ambas subunidades son necesarias para la unión de IL-20 (Blumberg y col., *ibid.*, (2001)).

Los receptores de citocina de clase II se identifican por un dominio de unión a citocina conservado de aproximadamente 200 aminoácidos (D200) en la parte extracelular del receptor. Este dominio de unión a citocina está comprendido por dos dominios de fibronectina de tipo III (FnIII), cada uno con 100 aminoácidos aproximadamente (Bazan J.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6934-6938, (1990); Thoreau y col., *FEBS Lett.* 282, 16-31, (1991)). Cada dominio FnIII contiene restos de Cys, Pro y Trp conservados que determinan un patrón de plegamiento característico de siete cadenas β similares a las del dominio constante de las inmunoglobulinas (Uze y col., *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 3-26, (1995)). Los elementos estructurales conservados de la familia de receptores de citocinas de clase II hacen posible identificar nuevos miembros de esta familia en base a la homología de secuencias de aminoácidos primarios.

Las interleucinas son una familia de citocinas que median respuestas inmunológicas, incluyendo inflamación. Fundamental para una respuesta inmunitaria es el linfocito T, que produce muchas citocinas y que tiene inmunidad adaptativa contra antígenos. Las citocinas producidas por el linfocito T se han clasificado como de tipo 1 y tipo 2 (Kelso, A. *Immun. Cell Biol.* 76: 300-317, 1998). Las citocinas de tipo 1 incluyen IL-2, interferón-gamma (IFN- γ), LT- α y están implicadas en respuestas inflamatorias, inmunidad viral, inmunidad parasitaria intracelular y rechazo de aloinjerto. Las citocinas de Tipo 2 incluyen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y están implicadas en respuestas humores, inmunidad helmíntica y respuestas alérgicas. Las citocinas compartidas entre el Tipo 1 y 2 incluyen IL-3, GM-CSF y TNF- α . Existen algunas pruebas que sugieren que las poblaciones de linfocitos T que producen citocinas de Tipo 1 y Tipo 2 migran preferencialmente al interior de diferentes tipos de tejido inflamado.

De particular interés, desde un punto de vista terapéutico, son los interferones (se proporcionan revisiones de interferones en De Maeyer y De Maeyer-Guignard, "Interferons," in *The Cytokine Handbook*, 3ª Edición, Thompson (ed.), páginas 491-516 (Academic Press Ltd. 1998), y Walsh, *Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology*, páginas 158-188 (John Wiley & Sons 1998)). Los interferones presentan diversas actividades biológicas y son útiles para el tratamiento de determinadas enfermedades autoinmunes, particularmente cánceres y para la mejora de la respuesta inmunitaria contra agentes infecciosos, incluyendo virus, bacterias, hongos y protozoos. Hasta ahora se han identificado seis formas de interferón, que se han clasificado en dos grupos principales. Los IFN denominados de "tipo I" incluyen IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- δ e interferón- τ . Actualmente, el IFN- γ y una subclase de IFN- α son los únicos IFN de tipo II.

Los IFN de tipo I, que se piensa que derivan del mismo gen ancestral, han conservado una estructura similar que es suficiente para actuar mediante el mismo receptor de superficie celular. La cadena α del receptor IFN- α/β humano comprende un dominio extracelular N terminal, que tiene las características de un receptor de citocina de clase II. El IFN- γ no comparte homología significativa con el IFN de tipo I o con el subtipo IFN- α de tipo II, pero comparte diversas actividades biológicas con el IFN de tipo I.

Los médicos aprovechan las múltiples actividades de los interferones usando las proteínas para tratar una amplia diversidad de afecciones. Por ejemplo, se ha autorizado una forma de IFN- α para su uso en más de 50 países para el tratamiento de afecciones médicas tales como leucemia de células pilosas, carcinoma de células renales, carcinoma de células basales, melanoma maligno, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, mieloma múltiple,

leucemia mielógena crónica, linfoma no Hodgkin, papilomatosis laríngea, micosis fungoide, condiloma acuminado, hepatitis crónica B, hepatitis C, hepatitis crónica D y hepatitis crónica no A, no B/C. La Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos ha autorizado el uso del IFN- β para tratar esclerosis múltiple, una enfermedad crónica del sistema nervioso. El IFN- γ se usa para tratar enfermedades granulomatosas crónicas, en las que el interferón potencia la respuesta inmunitaria del paciente destruyendo bacterias, hongos y protozoos patógenos infecciosos. Los estudios clínicos también indican que el IFN- γ puede ser útil en el tratamiento del SIDA, leishmaniasis y lepra lepromatosa.

Las proteínas IL-28A, IL-28B e IL-29 comprenden una nueva familia de proteínas descubierta recientemente que tiene homología de secuencia con los interferones de tipo I y homología genómica con IL-10. Esta nueva familia se describe completamente en la solicitud PCT del mismo propietario que la presente WO 02/086087 y Sheppard y col., Nature Immunol. 4: 63-68, 2003. Funcionalmente, IL-28 e IL-29 se parecen a los IFN de tipo I en cuanto a su capacidad de inducir un estado antiviral en las células pero, a diferencia de los IFN de tipo I, no presentan actividad antiproliferativa contra determinadas líneas de linfocitos B.

Se sabe que IL-28 e IL-29 tienen un número impar de cisteínas (solicitud PCT WO 02/086087 y Sheppard y col., citado anteriormente). La expresión de IL-28 e IL-29 recombinante puede dar como resultado una mezcla heterogénea de proteínas compuestas por enlaces disulfuro intramoleculares en conformaciones múltiples. La separación de estas formas puede ser difícil y laboriosa. Por lo tanto es deseable proporcionar moléculas de IL-28 e IL-29 que tengan un patrón de enlace disulfuro intramolecular sencillo tras la expresión y procedimientos para el repliegamiento y purificación de estas preparaciones para conservar la homogeneidad. Por tanto, la presente memoria descriptiva describe composiciones y procedimientos para producir preparaciones homogéneas de IL-28 e IL-29.

El documento WO 02/086087 describe una familia de proteínas de citocina.

Sheppard P. y col., Nature Immunology, Vol. 4(1), enero de 2003, páginas 63-68, describe IL-28, IL-29 y su receptor IL-28R de citocina de clase II.

Rajaratnam K. y col., Biochemistry, Vol. 38(24), 15 de junio 1999, páginas 7653-7658, describen puentes disulfuro en IL-8 investigando usando análogos disulfuro no naturales: Disociación de funciones en estructura a partir de función.

Francis G. E. y col., International Journal of Hematology, Vol. 68(1), 1998, páginas 1-18, describen la pegilación de citocinas y otras proteínas y péptidos terapéuticos: La importancia de la optimización biológica de reacciones de acoplamiento.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En la siguiente descripción, se utilizan en gran medida diversos términos. Para facilitar el entendimiento de la invención se proporcionan las siguientes definiciones.

Salvo que se especifique de otra manera, “un”, “una”, “el”, “la” y “al menos uno (una)” se usan indistintamente y significan uno (a) o más de uno (a).

La expresión “etiqueta de afinidad” se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que puede unirse a un segundo polipéptido para proporcionar la purificación o la detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para la unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, cualquier péptido o proteína para el que un antibiótico u otro agente de unión específico se encuentra disponible puede usarse como una etiqueta de afinidad. Las etiquetas de afinidad incluyen un tracto de polihistidina, proteína A (Nilsson y col., EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson y col., Methods Enzymol. 198: 3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31, 1988), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952-4, 1985), sustancia P, péptido Flag™ (Hopp y col., Biotechnology 6: 1204-10, 1988), péptido de unión a estreptavidina 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 etiquetas de afinidad se encuentran disponibles a partir de proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

La expresión “variante alélica” se usa en el presente documento para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica se produce naturalmente a través de mutaciones y pueden dar como resultado polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos alteradas. La expresión variante alélica también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

Las expresiones “amino terminal” y “carboxilo terminal” se usan en el presente documento para indicar posiciones en los polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estas expresiones se usan con referencia a una secuencia o parte

particular de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia en posición carboxilo terminal con respecto a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido se localiza próxima al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

- 5 La expresión “par complementario/anticomplementario” significa restos no idénticos que forman un par estable no asociado covalentemente en condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par complementario/anticomplementario. Otros pares complementarios/anticomplementarios ejemplares incluyen los pares receptor/ligando, pares anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótido en sentido/antisentido y similares. Cuando se desea la disociación posterior del par complementario/anticomplementario, dicho par tiene preferentemente una afinidad de unión de $<10^9 \text{ M}^{-1}$.

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

- 15 La expresión “vector de expresión” se usa para indicar una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés unido operativamente a segmentos adicionales que 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 de selección, un potenciador, una señal de poliadenilación, etc. Generalmente los vectores de expresión derivan de ADN plasmídico o viral o pueden contener elementos de ambos.

- 20 El término “aislado”, cuando se aplica a un polinucleótido, significa que el polinucleótido se ha extraído de su medio genético natural y por tanto carece de otras secuencias codificantes no deseadas o ajenas, y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas modificadas por ingeniería genética. Dichas moléculas aisladas son aquellas que están separadas de su entorno natural e incluyen clones genómicos y ADNc. Las moléculas de ADN de la presente invención carecen de otros genes con los que normalmente están asociadas, pero puede incluir regiones 5' y 3' no traducidas de origen natural tales como regiones promotoras y terminadoras. La identificación de regiones asociadas será obvia para un experto habitual en la técnica (véase por ejemplo Dynan y Tijan, Nature 316: 774-78, 1985).

- 25 Un polipéptido o una proteína “aislada (o)” es un polipéptido o una proteína que se encuentra en un estado distinto al de su entorno natural, tal como separado del tejido animal y de la sangre. En una forma preferida, el polipéptido aislado es carece sustancialmente de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal. Se prefiere proporcionar los polipéptidos en una forma muy purificada, es decir una pureza mayor del 95%, más preferentemente mayor del 99%. Cuando se usa en este contexto, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros, o como alternativa, formas glucosiladas o derivatizadas.

El término “nivel” cuando se hace referencia a células inmunitarias, se refiere a células tales como células NK, linfocitos T, en particular linfocitos T citotóxicos, linfocitos B y similares, un nivel aumentado es cualquier número de células aumento o una actividad potenciada de la función celular.

- 40 El término “nivel” cuando se hace referencia a infecciones virales se refiere a un cambio en un nivel de infección viral e incluye, pero sin limitación, un cambio en el nivel de los CTL o células NK (como se ha descrito anteriormente), una disminución en la carga viral, un aumento en la titulación de anticuerpos antivirales, disminución de niveles serológicos de alanina aminotransferasa o una mejora según se determine mediante examen histológico de un tejido u órgano diana. La determinación de si estos cambios de nivel son diferencias o cambios significativos se incluye en la experiencia de un experto en la materia.

La expresión “unidos operativamente”, cuando se hace referencia a segmentos de ADN, significa que los segmentos se disponen de tal manera que actúan en concierto para sus propósitos deseados, por ejemplo iniciar la transcripción en el promotor y avanzar a través del segmento codificante hacia el terminador.

- 50 La expresión “ortólogo” significa un polipéptido o una proteína que se obtiene a partir de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la especiación.

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

- 55 Un “polinucleótido” es un polímero mono o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas desde el extremo 5' a extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ADN y ARN y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los

polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviado "pb"), nucleótidos ("nt"), o kilobases ("kb"). Cuando el contexto lo permite, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que sean monocatenarios o bicatenarios. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, este se usa para indicar longitud completa y se entenderá que es equivalente a la expresión "pares de bases". Un experto en la materia reconocerá que dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden ser ligeramente diferentes en cuanto a su longitud y que sus extremos pueden escalonarse como resultado de escisión enzimática; por tanto puede ocurrir que no todos los nucleótidos dentro de una molécula polinucleotídica bicatenaria estén emparejados.

Un "polipéptido" es un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producidos de manera tanto natural como sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos se denominan normalmente "péptidos".

El término "promotor" se usa en el presente documento por su significado reconocido en la técnica para indicar una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que 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.

Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también comprende componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. La célula en la que se produce la proteína puede añadir a la misma carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos y esto variará con el tipo de célula. En el presente documento las proteínas se definen en cuanto a sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; generalmente sustituyentes tales como grupos carbohidrato no están generalmente especificados, aunque no obstante pueden estar presentes.

El término "receptor" significa una proteína asociada a una célula que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores unidos a membrana se caracterizan por una estructura multi-peptídica que comprende un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio efector intracelular que típicamente está implicado en la transducción de señal. La unión del ligando al receptor da como resultado un cambio conformacional en el receptor que produce una interacción entre el dominio efector y la otra molécula (o moléculas) en la célula. Esta interacción a su vez conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los sucesos metabólicos que están relacionados con las interacciones receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos inositol e hidrólisis de fosfolípidos. En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser citosólicos o nucleares; monoméricos (por ejemplo, el receptor de la hormona estimuladora tiroidea, el receptor beta adrenérgico) o multimérico (por ejemplo, el receptor del PDGF, el receptor de la hormona del crecimiento, el receptor de IL-3, el receptor de GM-CSF, el receptor de G-CSF, el receptor de eritropoyetina y el receptor de IL-6).

La expresión "secuencia de señal secretora" significa una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como un componente de un polipéptido más grande, dirige el polipéptido más grande a través de una ruta secretora de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido más grande normalmente se escinde para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

En el presente documento la expresión "variante de corte y empalme" se usa para indicar formas alternativas de ARN transcrito a partir de un gen. La variación de corte y empalme se origina naturalmente a través del uso de sitios de corte y empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita, o menos habitualmente entre moléculas de ARN transcritas individualmente y puede dar como resultado diversos ARNm transcritos a partir del mismo gen. Las variantes de corte y empalme pueden codificar polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos alterada. 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.

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

"zcyto20", "zcyto21", "zcyto22" son las denominaciones anteriores de IL-28A humana, IL-29 humana e IL-28B humana, respectivamente. Las secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de IL-28A se muestran en la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de IL-29 se muestran en las SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 4, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de IL-28B se muestran en las SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6, respectivamente. Estas secuencias se describen por completo en la solicitud PCT WO 02/086087 de cesión común a ZymoGenetics, Inc.

"zcyto24" y "zcyto25" son las denominaciones anteriores de IL-28 de ratón y se muestran en la SEC ID N°: 7, 8, 9, 10, respectivamente. Los polinucleótidos y polipéptidos se describen por completo en la solicitud PCT WO 02/086087 de cesión común a ZymoGenetics, Inc.

"zcytor19" es la denominación anterior de la subunidad α del receptor de IL-28, y se muestra en la SEC ID N°: 11. Los polinucleótidos y polipéptidos se describen en la solicitud PCT WO 02/20569 en representación de Schering,

Inc., y WO 02/44209 cedida a ZymoGenetics, Inc. "Receptor de IL-28" indica la subunidad α y la subunidad CRF2-4 de IL-28 formando un receptor heterodimérico.

La presente memoria descriptiva describe moléculas polinucleotídicas, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican mutantes de Cisteína de IL-28 e IL-29 que dan como resultado la expresión de una preparación de IL-28 e IL-29 recombinante que es una preparación homogénea. Para los fines de la presente invención, una preparación homogénea de IL-28 e IL-29 es una preparación que comprende al menos el 98% de un patrón sencillo de unión disulfuro intramolecular en el polipéptido purificado. En otras realizaciones, la conformación sencilla disulfuro en una preparación de polipéptido purificado tiene una homogeneidad del 99%. En general, como se describe en el presente documento, estos mutantes de Cisteína conservarán alguna actividad biológica de IL-28 o IL-29 natural. Por ejemplo, las moléculas de la presente invención pueden unirse al receptor de IL-28 con alguna especificidad. Generalmente, una unión del ligando con su receptor afín es específica cuando el valor de K_D se encuentra dentro del intervalo de 100 nM a 100 pM. La unión específica en el intervalo de 100 mM a 10 nM para K_D es una unión de afinidad baja. La unión específica en el intervalo de 2,5 pM a 100 pM para K_D es una unión de afinidad alta. En otro ejemplo, la actividad biológica de los mutantes de Cisteína de IL-28 o IL-29 está presente cuando las moléculas pueden tener algún nivel de actividad antiviral asociado con IL-28 o IL-29 natural. La determinación del nivel de actividad antiviral se describe con detalle en el presente documento.

Cuando se hace referencia a la IL-28, el término deberá significar tanto IL-28A como IL-28B. Anteriormente a la IL-28A se la denominaba zcyto20 (SEC ID Nos: 1 y 2), a la IL-29 se la denominaba zcyto21 (SEC ID Nos: 3 y 4) y a la IL-28B se la denominaba zcyto22 (SEC ID Nos: 5 y 6). (Véase la solicitud PCT WO 02/086087 y Sheppard y col., citado anteriormente). Anteriormente a los ortólogos de ratón de la IL-28 se les denominaba zcyto24 (SEC ID Nos: 7 y 8) y zcyto25 (SEC ID Nos: 9 y 10).

Como se muestra en la SEC ID N°: 2, el gen de IL-28A natural codifica un polipéptido de 200 aminoácidos. Puede preverse que la secuencia de señal de la IL-28A comprenda el resto de aminoácido -25 (Met) hasta el resto de aminoácido -1 (Ala) de la SEC ID N°: 2. El péptido maduro de la IL-28A comienza en el resto de aminoácido 1 (Val) de la SEC ID N°: 2. Se prevé que las hélices de IL-28A sean las siguientes: hélice A definida por los restos de aminoácido 31 (Ala) a 45 (Leu); hélice B definida por los restos de aminoácido 58 (Thr) a 65 (Gln); hélice C definida por los restos de aminoácido 69 (Arg) a 86 (Ala); hélice D definida por los restos de aminoácido 95 (Val) a 114 (Ala); hélice E definida por los restos de aminoácido 126 (Thr) a 142 (Lys); y hélice F definida por los restos de aminoácido 148 (Cys) a 169 (Ala); como se muestra en la SEC ID N°: 2.

Como se muestra en la SEC ID N°: 4, el gen de IL-29 natural codifica un polipéptido de 200 aminoácidos. Puede preverse que la secuencia de señal de IL-29 comprenda el resto de aminoácido -19 (Met) hasta el resto de aminoácido -1 (Ala) de la SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 119 o SEC ID N°: 121. El péptido maduro de IL-29 comienza en el resto de aminoácido 1 (Gly) de la SEC ID N°: 4. IL-29 se ha descrito en la solicitud PCT WO 02/02627. Como se muestra en la SEC ID N°: 4, se prevé que las hélices de IL-29 sean de la siguiente manera: la hélice A se define por los restos de aminoácidos 30 (Ser) a 44 (Leu); la hélice B se define por los restos de aminoácidos 57 (Asn) a 65 (Val); la hélice C por los restos de aminoácidos 70 (Val) a 85 (Ala); la hélice D por los restos de aminoácidos 92 (Glu) a 111 (Gln); la hélice E por los restos de aminoácidos 118 (Thr) a 139 (Lys); y la hélice F por los restos de aminoácidos 144 (Gly) a 170 (Leu).

Como se muestra en la SEC ID N°: 6, el gen IL-28B natural codifica un polipéptido de 200 aminoácidos. Puede preverse que la secuencia de señal de IL-28B comprenda el resto de aminoácido -21 (Met) al resto de aminoácido -1 (Ala) de la SEC ID N°: 6. El péptido maduro de IL-28B comienza en el resto de aminoácido 1 (Val) de la SEC ID N°: 6. Como se muestra en la SEC ID N°: 6, se prevé que las hélices de IL-28B sean de la siguiente manera: la hélice A se define por los restos de aminoácidos 31 (Ala) a 45 (Leu); la hélice B se define por los restos de aminoácidos 58 (Thr) a 65 (Gln); la hélice C por los restos de aminoácidos 69 (Arg) a 86 (Ala); la hélice D por los restos de aminoácidos 95 (Gly) a 114 (Ala); la hélice E por los restos de aminoácidos 126 (Thr) a 142 (Lys); y la hélice F por los restos de aminoácidos 148 (Cys) a 169 (Ala).

Como se muestra en las SEC ID Nos: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, la presente memoria descriptiva describe mutaciones en las secuencias naturales de IL-28 e IL-29, que dan como resultado la expresión de formas sencillas de la molécula IL-28 o IL-29. Dado que se cree que la heterogeneidad de las formas es un resultado de patrones de unión disulfuro intramolecular múltiples, la presente memoria descriptiva describen mutaciones en los restos de cisteína dentro de las secuencias de IL-28 e IL-29 natural. Cuando IL-28 e IL-29 se expresan en *E. coli*, existe una Metionina N-terminal o amino-terminal. Por ejemplo, las SEC ID Nos: 12-17, muestran la numeración de nucleótidos y de restos de aminoácidos de IL-28A, IL-29 e IL-28B cuando existe la Met N-terminal. La Tabla 1 muestra las posibles combinaciones de pares de cisteínas unidas formando enlaces disulfuro intramoleculares de IL-28A, IL-28B e IL-29 naturales.

Tabla 1

IL-28A SEC ID N°: 2	C ₁₆ -C ₁₁₅	C ₄₈ -C ₁₄₈	C ₅₀ -C ₁₄₈	C ₁₆₇ -C ₁₇₄	C ₁₆ -C ₄₈	C ₁₆ -C ₅₀	C ₄₈ -C ₁₁₅	C ₅₀ -C ₁₁₅	C ₁₁₅ -C ₁₄₈
Met IL-28A SEC ID N°: 13	C ₁₇ -C ₁₁₆	C ₄₉ -C ₁₄₉	C ₅₁ -C ₁₄₉	C ₁₆₈ -C ₁₇₄	C ₁₇ -C ₄₉	C ₁₇ -C ₅₁	C ₄₉ -C ₁₁₆	C ₅₁ -C ₁₁₆	C ₁₁₆ -C ₁₄₉
IL-29 SEC ID N°: 4	C ₁₅ -C ₁₁₂	C ₄₉ -C ₁₄₅	C ₁₁₂ -C ₁₇₁						
Met IL-29 SEC ID N°: 15	C ₁₆ -C ₁₁₃	C ₅₀ -C ₁₄₆	C ₁₁₃ -C ₁₇₂						
IL-28B SEC ID N°: 6	C ₁₆ -C ₁₁₅	C ₄₈ -C ₁₄₈	C ₅₀ -C ₁₄₈	C ₁₆₇ -C ₁₇₄	C ₁₆ -C ₄₈	C ₁₆ -C ₅₀	C ₄₈ -C ₁₁₅	C ₅₀ -C ₁₁₅	C ₁₁₅ -C ₁₄₈
Met IL-28B SEC ID N°: 17	C ₁₇ -C ₁₁₆	C ₁₄₉	C ₅₁ -C ₁₄₉	C ₁₆₈ -C ₁₇₅	C ₁₇ -C ₄₉	C ₁₇ -C ₅₁	C ₄₉ -C ₁₁₆	C ₅₁ -C ₁₁₆	C ₁₁₆ -C ₁₄₉

Las moléculas polinucleotídicas y polipeptídicas descritas en el presente documento tienen una mutación en una o más de las Cisteínas presentes en las moléculas de IL-28A, IL-29 o IL-28B naturales, conservando aún alguna actividad biológica, como se describe en el presente documento. La Tabla 2 ilustra mutantes de Cisteína ejemplares, en particular mutaciones puntuales de Cisteína (C) a serina (S).

5

Tabla 2

IL-28A C48S	SEC ID N°: 19
Met IL-28A C49S	SEC ID N°: 21
IL-28A C50S	SEC ID N°: 23
Met IL-28A C51S	SEC ID N°: 25
IL-29 C171S	SEC ID N°: 27
Met IL-29 C172S	SEC ID N°: 29

10

15

Se ha demostrado que todos los miembros de la familia se unen al mismo receptor de citocinas de clase II, IL-28R. La subunidad α de IL-28 se denominó anteriormente receptor de zcytor19. Aunque sin desear limitarse a la teoría, parece que todas estas moléculas señalizan a través del receptor de IL-28R mediante la misma ruta. El receptor de IL-28 se describe en una solicitud de patente PCT de cesión común WO 02/44209; Sheppard y col., citado anteriormente; Kotenko y col., Nature Immunol. 4: 69-77, 2003; y PCT WO/03/040345. El IL-28R es un miembro de receptores de citocina de Clase II que se caracteriza por la presencia de uno o más módulos receptores de citocina (MRC) en sus dominios extracelulares. Otros receptores de citocinas de clase II incluyen zcytor11 (Patente de Estados Unidos del mismo solicitante N° 5.965.704), CRF2-4 (Registro de Genbank N° Z17227), IL-10R (Registro de Genbank N° U00672 y NM_001558), DIRS1, zcytor7 (Patente de Estados Unidos N° 5.945,511 del mismo solicitante) y el factor tisular. El receptor de IL-28, al igual que todos los receptores de clase II conocidos, excepto la cadena alfa del receptor de interferón-alfa/beta, solo tiene un MRC de clase II sencillo en su dominio extracelular.

20

25

Las citocinas con haz de cuatro hélices también se agrupan por la longitud de sus hélices componentes. Las citocinas con forma de "hélice larga" generalmente consisten en hélices de aproximadamente 24-30 restos, e incluyen IL-6, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibidor de leucemia (LIF) y hormona del crecimiento humano (hGH). Las citocinas con forma de "hélice corta" generalmente consisten en hélices de entre de 18-21 restos e incluyen IL-2, IL-4 y GM-CSF. Estudios usando CNTF e IL-6 demuestran que una hélice de CNTF puede cambiarse por la hélice equivalente en la IL-6, otorgando a la quimera propiedades de unión a CNTF. Por tanto, parece que los dominios funcionales de las citocinas de cuatro hélices se determina en base a su homología estructural, independientemente de la identidad de secuencia, y pueden conservar la integridad funcional en una quimera (Kallen y col., J. Biol. Chem. 274: 11859-11867, 1999). Por lo tanto, los polipéptidos IL-28 e IL-29 mutantes de cisteína serán útiles para preparar moléculas de fusión quiméricas, particularmente con otro interferones para determinar y modular la especificidad de unión al receptor. Son de interés particular las proteínas de fusión que combinan dominios helicoidales y en bucle de interferones y citocinas tales como INF- α , IL-10 y la hormona de crecimiento humano.

30

35

40

La presente memoria descriptiva describe moléculas de polinucleótidos, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican, por ejemplo, polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína. Por ejemplo, la presente memoria descriptiva describe secuencias de nucleótidos degenerados que codifican los polipéptidos IL-28A C48S, Met IL-28A C49S, IL-28A C50S, Met IL-28A C51S, IL-29 C171S y Met IL-29 C172S desvelados en el presente documento. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que, en vista de la degeneración del código genético, entre estas moléculas de polinucleótidos, es posible una variación de secuencias considerable. Las SEC ID Nos: 30, 31, 32, 33, 34 y 35 son secuencias de ADN degeneradas que incluyen todos los ADN que codifican IL-28A C48S, Met IL-28A C49S, IL-28A C50S, Met IL-28A C51S, IL-29 C171S y Met IL-29 C172S, respectivamente. Los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia degenerada de las SEC ID Nos: 30, 31, 32, 33, 34 y 35 también proporciona toda las secuencias de ARN que codifican las SEC ID Nos: 30, 31, 32, 33, 34 y 35 sustituyendo U por T y por tanto se describen en el presente documento.

45

Los polipéptidos de IL-28A también incluyen una mutación en la segunda cisteína, C2, del polipéptido maduro. Por ejemplo, la C2 del extremo N o extremo amino del polipéptido de la SEC ID N°: 2 es la cisteína en la posición de aminoácido 48, o posición 49 (Met N-terminal adicional) si se expresa en *E coli* (véase, por ejemplo, la SEC ID N°: 13). Esta segunda cisteína (de la cual hay siete, similares a IL-28B) o C2 de IL-28A puede mutarse, por ejemplo, a una serina, alanina, treonina, valina o asparagina, las moléculas IL-28A C2 mutantes incluyen, por ejemplo, moléculas de polinucleótidos como se muestra en las SEC ID Nos: 20 y 22, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican polipéptidos IL-28A C2 mutantes, como se muestra en las SEC ID Nos: 21 y 23, respectivamente. Las SEC ID Nos: 36 y 37 son polipéptidos de IL-28A C2 adicionales de la presente invención.

Además de los polipéptidos de IL-28A C2 mutantes, la presente memoria descriptiva describe polipéptidos de IL-28A que comprenden una mutación en la posición de la tercera cisteína, C3, del polipéptido maduro. Por ejemplo, la C3 del extremo N o extremo amino del polipéptido de la SEC ID N°: 2, es la cisteína en la posición 50, o posición 51 (Met N terminal adicional), si se expresa en *E. coli* (véase, por ejemplo, la SEC ID N°: 13). Las moléculas IL-28A C3 mutantes incluyen, por ejemplo, moléculas de polinucleótidos como se muestra en las SEC ID Nos: 24 y 26, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican polipéptidos de IL-28A C3 mutantes como se muestra en las SEC ID Nos: 25 y 27, respectivamente. Las SEC ID Nos: 38 y 39 son polipéptidos de IL-28A C3 adicionales de la presente invención.

Los polipéptidos de IL-28A incluyen, por ejemplo, las SEC ID Nos: 2, 13, 19, 21, 23 y 25, codificadas por las moléculas de polinucleótidos de IL-28A como se muestra en las SEC ID No: 1, 12, 18, 20, 22 y 24, respectivamente. Adicionalmente, los polipéptidos de IL-28A incluyen, por ejemplo las SEC ID Nos: 36, 37, 38 y 39.

Los polipéptidos de IL-28B también incluyen una mutación en la segunda cisteína, C2, del polipéptido maduro. Por ejemplo, la C2 desde el extremo-N o extremo-amino del polipéptido de la SEC ID N°: 6 es la cisteína en la posición de aminoácido 48, o posición 49 (Met N-terminal adicional) si se expresa en *E. coli* (véase, por ejemplo, la SEC ID N°: 19). Esta segunda cisteína (de la cual hay nueve, al igual que la IL-28A) o C2 de IL-28B puede mutarse, por ejemplo, a una serina, alanina, treonina, valina o asparagina. Las moléculas IL-28B C2 mutantes incluyen, por ejemplo, moléculas polinucleótidas como se muestra en las SEC ID Nos: 122 y 124, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican polipéptidos de IL-28B C2 mutantes como se muestra en las SEC ID Nos: 123 y 125, respectivamente. Las moléculas de IL-28B C2 mutantes adicionales incluyen moléculas de polinucleótidos como se muestra en las SEC ID N°: 130 y 132 que incluyen moléculas de ADN y ARN que codifican los polipéptidos de IL-28B C2 mutantes como se muestra en las SEC ID Nos: 131 y 133, respectivamente (publicación PCT WO 03/066002 (Kotenko y col.)).

Además de los polipéptidos de IL-28B C2 mutantes, la presente memoria descriptiva describe polipéptidos de IL-28B que comprenden una mutación en la posición de la tercera cisteína, C3 del polipéptido maduro. Por ejemplo, la C3 del extremo-N o extremo-amino del polipéptido de la SEC ID N°: 6, es la cisteína en la posición 50, o posición 51 (Met N-terminal adicional) si se expresa en *E. coli* (véase, por ejemplo, la SEC ID N°: 17). Las moléculas de IL-28B C3 mutantes incluyen, por ejemplo, moléculas de polinucleótidos como se muestra en las SEC ID Nos: 126 y 128, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican polipéptidos de IL-28B C3 mutantes como se muestra en las SEC ID Nos: 127 y 129, respectivamente. Las moléculas de IL-28B C3 mutantes adicionales incluyen moléculas de polinucleótidos como se muestra en las SEC ID N°: 134 y 136 que incluyen moléculas de ADN y ARN, que codifican polipéptidos de IL-28B C3 mutantes como se muestra en las SEC ID Nos: 135 y 137, respectivamente (publicación PCT WO 03/066002 (Kotenko y col.)).

Los polipéptidos de IL-28B incluyen, por ejemplo, las SEC ID Nos: 6, 17, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135 y 137, codificadas por las moléculas de polinucleótidos de IL-28B como se muestra en las SEC ID Nos: 5, 16, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134 y 136, respectivamente.

Los polipéptidos de IL-29 de la presente invención (como se define en las reivindicaciones) incluyen una mutación en la quinta cisteína, C5, del polipéptido maduro. Por ejemplo, la C5 del extremo-N del polipéptido de la SEC ID N°: 4, es la cisteína en la posición 171, o posición 172 (Met N-terminal adicional) si se expresa en *E. coli* (véase, por ejemplo, la SEC ID N°: 15). Esta quinta cisteína o C5 de IL-29 está mutada a una serina. Estos polipéptidos de IL-29 C5 mutantes tienen un patrón de enlace disulfuro de C1 (Cys15 de la SEC ID N°: 4)/C3(Cys112 de la SEC ID N°: 4) y C2 (Cys49 de la SEC ID N°: 4)/C4(Cys145 de la SEC ID N°: 4). Las moléculas IL-29 C5 mutantes adicionales incluyen moléculas de polinucleótidos como se muestra en las SEC ID Nos: 26, 28, 82, 84, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 160, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican los polipéptidos IL-29 C5 mutantes como se muestra en las SEC ID Nos: 27, 29, 83, 85, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161, respectivamente. Las moléculas de IL-29 C5 mutantes adicionales incluyen moléculas de polinucleótidos como se muestra en las SEC ID Nos: 86, 88, 94 y 96, incluyendo moléculas de ADN y ARN que codifican polipéptidos de IL-29 C5 mutantes como se muestra en la SEC ID Nos: 87, 89, 95 y 97, respectivamente (publicación PCT WO 03/066002 (Kotenko y col.)). Las moléculas de IL-29 C5 mutantes adicionales incluyen moléculas de polinucleótidos como se muestra en las SEC ID Nos: 102, 104, 110 y 112, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican polipéptidos IL-29 C5 mutantes como se muestra en las SEC ID Nos: 103, 105, 111 y 113, respectivamente (publicación PCT WO 02/092762 (Baum y col.)).

Además de los polipéptidos de IL-29 C5 mutantes, la presente memoria descriptiva describe polipéptidos de IL-29 que comprenden una mutación en la posición de la primera cisteína, C1, del polipéptido maduro. Por ejemplo, la C1 del extremo-N del polipéptido de la SEC ID N°: 4, es la cisteína en la posición 15, o posición 16 (Met N-terminal adicional) si se expresa en *E. coli* (véase, por ejemplo, la SEC ID N°: 15). Estos polipéptidos de IL-29 C1 mutantes tendrán por tanto un patrón de enlace disulfuro previsto de C2 (Cys49 de la SEC ID N°: 4)/C4(Cys145 de la SEC ID N°: 4) y C3(Cys112 de la SEC ID N°: 4)/C5(Cys171 de la SEC ID N°: 4). Las moléculas IL-29 C1 mutantes adicionales, incluyen moléculas de polinucleótidos como se muestra en las SEC ID Nos: 74, 76, 78 y 80, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican polipéptidos de IL-29 C1 mutantes como se muestra en las SEC ID Nos: 75, 77, 79 y 81, respectivamente. Las moléculas de IL-29 C1 mutantes adicionales incluyen moléculas de polinucleótidos como se muestra en las SEC ID Nos: 90, 92, 98 y 100, incluyendo moléculas de ADN y ARN que

codifican polipéptidos de IL-29 C1 mutantes como se muestra en las SEC ID Nos: 91, 93, 99 y 101, respectivamente (publicación PCT WO 03/066002 (Kotenko y col.)). Las moléculas de IL-29 C1 mutantes incluyen moléculas de polinucleótidos como se muestra en las SEC ID Nos: 106, 108, 114 y 116, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican polipéptidos de IL-29 C1 mutantes como se muestra en las SEC ID Nos: 107, 109, 115 y 117, respectivamente (publicación PCT WO 02/092762 (Baum y col.)).

Los polipéptidos de IL-29 descritos en el presente documento, por ejemplo, SEC ID Nos: 4, 15, 27, 29, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161, codificados por moléculas de polinucleótidos de IL-29 como se muestra en las SEC ID Nos: 3, 14, 26, 28, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 160 pueden incluir adicionalmente una secuencia de señal como se muestra en la SEC ID N°: 119 o una secuencia de señal como se muestra en la SEC ID N°: 121. Además, la presente memoria descriptiva describe los polipéptidos de IL-29 como se muestra en las SEC ID Nos: 40 y 41. Una molécula polinucleotídica que codifica el polipéptido de secuencia señal de la SEC ID N°: 119 se muestra como SEC ID N°: 118. Una molécula polinucleotídica que codifica el polipéptido de secuencia de señal de la SEC ID N°: 120 se muestra como SEC ID N°: 121.

En un aspecto, la presente memoria descriptiva describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos una identidad de secuencia del 90 por ciento o 95 por ciento con una secuencia de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161. Opcionalmente, el polipéptido puede comprender al menos 15, al menos 30, al menos 45, o al menos 60 aminoácidos secuenciales de una secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161. En otra realización, el polipéptido aislado son restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161. El polipéptido puede tener un cambio de aminoácido conservativo, en comparación con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161; y un resto de poli(óxido de alquilo). Opcionalmente, el resto de poli(óxido de alquilo) puede ser polietilenglicol, tal como un propionaldehído mPEG de 20 kD o un propionaldehído mPEG de 30 kD. El polietilenglicol puede ser lineal o ramificado. El polietilenglicol puede estar unido covalentemente al polipéptido en el extremo N o en el extremo C.

En otro aspecto de la presente memoria descriptiva se describe una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido unidos por un enlace peptídico, en el que el primer polipéptido comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161; y un segundo polipéptido. Opcionalmente, el segundo polipéptido puede ser un fragmento de anticuerpo. Opcionalmente el fragmento de anticuerpo puede ser F(ab'), F(ab), Fab', Fab, Fv, scFv, y/o una unidad de reconocimiento mínima. Opcionalmente, el segundo polipéptido puede ser albúmina humana. Opcionalmente, el segundo polipéptido puede ser un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en etiquetas de afinidad, toxinas, radionucleótidos, enzimas y fluoróforos.

La Tabla 3 expone los códigos de una letra usados en las SEC ID Nos: 30, 31, 32, 33, 34 y 35 para indicar posiciones de nucleótidos degenerados. Las "resoluciones" son los nucleótidos indicados por un código de letra. El "Complemento" indica el código del nucleótido (o nucleótidos) complementario. Por ejemplo, el código Y indica C o T y su complemento R indica A o G, siendo A complementaria a T y G complementaria a C.

Tabla 3

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

Los codones degenerados usados en las SEC ID Nos: 30, 31, 32, 33, 34 y 35 incluyen todos los posibles codones para un aminoácido determinado, como se expone en la Tabla 4

5

Tabla 4

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

Un experto habitual en la materia apreciará que se introduce cierta ambigüedad determinando un codón degenerado, representativo de todos los codones posibles que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado de serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar arginina (ARG) y el codón degenerado de arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre los codones que codifican la fenilalanina y la leucina. Por tanto, algunos polinucleótidos incluidos por la secuencia degenerada pueden codificar secuencias variantes de aminoácidos, pero un experto habitual en la materia puede identificar fácilmente dichas secuencias variantes por referencia a la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de las SEC ID Nos: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149,

151,153,155, 157, 159 y 161. Como se describe en el presente documento, la funcionalidad de las secuencias variantes también puede someterse a ensayo fácilmente.

Un experto habitual en la materia también apreciará que las diferentes especies pueden presentar un “uso de codón preferencial”. Véase, en general, Grantham, y col., Nuc. Acids Res. 8: 1893-912, 1980; Haas, y col. Curr. Biol. 6: 315-24, 1996; Wain-Hobson, y col., Gene 13: 355-64, 1981; Grosjean y Fiers, Gene 18: 199-209, 1982; Hohm, Nuc. Acids Res. 14: 3075-87, 1986; Ikemura, J. Mol. Biol. 158: 573-97, 1982. Como se usa en el presente documento, las expresiones “uso de codón preferencial” o “codones preferenciales” son expresiones de la técnica que se refieren a codones de traducción de proteínas que se usan más frecuentemente en células de una especie determinada, favoreciendo así a uno o a algunos de los representantes de los codones posibles que codifican cada aminoácido (véase la Tabla 4). Por ejemplo, el aminoácido Treonina (Thr) puede codificarse por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en células de mamífero ACC es el codón más comúnmente usado; en otras especies, por ejemplo, células de insecto, levaduras, virus o bacterias, los diferentes codones de Thr pueden ser preferenciales. En los polinucleótidos de la presente invención pueden introducirse codones preferenciales de una especie particular mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codones preferenciales en ADN recombinante puede potenciar, por ejemplo, la producción de la proteína haciendo que la traducción de la proteína sea más eficaz dentro de un tipo de célula o especie particular. Por lo tanto, las secuencias de codones degenerados desveladas en las SEC ID Nos: 30, 31, 32, 33, 34 y 35 sirven como un molde para optimizar la expresión de polinucleótidos en diversos tipos de células y especies normalmente usadas en la técnica y desveladas en el presente documento. También pueden ensayarse secuencias que contengan codones preferenciales y optimizarse para la expresión en diversas especies y someterse a ensayo con respecto a la funcionalidad, como se desvela en el presente documento.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 160.

En de otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un polinucleótido aislado que puede hibridarse con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 160 o un complemento de las mismas, en condiciones de hibridación de formamida al 50%, 5xSSC (1xSSC: cloruro sódico 0,15 M y citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt (100x solución de Denhardt: Ficoll 400 al 2% (p/v), polivinilpirrolidona al 2% (p/v) y albúmina de suero bovino al 2% (p/v), sulfato de dextrano al 10% y ADN de esperma de salmón cortado, desnaturalizado 20 mg/ml a una temperatura de aproximadamente 42 °C a aproximadamente 70 °C, en el que el polinucleótido aislado codifica un polipéptido que tiene actividad antiviral. Opcionalmente, el polipéptido codificado tiene actividad antiviral contra la hepatitis B y/o hepatitis C. Opcionalmente, el polinucleótido aislado puede codificar al menos una parte de una secuencia seleccionada del grupo de las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161. El polinucleótido aislado puede codificar un polipéptido representado por las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 o 161.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido en el que el polipéptido codificado se selecciona del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido en el que el polipéptido codificado tiene al menos una identidad de secuencia del 90 por ciento o 95 por ciento con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161, en el que el polipéptido codificado tiene actividad antiviral. Opcionalmente, el polipéptido codificado tiene actividad antiviral contra la hepatitis B y/o hepatitis C.

Como se ha indicado anteriormente, los polinucleótidos aislados de la presente invención incluyen ADN y ARN. En la técnica se conocen bien procedimientos para preparar ADN y ARN. En general, se aísla ARN de un tejido o célula que produce grandes cantidades de ARN de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína. Dichos tejidos y células se identifican por transferencia de Northern (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201, 1980) o explorando un medio acondicionado de diversos tipos de células para identificar la actividad sobre las células o tejidos diana. Una vez identificada la actividad o el tejido o la célula que produce el ARN, puede prepararse ARN total usando extracción con isotiocianato de guanidino seguido por aislamiento por centrifugación en un gradiente con CsCl

(Chirgwin y col., Biochemistry 18: 52-94, 1979). El ARN poli (A)⁺ se prepara a partir de ARN total usando el procedimiento de Aviv y Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408-12, 1972). El ADN complementario (ADNc) se prepara a partir de ARN poli(A)⁺ usando procedimientos conocidos. Como alternativa, puede aislarse ADN genómico. Después, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína se identifican y se aíslan, por ejemplo, por hibridación o PCR.

Mediante procedimientos de clonación convencionales pueden obtenerse clones de longitud completa que codifiquen IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína. Se prefieren clones de ADNc complementario (ADNc), aunque en algunas aplicaciones (por ejemplo, expresión en animales transgénicos) puede ser preferible el uso de un clon genómico, o modificar un clon de ADNc para incluir al menos un intrón genómico. En la técnica se conocen bien procedimientos para preparar clones de ADNc y genómicos y se encuentra dentro del nivel de habilidad habitual en la técnica, e incluyen el uso de las secuencias desveladas en el presente documento, o partes de las mismas, para explorar o cebar una biblioteca. Las bibliotecas de expresión pueden explorarse con anticuerpos contra fragmentos del receptor de IL-28, u otros compañeros de unión específicos.

Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias desveladas, por ejemplo, en las SEC ID Nos: 1, 3 y 5, respectivamente, representan mutaciones de alelos simples de bandas de IL-28 e IL-29 humana y se espera que se produzca esa variación alélica y corte y empalme alternativo. Por ejemplo, se ha identificado una variante de IL-29 en la que el resto de aminoácido 169 (Asn) como se muestra en la SEC ID N°: 4 es un resto de Arg, como se describe en el documento WO 02/086087. Dichas variantes alélicas se incluyen en la presente invención. Las variantes alélicas de esta secuencia pueden clonarse explorando bibliotecas de ADNc o genómicas de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos convencionales. En el presente documento se describen variantes alélicas de la secuencia de ADN mostrada en las SEC ID Nos: 1, 3 y 5, incluyendo las que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos, además de las mutaciones de cisteína, y son proteínas que son variantes alélicas de las SEC ID N°: 2, 4 y 6. Los ADNc generados a partir de ARNm cortado y empalmado de manera alternativa que conservan las propiedades de los polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína, se incluyen en el ámbito de la presente invención, así como los polipéptidos codificados por dichos ADNc y dichos ARNm. Las variantes alélicas y las variantes de corte y empalme de estas secuencias pueden clonarse explorando bibliotecas de ADNc o genómicas de diferentes individuos o tejidos de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica y, como se describe en el presente documento, en los polinucleótidos que codifican cisteínas o restos de cisteína pueden introducirse mutaciones.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican IL-28 e IL-29 mutantes de Cisteína o variantes aisladas pueden hibridarse en condiciones rigurosas con moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de nucleótidos de las SEC ID Nos: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 160 o con moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos complementaria con las SEC ID Nos: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 160. En general, para la secuencia específica se seleccionan condiciones rigurosas para que tengan una temperatura de aproximadamente 5 °C inferior que la del punto de fusión térmico (T_f) a una fuerza iónica y pH definidos. La T_f es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la cual el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente emparejada.

Un par de moléculas de ácido nucleico, tales como ADN-ADN, ARN-ARN y ADN-ARN, pueden hibridarse si las secuencias de nucleótidos tienen algún grado de complementariedad. Los híbridos pueden tolerar pares de bases de emparejamiento erróneo en la doble hélice, pero la estabilidad del híbrido está influenciada por el grado de emparejamiento erróneo. La T_f del híbrido con emparejamiento erróneo disminuye 1 °C por cada 1-1,5% de emparejamiento erróneo de pares de bases. La variación de la rigurosidad de las condiciones de hibridación permite controlar el grado de emparejamiento erróneo que estará presente en el híbrido. El grado de rigurosidad aumenta a medida que aumenta la temperatura de hibridación y disminuye la fuerza iónica del tampón de hibridación.

Se encuentra bien dentro de las capacidades de un experto en la técnica adaptar estas condiciones para su uso con un híbrido polinucleotídico particular. La T_f para una secuencia diana específica es la temperatura (en condiciones definidas) a la cual el 50% de la secuencia diana se hibridará con una secuencia sonda perfectamente emparejada. Las condiciones que influyen en la T_f incluyen, el tamaño y el contenido del par de bases de la sonda del polinucleótido, la fuerza iónica de la solución de hibridación y la presencia de agentes desestabilizantes en la solución de hibridación. En la técnica se conocen numerosas ecuaciones para calcular la T_f y son específicas para híbridos de ADN, ARN y ADN-ARN y para secuencias sonda de polinucleótidos de diversa longitud (véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel y col., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger y Kimmel (eds.), Guide to Molecular Cloning Techniques, (Academic Press, Inc. 1987); y Wetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227 (1990)). Los programas informáticos de análisis de secuencia tales como OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) y Primer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), así como sitios en Internet, son herramientas disponibles para analizar una secuencia determinada y calcular la T_f en base a criterios definidos por el usuario. Dichos programas también pueden analizar una secuencia determinada en condiciones definidas e

identificar secuencias sonda adecuadas. Típicamente, la hibridación de secuencias de polinucleótidos más largas, >50 pares de bases, se realiza a temperaturas de aproximadamente 20-25 °C por debajo de la T_f calculada. Para sonda más pequeñas, <50 pares de bases, la hibridación se realiza típicamente a la T_f de 5-10 °C por debajo de la T_f calculada. Esto permite una tasa máxima de hibridación para híbridos de ADN-ADN y ADN-ARN.

- 5 Después de la hibridación, las moléculas de ácido nucleico pueden lavarse para eliminar las moléculas de ácido nucleico que no han hibridado en condiciones rigurosas o en condiciones altamente rigurosas. Las condiciones de lavado típicas rigurosas incluyen lavado en una solución de 0,5x - 2x SSC con dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1% a 55 - 65 °C. Esto es, las moléculas de ácido nucleico que codifican una variante o polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes Cisteína se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de las SEC ID Nos: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 160, respectivamente (o su complemento) en condiciones de lavado rigurosas, en las que la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5x - 2x SSC con SDS al 0,1% a 55 - 65 °C, incluyendo 0,5x SSC con SDS al 0,1% a 55 °C o 2x SSC con SDS al 0,1% a 65 °C. Un experto en la técnica puede idear fácilmente condiciones equivalentes, por ejemplo, sustituyendo SSPE por SSC en la solución de lavado.

- Las condiciones de lavado típicas altamente rigurosas incluyen lavado en una solución de 0,1x - 0,2x SSC con dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1% a 50 - 65 °C. En otras palabras, las moléculas de ácido nucleico que codifican una variante de un polipéptido de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de las SEC ID Nos: 18, 20, 22, 2A, 26, 28, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 160 (o su complemento) en condiciones de lavado altamente rigurosas, en la que la rigurosidad de lavado es equivalente a 0,1x - 0,2x SSC con SDS al 0,1% a 50 - 65 °C, incluyendo 0,1x SSC con SDS al 0,1% a 50 °C, o 0,2x SSC con SDS al 0,1% a 65 °C.

- Los polipéptidos de IL-28 o IL-29 aislados pueden tener una identidad de secuencia sustancialmente similar con los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 o 161. La expresión "identidad de secuencia sustancialmente similar" se usa en el presente documento para indicar polipéptidos que comprenden una identidad de secuencia de al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o más del 99% con las secuencias mostradas en las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 o 161 o sus ortólogos. La presente memoria descriptiva describe polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o mas del 99% con un polipéptido o un fragmento del mismo de la presente invención. La presente memoria descriptiva describe polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos. Los polipéptidos de IL-28 e IL-29 descritos en el presente documento son preferentemente polipéptidos recombinantes, los polipéptidos de IL-28 e IL-29 descritos en el presente documento que tienen al menos 15, al menos 30, al menos 45 o al menos 60 aminoácidos secuenciales. Por ejemplo, un polipéptido de IL-28 o IL-29 tiene al menos 15, al menos 30, al menos 45 o al menos 60 aminoácidos secuenciales de las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 o 161. A continuación se describen procedimientos para determinar el porcentaje de identidad.

- La presente memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico variantes que pueden identificarse usando dos criterios: una determinación de la similitud entre el polipéptido codificado con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nos: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 o 161 respectivamente, y/o un ensayo de hibridación, como se ha descrito anteriormente. Dichas variantes incluyen moléculas de ácido nucleico: (1) que se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de las SEC ID Nos: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 160, respectivamente (o su complemento) en condiciones de lavado rigurosas, en las que la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5x - 2x SSC con SDS al 0,1% a 55 - 65 °C; o (2) que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o más del 99% con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nos: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 37, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 o 161. Como alternativa, las variantes pueden caracterizarse como moléculas de ácido nucleico: (1) que se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de las SEC ID Nos: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146,

148, 150, 152, 154, 156, 158 o 160, respectivamente (o su complemento) en condiciones de lavado altamente rigurosas, en el que la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,1x - 2x SSC con SDS al 0,1% a 50 - 65 °C; y (2) que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o más del 99% con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nos: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 o 161, respectivamente.

El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo Altschul y col., Bull. Math. Bio. 48: 603 (1986), y Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992). En resumen, se alinean dos secuencias de aminoácidos para optimizar las puntuaciones del alineamiento usando una penalización de apertura de hueco de 10, una penalización de extensión de hueco de 1 y la matriz de puntuación "BLOSUM62" de Henikoff y Henikoff (ya mencionado) como se muestra en la Tabla 4 (los aminoácidos se indican mediante códigos convencionales de una letra).

Número total de emparejamientos idénticos

x 100

[longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias]

15

Tabla 5

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

Los expertos en la técnica aprecian que para alinear dos secuencias de aminoácidos existen muchos algoritmos establecidos disponibles. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un procedimiento de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el grado de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento y la secuencia de aminoácidos de una supuesta variante IL-28 o IL-29. El algoritmo FASTA fue descrito por Pearson y Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), y por Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990).

En resumen, en primer lugar FASTA caracteriza la similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia problema (por ejemplo, SEC ID N°: 2) y una secuencia de ensayo que tiene la densidad de identidades (si

- la variable ktup es 1) o pares de identidades (si la ktup=2) más alta, sin considerar sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácidos conservativos. Las diez regiones con la densidad de identidades más alta vuelven a puntuarse comparando la similitud de todos los aminoácidos emparejados usando una matriz de sustitución de aminoácidos, y los extremos de las regiones se "cortan" para incluir solo aquellos restos que contribuyen a la puntuación más alta. Si hubiese diversas regiones con mayores puntuaciones que las del valor "límite" (calculado mediante una fórmula predeterminada en base a la longitud de la secuencia y el valor ktup), entonces las regiones iniciales cortadas se examinan para determinar si las regiones pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con huecos. Finalmente, las regiones de mayor puntuación de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787 (1974)), que permite realizar inserciones y delecciones de aminoácidos. Los parámetros preferidos del análisis FASTA son: ktup=1, penalización por apertura de hueco=10, penalización por extensión de hueco=1 y matriz de sustitución=BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el Anexo 2 de Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990).
- FASTA también puede usarse para determinar la identidad de secuencia de moléculas de ácido nucleico usando una proporción como se ha desvelado anteriormente. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor ktup puede variar entre uno a seis, preferentemente de tres a seis, más preferentemente tres, con otros parámetros establecidos por defecto.
- Los polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína variantes o polipéptidos con identidad de secuencia sustancialmente similar se caracterizan por tener una o más sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferentemente de una naturaleza menor, es decir sustituciones de aminoácidos conservativos (véase la Tabla 6) y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegamiento o a la actividad del polipéptido; pequeñas delecciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y extensiones amino- o carboxilo-terminal, tales como un resto de metionina amino-terminal, un péptido de engarce pequeño de hasta aproximadamente 20-25 restos o una etiqueta de afinidad. La presente memoria descriptiva describe polipéptidos de desde aproximadamente 146 a 207 restos de aminoácidos que comprenden una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o más del 99% con la región correspondiente de las SEC ID Nos: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 o 161. Los polipéptidos que comprenden etiquetas de afinidad pueden comprender adicionalmente un sitio de escisión proteolítico entre el polipéptido IL-28 e IL-29 y la etiqueta de afinidad. Dichos sitios preferidos incluyen sitios de escisión de trombina y sitios de escisión del factor Xa.

Tabla 6

Sustituciones de aminoácidos conservativos

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

La determinación de los restos de aminoácidos que comprenden regiones o dominios que son críticos para conservar la integridad estructural puede determinarse. Dentro de estas regiones pueden determinarse restos específicos que serán más o menos tolerantes a cambios y conservarán la estructura terciaria global de la molécula. Los procedimientos para analizar estructuras de secuencias incluyen, pero sin limitación, alineamiento de

secuencias múltiples con alta identidad de aminoácidos o nucleótidos, predisposición a estructura secundaria, patrones binarios, compactamiento complementario e interacciones polares internas (Barton, *Current Opin. Struct. Biol.* 5: 372-376, 1995 y Cordes y col., *Current Opin. Struct. Biol.* 6: 3-10, 1996). En general, cuando se diseñan modificaciones para moléculas o se identifican fragmentos específicos la determinación de estructuras vendrá acompañada por una evaluación de la actividad de las moléculas modificadas.

Para minimizar la alteración de la estructura de mayor orden esencial para la actividad biológica se realizan cambios de la secuencia de aminoácidos en los polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína. Por ejemplo, cuando el polipéptido de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína comprende una o más hélices, se realizarán cambios en los restos de aminoácidos para no alterar la geometría de la hélice y otros componentes de la molécula en la que cambios en la conformación disminuyen alguna función crítica, por ejemplo, la unión de la molécula a sus compañeros de unión. Los efectos de los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden predecirse, por ejemplo, por modelado a través de ordenador como se desvela anteriormente o determinarse mediante análisis de estructura cristalina (véase, por ejemplo, Laphorn y col., *Nat. Struct. Biol.* 2: 266-268, 1995). Otras técnicas que son bien conocidas en la materia comparan el plegamiento de una proteína variante con el de una molécula convencional (por ejemplo, la proteína natural). Por ejemplo, puede realizarse una comparación del patrón de la cisteína en una variante y en moléculas convencionales. La espectrometría de masas y la modificación química usando reducción y alquilación proporcionan procedimientos para determinar restos de cisteína que están asociados con los enlaces disulfuro o que carecen de dichas asociaciones (Bean y col., *Anal. Biochem.* 201: 216-226, 1992; Gray, *Protein Sci.* 2: 1732-1748, 1993; y Patterson y col., *Anal. Chem.* 66: 3727-3732, 1994). Generalmente se cree que si una molécula modificada no tiene el mismo patrón de cisteína que el de la molécula convencional el plegamiento se vería afectado. Otro procedimiento bien conocido y aceptado para medir el plegamiento es el dicróismo circular (DC). La medición y comparación de espectros de DC generados por una molécula modificada y una molécula convencional es rutinario (Johnson, *Proteins* 7: 205-214, 1990). La cristalografía es otro procedimiento bien conocido para analizar el plegamiento y la estructura. La resonancia magnética y nuclear (RMN), el mapeo con péptidos digestivos y el mapeo epitópico son también procedimientos conocidos para analizar el plegamiento y las similitudes estructurales entre proteínas y polipéptidos (Schaanan y col., *Science* 257: 961-964, 1992).

Puede generarse un perfil de hidrofiliidad de Hopp/Woods de la secuencia de la proteína IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína como se muestra en las SEC ID Nos: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 o 161 (Hopp y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3824-3828, 1981; Hopp, *J. Immun. Meth.* 88: 1-18, 1986 y Triquier y col., *Protein Engineering* 11: 153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana deslizante de seis restos. Los restos G, S y T internos y los restos H, Y y W expuestos se ignoran. Los expertos en la técnica reconocerán que la hidrofiliidad o hidrofobicidad se tendrán en cuenta cuando se diseñan modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína, para no alterar la estructura global y el perfil biológico. De particular interés para la sustitución son los restos hidrófobos seleccionados del grupo que consiste en Val, Leu e Ile o el grupo que consiste en Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp.

Las identidades de aminoácidos esenciales también pueden deducirse a partir de análisis de similitud de secuencia entre IFN- α y miembros de la familia de IL-28A, IL-28B e IL-29 (como se muestra en las Tablas 1 y 2). Usando procedimientos tales como análisis "FASTA" descritos anteriormente, se identifican regiones de alta similitud dentro de una familia de proteínas y se usan para analizar la secuencia de aminoácidos para regiones conservadas. Una estrategia alternativa para identificar un polinucleótido variante en base a la estructura es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un posible gen de IL-28 o IL-29 variante puede hibridarse con una molécula de ácido nucleico como se ha indicado anteriormente.

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

La presente memoria descriptiva describe fragmentos funcionales de polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales. Un polipéptido IL-28 o IL-29 mutante de cisteína "funcional" o fragmento del mismo, como se define en el presente documento, se caracteriza por su actividad proliferativa o diferenciadora, por su capacidad para inducir o inhibir funciones celulares especializadas o por su capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo anti-IL-28 o IL-29 o receptor de IL-28 (soluble o inmovilizado). En el presente documento se desvelan las actividades especializadas de los polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína y como someterlos a ensayo. Como anteriormente se ha descrito en el presente

documento, los polipéptidos de IL-28 e IL-29 se caracterizan por un haz de seis hélices. Por tanto, la presente memoria descriptiva describe proteínas de fusión que incluyen: (a) moléculas polipeptídicas que comprenden una o más de las hélices descritas anteriormente; y (b) fragmentos funcionales que comprenden una o más de estas hélices. La otra parte del polipéptido de la proteína de fusión puede contribuir con otra citocina o interferón con haz helicoidal tal como IFN- α , o con un péptido de señal secretor no relacionado y/o no natural que facilita la secreción de la proteína de fusión.

Los polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína descritos en el presente documento, incluyendo polipéptidos de longitud completa, fragmentos biológicamente activos y polipéptidos de fusión pueden producirse de acuerdo con técnicas convencionales usando células en las que se ha introducido un vector de expresión que codifica el polipéptido. Como se usa en el presente documento, las "células en las que ha introducido un vector de expresión" incluyen células que se han manipulado directamente por la introducción de moléculas de ADN exógeno y su progenie que contienen el ADN introducido. Las células huésped adecuadas son aquellos tipos de células que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y que crecen en cultivos, e incluyen células bacterianas, fúngicas y células eucariotas superiores cultivadas. Las técnicas para manipular moléculas de ADN clonado e introducir ADN exógeno en una diversidad de células huésped se desvela 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., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión (como se define en las reivindicaciones) que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: un promotor de la transcripción; un segmento de ADN que codifica un polipéptido de la invención; y un terminador de la transcripción.

La presente memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende una molécula de ADN purificada y aislada que incluye los siguientes elementos unidos operativamente: un promotor de la transcripción; un segmento de ADN que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 por ciento o 95 por ciento con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, y un terminador de la transcripción. La secuencia de ADN puede comprender adicionalmente una secuencia de señal secretora unida operativamente al segmento de ADN. El polipéptido codificante también puede comprender una etiqueta de afinidad como se describe en el presente documento. La presente memoria descriptiva describe una célula cultivada que contiene el vector de expresión descrito anteriormente. Opcionalmente, el polipéptido codificado puede comprender al menos 15, al menos 30, al menos 45, o al menos 60 aminoácidos esenciales de una secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEC ID Nos: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161. Opcionalmente, el polipéptido codificado puede tener actividad antiviral, por ejemplo, contra la hepatitis B y hepatitis C.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula cultivada (como se define en las reivindicaciones) que comprende un vector de expresión como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una proteína que comprende: cultivar una célula como se desvela anteriormente en condiciones en las que se exprese el segmento de ADN; y recuperar la proteína codificada por el segmento de ADN, como se define en las reivindicaciones.

En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína está unida operativamente a otros elementos genéticos necesarios para su expresión, incluyendo generalmente un promotor y un terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. Normalmente el vector también contendrá uno o más marcadores de selección y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la técnica reconocerán que pueden proporcionarse determinados sistemas de marcadores de selección en distintos vectores y la replicación de ADN exógeno puede proporcionarse por integración en el genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores de selección, vectores y otros elementos es un asunto de diseño rutinario dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica. Se describen muchos de estos elementos en la bibliografía y se encuentran disponibles a través de proveedores comerciales.

Para dirigir un polipéptido de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína en la ruta secretora de una célula huésped, en el vector de expresión se proporciona una secuencia de señal secretora (conocida también como una secuencia líder, secuencia pre-pro o secuencia pre). La secuencia de señal secretora puede ser la de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína, por ejemplo, la SEC ID N°: 119 o la SEC ID N°: 121, o puede proceder otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA; véase, la Patente de Estados Unidos N° 5.641.655) o sintetizarse desde el principio. La secuencia de señal secretora está unida operativamente a la secuencia de ADN de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína, es decir, las dos secuencias están unidas en la fase de lectura correcta y colocadas para dirigir el polipéptido recientemente sintetizado en la ruta secretora de la célula huésped. Las secuencias de señal secretoras normalmente están situadas en el extremo 5' de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque determinadas secuencias de señal pueden situarse en cualquier parte en la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés (véase, por ejemplo Welch y col., Patente de Estados Unidos N° 5.037.743; Holland y col., Patente de Estados Unidos N° 5.143.830).

Una amplia diversidad de células huéspedes recombinantes adecuadas incluyen, pero sin limitación, organismos huéspedes procariotas gram negativos. Las cepas adecuadas de *E. coli* incluyen cepas derivadas de W3110, K12, MM294, TG-1, JM-107, BL21 y UT5600. Otras cepas adecuadas incluyen: BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4I, DHS, DH5I, DH5IF, DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DHILS, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, ER1647, *E. coli* K12, *E. coli* K12 RV308, *E. coli* K12 C600, *E. coli* HB101, *E. coli* K12 C600 R.sub.k-M.sub.k-, *E. coli* K12 RR1 (véase, por ejemplo Brown (ed.), Molecular Biology Labfax (Academic Press 1991)). Otros huéspedes procariotas gram negativos pueden incluir *Serratia*, *Pseudomonas*, *Caulobacter*. Los huéspedes procariotas pueden incluir organismo gram positivos tales como *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, y *B. thuringiensis* var. *israelensis*, así como *Streptomyces*, por ejemplo *S. lividans*, *S. ambofaciens*, *S. fradiae*, y *S. griseofuscus*. Las cepas adecuadas de *Bacillus subtilis* incluyen BR151, YB886, MI119, MI120 y B170 (véase, por ejemplo Hardy, "Bacillus Cloning Methods," in DNA Cloning: A Practical Approach, Glover (ed.) (IRL Press 1985)). Técnicas convencionales para la propagación de vectores en huéspedes procariotas son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo Ausubel y col. (eds.), Short Protocols in Molecular Biology. 3ª Edición (John Wiley & Sons 1995); Wu y col., Methods in Gene Biotechnology (CRC Press, Inc. 1997)). En una realización los procedimientos de la presente invención usan IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína expresados en la cepa W3110, que se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como ATCC N° 27325.

Cuando se requiere una producción a gran escala de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína usando el sistema de expresión de la presente invención, puede usarse la fermentación discontinua. Generalmente, la fermentación discontinua comprende que se prepare un matraz de siembra de primera etapa cultivando cepas de *E. coli* que expresen IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína en un medio adecuado en matraces de cultivo con agitación para permitir el crecimiento a una densidad óptica (DO) de entre 5 y 20 a 600 nm. Un medio adecuado contendría nitrógeno a partir de una fuente (o fuentes) tal como sulfato de amonio, fosfato de amonio, cloruro de amonio, extracto de levadura, proteínas animales hidrolizadas, proteínas vegetales hidrolizadas o caseínas hidrolizadas. El fosfato se proporcionará a partir de fosfato potásico, fosfato amónico, ácido fosfórico o fosfato sódico. Otros componentes serían cloruro de magnesio o sulfato de magnesio, sulfato ferroso o cloruro ferroso u otros oligoelementos. El medio de crecimiento puede complementarse con carbohidratos, tales como fructosa, glucosa, galactosa, lactosa y glicerol para mejorar el crecimiento. Como alternativa, se usa un cultivo de alimentación discontinuo para generar un alto rendimiento de proteína de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína. Las cepas de *E. coli* productoras de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína se cultivan en condiciones similares a las descritas para el recipiente de primera etapa usado para inocular una fermentación discontinua.

Después de la fermentación las células se recogen por centrifugación, se resuspenden en tampón de homogeneización y se homogeneizan, por ejemplo en un homogeneizador APV-Gaulin (Invensys APV, Tonawanda, Nueva York) o en otro tipo de equipo de alteración celular, tal como molinos de perlas o ultrasonidos. Como alternativa, las células se extraen directamente del fermentador y se homogeneizan en un homogeneizador APV-Gaulin. La preparación de los cuerpos de inclusión lavados puede solubilizarse usando clorhidrato de guanidina (5-8 M) o urea (7 - 8 M) que contiene un agente reductor tal como beta mercaptoetanol (10 - 100 mM) o ditiotretiol (5-50 mM). Las soluciones pueden prepararse en Tris, fosfato, HEPES u otros tampones apropiados. Los cuerpos de inclusión también pueden solubilizarse con urea (2-4 M) que contiene lauril sulfato sódico (0,1-2%). En el proceso para recuperar la IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína purificada de células huésped de *E. coli* transformadas en la que la IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína se acumula como cuerpos de inclusión refráctiles, las células se alteran y los cuerpos de inclusión se recuperan por centrifugación. Después los cuerpos de inclusión se solubilizan y se desnaturalizan en clorhidrato de guanidina 6 M que contiene un agente reductor. Después, la IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína reducida se oxida en una etapa de renaturalización controlada. La IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína replegada puede pasarse a través de un filtro para aclarar y retirar las proteínas insolubles. La solución se pasa después a través de un filtro para aclarar y retirar las proteínas insolubles. Después de que la proteína IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína se repliega y concentra, la proteína IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína replegada se captura en tampón de dilución sobre una columna de intercambio catiónico y se purifica usando cromatografía de interacción hidrofoba.

Las células de mamífero cultivadas son huéspedes adecuados de la presente invención. Los procedimientos para la introducción de ADN exógeno en células huéspedes de mamífero incluyen transfección mediada con fosfato cálcico (Wigler y col., Cell 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981; Graham y Van der Eb, Virology 52: 456, 1973), electroporación (Neumann y col., EMBO J. 1: 841-5, 1982), transfección mediada con Dear-dextrina (Ausubel y col., citado anteriormente), transfección mediada con liposomas (Hawley-Nelson y col., Focus 15: 73, 1993; Ciccarone y col., Focus 15: 80, 1993), y vectores virales (Miller y Rosman, BioTechniques 7: 980-90, 1989; Wang y Finer, Nature Med. 2: 714-6, 1996). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas la desvelan, por ejemplo, Levinson y col., Patente de Estados Unidos N° 4.713.339; Hagen y col., Patente de Estados Unidos N° 4.784.950; Palmiter y col., Patente de Estados Unidos N° 4.579.821; y Ringold, Patente de Estados Unidos N° 4.656.134. Las células de mamífero cultivadas adecuadas incluyen la líneas de células COS-1 (ATCC N° CRL 1650), COS-7 (ATCC N° CRL 1651), BHK (ATCC N° CRL 1632), BHK 570 (ATCC N° CRL 10314), 293 (ATCC N° CRL 1573; Graham y col., J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977) y de ovario de hámster Chino (por ejemplo CHO-K1; ATCC N° CCL 61). Se conocen otras líneas celulares adecuadas en la técnica y se encuentran disponibles en depósitos públicos tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA.

En general, se prefieren promotores de transcripción fuertes, tales como promotores del SV-40 o citomegalovirus. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los procedentes de los genes de la metalotioneína (Patentes de Estados Unidos N° 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor tardío principal de adenovirus.

- 5 La selección de fármacos generalmente se usa para seleccionar células de mamífero cultivadas en las que se ha insertado ADN extraño. Dichas células normalmente se denominan "transfectantes". Las células que se han cultivado en presencia del agente selectivo y pueden pasar el gen de interés a su progenie se denominan "transfectantes estables". Un marcador de selección preferido es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección se realiza en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similar. También
- 10 pueden usarse sistemas de selección para aumentar nivel de expresión del gen de interés, un proceso denominado "amplificación". La amplificación se realiza cultivando transfectantes en presencia de un bajo nivel de agente selectivo y aumentando después la cantidad de agente selectivo para seleccionar células que produzcan altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador de selección amplificable preferido es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia a metotrexato. También pueden usarse otros genes resistentes a
- 15 fármacos (por ejemplo resistencia a higromicina, resistencia a múltiples fármacos, puromicin acetiltransferasa). Pueden usarse marcadores alternativos que introducen un fenotipo modificado, tal como proteína verde fluorescente, o proteínas de superficie celular tales como: CD4, CD8, MHC de Clase I, fosfatasa alcalina placentaria para separar células transfectadas de células no transfectadas mediante medios tales como separación FACS o tecnología de separación con perlas magnéticas.
- 20 Como huéspedes también pueden usarse otras células eucariotas superiores, incluyendo células vegetales, células de insecto y células de aves. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como un vector para la expresión de genes en células vegetales lo han revisado Sinkar y col., J. Biosci. (Bangalore) 11: 47-58, 1987. La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos extraños en su interior la desvelan Guarino y col., Patente de Estados Unidos N° 5.162.222 y publicación WIPO WO 94/06463. Las células de insecto pueden infectarse con baculovirus recombinantes, normalmente derivados del virus de la *polihedrosis nuclear de Autographa californica* (AcNPV). Véase, King, L. A. y Possee, R. D., The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Londres, Chapman & Hall; O'Reilly, D. R. y col., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Nueva York, Oxford University Press., 1994; y Richardson, C. D., Ed., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995. El segundo procedimiento para fabricar baculovirus recombinantes utiliza un sistema basado
- 30 en transposón descrito por Luckow (Luckow, V. A. y col., J Virol 67: 4566-79, 1993). Este sistema se comercializa en el kit Bac-to-Bac (Life Technologies, Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, pFastBac1™ (Life Technologies) que contiene un transposón Tn7 para desplazar el ADN que codifica el polipéptido IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína a un genoma de baculovirus conservado en *E. coli* como un gran plásmido denominado "bácmido." El vector de transferencia pFastBac1™ utiliza el promotor de la polihedrina del AcNPV para dirigir la
- 35 expresión del gen de interés, en este caso IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína. Sin embargo, pFastBac1™ puede modificarse a un grado considerable. El promotor de polihedrina puede eliminarse y sustituirse por el promotor de la proteína básica de baculovirus (conocido también como promotor Pcor, p6.9 o MP) que se expresa anteriormente en la infección de baculovirus y se ha observado que es ventajoso para expresar proteínas secretadas. Véase, Hill-Perkins, M. S. y Possee, R. D., J. Gen. Virol. 71: 971-6; 1990; Bonning, B. C. y col., J. Gen. Virol. 75: 1551-6, 1994; y Chazenbalk, G. D., y Rapoport, B., J. Biol. Chem. 270: 1543-9, 1995. En dichas construcciones de vectores de transferencia, puede usarse una versión corta o larga del promotor de la proteína básica. Además, pueden
- 40 construirse vectores de transferencia que sustituyen la señal secretora de IL-28 o IL-29 natural por secuencias de señal secretoras derivadas de proteínas de insecto. Por ejemplo, en construcciones puede usarse una secuencia de señal secretora de Glucosiltransferasa Ecdysteroide (EGT), Melitina de la abeja de la miel (Invitrogen, Carlsbad, CA) o gp67 de baculovirus (PharMingen, San Diego, CA) para sustituir la secuencia de señal secretora de IL-28 o IL-29 natural. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en marco con ADN que codifica una etiqueta epitópica en el extremo C o N del polipéptido de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína expresado, por ejemplo, una etiqueta epitópica Glu-Glu (Grussenmeyer, T. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952-4, 1985). Usando técnicas conocidas en la materia, un vector de transferencia que contenga IL-28 o IL-29 mutante Cisteína se transforma en *E. Coli* y se explora para identificar bácmidos que contengan un gen lacZ interrumpido indicativo de baculovirus
- 50 recombinante. El ADN del bácmido que contiene el genoma del baculovirus recombinante se aísla, usando técnicas habituales, y se usa para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, por ejemplo células Sf9. El virus recombinante que expresa IL-28 o IL-29 mutante Cisteína se produce posteriormente. Se preparan reservas virales recombinantes mediante procedimientos normalmente utilizados en la técnica.
- 55 El virus recombinante se usa para infectar células huésped, típicamente una línea celular derivada del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*. Véase, en general, Glick y Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D. C., 1994. Otra línea celular adecuada es la línea celular High FiveO™ (Invitrogen) derivada de *Trichoplusia ni* (Patente de Estados Unidos N° 5.300.435).
- 60 En la presente invención también pueden usarse células fúngicas, incluyendo células de levadura. Las especies de levadura de particular interés en este sentido incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Se desvelan procedimientos para la transformación de células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y la producción de polipéptidos recombinantes a partir de las mismas, por ejemplo, por Kawasaki, Patente de Estados Unidos N° 4.599.311; Kawasaki y col., Patente de Estados Unidos N° 4.931.373; Brake, Patente de Estados Unidos

Nº 4.870.008; Welch y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.037.743; y Murray y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por fenotipo determinado mediante el marcador de selección, normalmente resistencia a fármacos o por la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo leucina). Un sistema vectorial preferido para su uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema vectorial *POT1* desvelado por Kawasaki y col. (Patente de Estados Unidos Nº 4.931.373), que permite que las células transformadas se seleccionen mediante cultivo en medios que contengan glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para su uso en levaduras incluyen los de los genes de enzimas glucolíticas (véase, por ejemplo Kawasaki, Patente de Estados Unidos Nº 4.599.311; Kingsman y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.615.974; y Bitter, Patente de Estados Unidos Nº 4.977.092) y genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse también las Patentes de Estados Unidos Nos 4.990.446; 5.063.154; 5.139.936 y 4.661.454. En la técnica se conocen sistemas de transformación de 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: 3459-65, 1986 y Cregg, Patente de Estados Unidos Nº 4.882.279. De acuerdo con los procedimientos de McKnight y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.935.349, pueden utilizarse células de *Aspergillus*. Sumino y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.162.228 desvelan procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum*. Lambowitz, Patente de Estados Unidos Nº 4.486.533, desvela procedimientos para transformar *Neurospora*. El uso de *Pichia methanolica* como huésped para la producción de proteínas recombinantes se desvela en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.955.349, 5.888.768 y 6.001.597, Patente de Estados Unidos Nº 5.965.389, Patente de Estados Unidos Nº 5.736.383 y Patente de Estados Unidos Nº 5.854.039.

Se prefiere purificar los polipéptidos y proteínas de la presente invención a una pureza $\geq 80\%$, más preferentemente a una pureza $\geq 90\%$, incluso más preferente a una pureza $\geq 95\%$ y particularmente se prefiere un estado farmacéuticamente puro, que tenga una pureza mayor del 99,9% con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos y carezcan de agentes infecciosos o pirogénicos. Preferentemente, un polipéptido o proteína purificados carecen sustancialmente de otros polipéptidos o proteínas, particularmente los que son de origen animal.

Las proteínas de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína recombinantes expresadas (incluyendo polipéptidos quiméricos y proteínas multiméricas) se purifican mediante procedimientos de purificación de proteínas convencionales, típicamente mediante una combinación de técnicas cromatográficas. Véase, en general, Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988; and Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nueva York, 1994. Las proteínas que comprenden una etiqueta de afinidad de polihistidina (típicamente de aproximadamente 6 restos de histidina) se purifican por cromatografía de afinidad sobre una resina de quelato de níquel. Véase, por ejemplo, Houchuli y col., Bio/Technol. 6: 1321-1325, 1988. Las proteínas que comprenden una etiqueta glu-glu pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad de acuerdo con procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Grussenmeyer y col., citado anteriormente. Las fusiones de proteínas de unión a maltosa se purifican sobre una columna de amilosa de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

Los polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de cisteína también pueden prepararse mediante síntesis química de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo síntesis exclusiva en fase sólida, procedimientos parciales en fase sólida, síntesis por condensación de fragmentos o por solución clásica. Véase, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963; Stewart y col., Solid Phase Peptide Synthesis (2ª edición), Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984; Bayer y Rapp, Chem. Pept. Prot. 3: 3, 1986; y Atherton y col., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1989. La síntesis *in vitro* es particularmente ventajosa para la preparación de polipéptidos más pequeños.

Utilizando procedimientos conocidos en la técnica, las proteínas de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína, pueden prepararse como monómeros o multímeros; glucosilados o no glucosilados; pegilados o no pegilados; proteínas de fusión; y pueden incluir o no un resto de aminoácido de metionina inicial. Los conjugados de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína usados para terapia pueden comprender restos polímeros solubles en agua farmacéuticamente aceptable. Se ha observado que la conjugación de interferones con polímeros solubles en agua potencia la semivida circulante del interferón y reduce la inmunogenicidad del polipéptido (véase, por ejemplo, Nieforth y col., Clin. Pharmacol. Ther. 59: 636 (1996), y Monkarsch y col., Anal. Biochem. 247: 434 (1997)).

Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG, mono-(C1-C10)alcoxi-PEG, ariloxi-PEG, poli-(N-vinil pirrolidón)PEG, tresil monometoxi PEG, monometoxi-PEG propionaldehído, PEG propionaldehído, bis-succinimidil carbonato PEG, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), monometoxi-PEG butiraldehído, PEG butiraldehído, monometoxi-PEG acetaldehído, PEG acetaldehído, metoxil PEG-succinimidil propionato, metoxil PEG-succinimidil butanoato, alcohol polivinílico, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en carbohidratos. Los PEG adecuados pueden tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, incluyendo, por ejemplo, 5.000 daltons, 12.000 daltons, 20.000 daltons, 30.000 daltons y 40.000 daltons, que pueden ser lineales o ramificados. Un conjugado de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína también puede comprender una mezcla de dichos polímeros solubles en agua.

Un ejemplo de un conjugado de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína comprende un resto de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína y un resto de poli(óxido de alquilo) unido al extremo N del resto de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína. El PEG es un poli(óxido de alquilo) adecuado. Como una ilustración, IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína puede modificarse con PEG, un proceso conocido como "PEGilación". La PEGilación de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína puede realizarse mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316, Delgado y col., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249 (1992), Duncan y Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27: 290 (1994) y Francis y col., Int J Hematol 68: 1 (1998)). Por ejemplo, la PEGilación puede realizarse mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva. En una estrategia alternativa, los conjugados de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína se forman condensando PEG activado, en el que un grupo hidroxilo o amino terminal de PEG se ha reemplazado por un engarce activado (véase, por ejemplo, Karasiewicz y col., Patente de Estados Unidos N° 5.382.657).

La PEGilación por acilación típicamente requiere hacer reaccionar un derivado de éster activo de PEG con un polipéptido de IL-28 o IL-29 mutante de cisteína. Un ejemplo de un éster PEG activado es PEG esterificado con *N*-hidroxisuccinimida. Como se usa en el presente documento, el término "acilación" incluye los siguientes tipos de enlaces entre IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína y un polímero soluble en agua: amida, carbamato, uretano y similares. Los procedimientos para preparar IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína PEGilado por acilación comprenden típicamente las etapas de (a) hacer reaccionar un polipéptido de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína con PEG (tal como un éster reactivo de un derivado aldehído de PEG) en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen a IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína y (b) obtener el producto (o productos) de reacción. Generalmente, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán en base a parámetros conocidos y en resultados deseados. Por ejemplo, cuanto mayor sea la proporción de PEG: IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína, mayor será el porcentaje de producto de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína poliPEGilado.

La PEGilación por alquilación generalmente implica hacer reaccionar un aldehído terminal, por ejemplo, propionaldehído, butiraldehído, acetaldehído y similares, derivado de PEG con IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína en presencia de un agente reductor. Los grupos PEG se unen preferentemente al polipéptido mediante un grupo $-CH_2-NH_2$.

La derivatización mediante alquilación reductora para producir un producto monoPEGilado se aprovecha de la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios disponibles para la derivatización. Típicamente, la reacción se realiza a un pH que permite aprovecharse de las diferencias de pKa entre los grupos ϵ -amino de los restos de lisina y del grupo α -amino del resto N terminal de la proteína. Mediante dicha derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo, tal como un aldehído, con una proteína. La conjugación con el polímero se produce predominantemente en el extremo N de la proteína sin modificación significativa de los grupos reactivos restantes tales como los grupos amino de la cadena lateral de la lisina.

La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de una molécula conjugada de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína monopolimérica puede comprender las etapas de: (a) hacer reaccionar un polipéptido de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína con un PEG reactivo en condiciones de alquilación reductoras a un pH adecuado que permita la modificación selectiva del grupo α -amino en el extremo amino de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína y (b) obtener el producto (o productos) de reacción. El agente reductor usado para la alquilación reductora debe ser estable en solución acuosa y preferentemente debe ser capaz de reducir únicamente la base de Schiff formada en el proceso inicial de alquilación reductora. Los agentes reductores preferidos incluyen borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, dimetilamina borano, trimetilamina borano y piridin borano.

Para una población sustancialmente homogénea de conjugados de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína monopolímeros, las condiciones de reacción de alquilación reductora son las que permiten la unión selectiva del resto polímero soluble en agua con el extremo N de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína. Dichas condiciones de reacción generalmente proporcionan diferencias de pKa entre los grupos amino de lisina y el grupo α -amino en el extremo N. El pH también influye en la proporción del polímero con respecto a proteína a usar. En general, si el pH es más bajo, un mayor exceso de polímero con respecto a proteína será deseable porque cuanto menos reactivo sea el grupo α N terminal, más necesitará el polímero para conseguir condiciones óptimas. Si el pH es más alto, el polímero: IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína no es necesario que sea tan grande porque se dispone de más grupos reactivos. Típicamente, el pH estará en el intervalo de 3 - 9 o 3 - 6. Otro factor a considerar es el peso molecular del polímero soluble en agua. Generalmente, cuanto mayor sea el peso molecular del polímero, menor será la cantidad de moléculas poliméricas que puedan unirse a la proteína. Para las reacciones de PEGilación, el peso molecular típico es de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, de aproximadamente 12 kDa a aproximadamente 40 kDa, o de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 30 kDa. La proporción molar del polímero soluble con respecto a IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína generalmente estará en el intervalo de 1:1 a 100:1. Típicamente, la proporción molar de polímero soluble en agua con respecto a IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína será de 1:1 a 20:1 para la poliPEGilación y de 1:1 a 5:1 para la monoPEGilación.

En la técnica se conocen procedimientos generales para la producción de conjugados que comprenden interferón y restos polímeros solubles en agua. Véase, por ejemplo Karasiewicz y col., Patente de Estados Unidos N° 5.382.657, Greenwald y col., Patente de Estados Unidos N° 5.738.846, Nieforth y col., Clin. Pharmacol. Ther. 59: 636 (1996), Monkarsh y col., Anal. Biochem. 247: 434 (1997). Las especies PEGiladas pueden separarse de los polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína no conjugados usando procedimientos de purificación convencionales, tales como diálisis, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares.

Las moléculas de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína descritas en el presente documento pueden unirse específicamente al receptor de IL-28 y/o actuar como un agente antiviral. La unión de los polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína al receptor de IL-28 puede ensayarse usando estrategias establecidas. Las moléculas de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína puede iodinarse usando una yodoperla (Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y después puede usarse ^{125}I -IL-28 o ^{125}I -IL-29 como se describe más adelante.

En un primer enfoque pueden combinarse cincuenta nanogramos de ^{125}I -IL-28 o ^{125}I -IL-29 con 1000 ng de la proteína de fusión de IgG humana al receptor de IL-28, en presencia o ausencia de posibles competidores de unión incluyendo IL-28 mutante de cisteína, IL-29 mutante de cisteína, IL-28 o IL-29. Las mismas reacciones de unión también se realizarían sustituyendo otras fusiones de IgG humana al receptor de citocina como controles para especificidad. Después de la incubación a 4 °C, se añade proteína G (Zymed, San Francisco, CA) a la reacción, para capturar las fusiones receptor-IgG y cualquiera de las proteínas unidas a ellas y las reacciones se incuban otra hora a 4 °C. Después, se recoge la proteína G sepharose, se lava tres veces con PBS y se mide el ^{125}I -IL-28 o ^{125}I -IL-29 unido con un contador gamma (Packard Instruments, Downers Grove, IL).

En un segundo enfoque, puede ensayarse la capacidad de las moléculas para inhibir la unión de ^{125}I -IL-28 o ^{125}I -IL-29 a receptores unidos a la placa. Un fragmento del receptor de IL-28, que represente el dominio de unión a ligando extracelular, puede absorberse a los pocillos de una placa de 96 pocillos incubando 100 µl de solución de receptor 1 g/ml en la placa durante una noche. En una segunda forma, una fusión de IgG humana-receptor puede unirse a los pocillos de una placa de 96 pocillos que se ha revestido con un anticuerpo dirigido contra un anticuerpo dirigido contra la parte de IgG humana de la proteína de fusión. Después de revestir la placa con el receptor, la placa se lava, se bloquea con SUPERBLOCK (Pierce, Rockford, IL) y se lava de nuevo. Las soluciones que contienen una concentración fija de ^{125}I -IL-28 o ^{125}I -IL-29 con o sin concentraciones en aumento de posibles competidores de unión incluyen, IL-28 mutante de Cisteína, IL-29 mutante de Cisteína, IL-28 e IL-29 y 100 µl de la solución añadida a los pocillos apropiados de la placa. Después de una hora de incubación a 4 °C la placa se lava y la cantidad de ^{125}I -IL-28 o ^{125}I -IL-29 unida se determina por recuento (Topcount, Packard Instruments, Downers Grove, IL). La especificidad de unión de ^{125}I -IL-28 o ^{125}I -IL-29 puede definirse mediante moléculas receptoras usadas en estos ensayos de unión así mediante las moléculas usadas como inhibidores.

Además de la pegilación, la albúmina humana puede acoplarse genéticamente a un polipéptido de la presente invención para prolongar su semivida. La albúmina humana es la proteína sanguínea de origen natural más frecuente en el sistema circulatorio humano, persistiendo en la circulación en el organismo durante más de veinte días. Investigaciones realizadas han demostrado que las proteínas terapéuticas genéticamente fusionadas con la albúmina humana tienen semividas más prolongadas. Una proteína de fusión albúmina con IL28 o IL29, al igual que la pegilación, puede proporcionar a los pacientes opciones de tratamiento de acción prolongada que ofrecen un programa de administración más conveniente, con una eficacia y seguridad similares o mejoradas en comparación con los tratamientos actualmente disponibles (Patente de Estados Unidos N° 6.165.470; Syed y col., Blood, 89(9): 3243-3253 (1997); Yeh y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 1904-1908 (1992); y Zeisel y col., Horm. Res., 37: 5-13 (1992)).

Al igual que la pegilación anteriormente mencionada y la albúmina humana, una parte Fc de la molécula de IgG humana puede fusionarse a un polipéptido de la presente invención. La proteína de fusión resultante puede tener una semivida circulante aumentada debido al resto Fc (Patente de Estados Unidos N° 5.750.375, 5.843.725, 6.291.646; Barouch y col., Journal of Immunology, 61: 1875-1882 (1998); Barouch y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(8): 4192-4197 (11 de abril, 2000); y Kim y col., Transplant Proc., 30(8): 4031-4036 (dic. 1998)).

Los procedimientos para la detección y el diagnóstico de infecciones virales son bien conocidos por los expertos en la técnica. El procedimiento exacto usado para medir una reducción en virus en respuesta a la administración de moléculas de la presente invención dependerá de la especie de virus y de si la infección se produce *in vitro* o *in vivo*. Si la infección es *in vivo*, la medición y detección de infección y los cambios en los niveles de infección, pueden variar dependiendo del sujeto infectado, del tipo de infección viral y similares. Por ejemplo, los procedimientos incluyen, pero sin limitación, medir cambios en recuentos celulares de DC4, ensayos serológicos, medición del ADN y del ARN del virus mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativos en tiempo real y convencionales, niveles de anticuerpos inducidos virales, inmunofluorescencia y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, efectos citopáticos e histología.

Los efectos antivirales pueden ser directos o indirectos. Un ejemplo de un efecto antiviral directo, es, por ejemplo, cuando el polipéptido de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína compite por un receptor o co-receptor viral para bloquear la infección viral. La IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína puede proporcionarse por vía parenteral para prevenir la

infección viral o reducir el avance de la replicación viral y la reinfección (Gayowski, T. y col., Transplantation 64: 422-426, 1997). Un ejemplo de un efecto antiviral indirecto es, por ejemplo, cuando la IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína puede unirse a DC4 u otro receptor leucocitario y presentar efectos antivirales modulando los efectos de la respuesta inmunitaria.

- 5 De particular interés es el uso de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína como un agente terapéutico antiviral para leucemias virales (HTLV), SIDA (VIH) o infecciones virales gastrointestinales producidas, por ejemplo, por rotavirus, calicivirus (por ejemplo Norwalk Agent) y determinadas cepas de adenovirus patógenos, Hepatitis B y C.

Otros tipos de infecciones virales para IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína incluyen, pero sin limitación: infecciones producidas por Virus de ADN (por ejemplo, Herpes Virus tales como el virus del Herpes Simple, el virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus; Pox virus tales como el virus de la Variola (viruela); Hepadnavirus (por ejemplo, virus de la Hepatitis B); Papilomavirus; Adenovirus); Virus de ARN (por ejemplo VIH I, II; HTLV I, II; Poliovirus; Hepatitis A; coronavirus, tales como el síndrome respiratorio agudo severo (SARS); Ortomixovirus (por ejemplo, virus gripales); Paramixovirus (por ejemplo, virus del sarampión); virus de la Rabia; virus de la Hepatitis C), Flavivirus, virus gripales; calicivirus; virus de la rabia, virus de la peste bovina, Arenavirus y similares. Además, entre los ejemplos de los tipos de enfermedades relacionadas con virus para las que podría usarse la IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína incluyen, pero sin limitación: inmunodeficiencia adquirida; Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS); Hepatitis; Gastroenteritis; enfermedades Hemorrágicas; Enteritis; Carditis; Encefalitis; Parálisis; Broquiolititis; enfermedades de las vías respiratorias superior e inferior; Papilomatosis Respiratoria; Artritis; enfermedad Diseminada, Meningitis, Mononucleosis. Además, la IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína puede usarse en diversas aplicaciones para inmunoterapia viral, y junto con otras citocinas, otras proteínas o antivirales de molécula pequeña y similares.

Clínicamente, los ensayos de diagnóstico para el VHC incluyen ensayos serológicos para anticuerpos y ensayos moleculares para partículas virales. Se dispone de inmunoensayos enzimáticos (Vrielink y col., Transfusion 37: 845-849, 1997), pero pueden requerir confirmación usando ensayos adicionales tales como un ensayo de inmunotransferencia (Pawlotsky y col., Hepatology 27: 1700-1702, 1998). Los ensayos cualitativos y cuantitativos generalmente usan técnicas de reacción en cadena de polimerasa y se prefieren para evaluar respuestas de viremia y de tratamiento (Poynard y col., Lancet 352: 1426-1432, 1998; McHutchinson y col., N. Engl. J. Med. 339: 1485-1492, 1998). Se dispone de diversos ensayos comerciales, tales como RT-PCR cuantitativa (Amplicor HCV Monitor™, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ) y un ensayo de amplificación de señal de ADN ramificado (ácido desoxirribonucleico) (Quantiplex™ HCV RNA Assay [bDNA], Chiron Corp., Emeryville, CA). Un ensayo de laboratorio no específico para la infección del VHC mide el nivel alanina aminotransferasa (ALT) y es económico y fácil de conseguir (National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel, Hepatology 26 (Suppl. 1): 2S-10S, 1997). La evaluación histológica de la biopsia de hígado se considera generalmente como el medio más preciso para determinar el avance del VHC (Yano y col., Hepatology 23: 1334-1340, 1996.) Para una revisión de ensayos clínicos para VCH, véase, Lauer y col., N. Engl. J. Med. 345: 41-52, 2001.

35 Existen diversos modelos *in vivo* para ensayar el VHB y el VHC que son conocidos por los expertos en la técnica. Con respecto al VHC, por ejemplo, el modelo de replicón del VHC es un sistema basado en células para estudiar la eficacia de un fármaco para inhibir la replicación del VHC (Blight y col., Science, 290(5498): 1972-1974 (8 de diciembre 2000); y Lohmann y col., Science, 285(5424): 110-113 (2 de julio 1999)). Un modelo *in vitro* del VHB aceptado y bien conocido por un experto en la técnica para determinar la actividad anti-VHB de una molécula de ensayo se desvela en Korba y col., Antiviral Res., 19(1): 55-70 (1992) y en Korba y col., Antiviral Res., 15(3): 217-228 (1991).

Por ejemplo, usando un modelo con marmotas, pueden investigarse los efectos de la IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína en mamíferos infectados con el VHB. En resumen, marmotas crónicamente infectadas con el virus de la hepatitis de la marmota (VHM) desarrollan hepatitis y carcinoma hepatocelular que es similar a la enfermedad en seres humanos crónicamente infectados con el VHB. El modelo se ha usado para la evaluación preclínica de la actividad antiviral. Usando este modelo, se establece una cepa del VHM, crónicamente infectada, y a los neonatos se les inocula suero para proporcionar animales para estudiar los efectos de determinados compuestos. (Para una revisión, véase, Tannant y col., ILAR J. 42(2): 89-102, 2001). También se han utilizado chimpancés para evaluar el efecto de la IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína en mamíferos infectados por el VHB. Utilizando chimpancés, se realizó la caracterización del VHB y estos estudios demuestran que la enfermedad en el chimpancé era notablemente similar a la enfermedad en seres humanos (Barker y col., J. Infect. Dis. 132: 451-458, 1975 y Tabor y col., J. Infect. Dis. 147: 531-534, 1983). El modelo con chimpancés se ha usado en la evaluación de vacunas (Prince y col., In: Vaccines 97, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997). Las terapias para el VIH se ensayan rutinariamente usando primates no humanos infectados con el virus de la inmunodeficiencia del simio (para una revisión, véase Hirsch y col., Adv. Pharmacol. 49: 437-477, 2000 y Nathanson y col., AIDS 13 (suppl. A): S113-S120, 1999). Para una revisión del uso de primates no humanos en el VIH, hepatitis, malaria, virus sincitial respiratorio y otras enfermedades, véase, Sibal y col., ILAR J. 42 (2): 74-84, 2001. Un modelo de ratón transgénico recientemente desarrollado (Guidotti y col., Journal of Virology 69: 6158-6169, 1995) mantiene la replicación de altos niveles del VHB infeccioso y se ha usado como un modelo quimioterapéutico para la infección del VHB. Ratones transgénicos se tratan con fármacos antivirales y después de tratamiento los niveles de ADN y ARN del VHB se miden en el hígado y suero de los ratones transgénicos. Los niveles de proteína del VHB también pueden medirse en el suero de los ratones transgénicos después del tratamiento. Este modelo se ha usado para evaluar la eficacia

de la lamivudina y del IFN-alfa reduciendo las titulaciones virales del VHB (Money y col., Antiviral Therapy 3: 59-68, 1998).

Además, los polipéptidos y proteínas de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína pueden caracterizarse por su actividad, esto es, modulación de la proliferación, diferenciación, migración, adhesión, expresión génica o metabolismo de tipos de células sensibles. La actividad biológica de los polipéptidos y proteínas de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína se ensaya usando ensayos *in vitro* o *in vivo* diseñados para detectar la proliferación, diferenciación, migración o adhesión celular; o cambios en la expresión génica o metabolismo celular (por ejemplo, producción de otros factores de crecimiento u otras macromoléculas). En la técnica se conocen muchos ensayos adecuados y en el presente documento se desvelan ensayos representativos. Los ensayos que utilizan células cultivadas son los más convenientes para la exploración, tales como para determinar los efectos de sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos.

La actividad de las proteínas de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína puede medirse *in vitro* usando células cultivadas o *in vivo* administrando, a un modelo animal apropiado, moléculas de la invención reivindicada. En la técnica se conocen bien ensayos que miden la proliferación o diferenciación celular. Por ejemplo, entre los ensayos que miden la proliferación se incluyen ensayos tales como quimiosensibilidad al colorante rojo neutro (Cavanaugh y col., Investigational New Drugs 8: 347-354, 1990), incorporación de nucleótidos radiomarcados (como desvelan, por ejemplo, Raines y Ross, Methods Enzymol. 109: 749-773, 1985; Wahl y col., Mol. Cell Biol. 8: 5016-5025, 1988; y Cook y col., Analytical Biochem. 179: 1-7, 1989), incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el ADN de células proliferantes (Porstmann y col., J. Immunol. Methods 82: 169-179, 1985) y uso de sales tetrazolio (Mosmann, J. Immunol. Methods 65: 55-63, 1983; Alley y col., Cancer Res. 48: 589-601, 1988; Marshall y col., Growth Reg. 5: 69-84, 1995; y Scudiero y col., Cancer Res. 48: 4827-4833, 1988). La diferenciación puede ensayarse usando células precursoras adecuadas que pueden inducirse para diferenciarse en un fenotipo más maduro. Los ensayos que miden la diferenciación incluyen, por ejemplo la medición de marcadores de superficie celular asociados con la expresión específica de fase de un tejido, actividad enzimática, actividad funcional o cambios morfológicos (Watt, FASEB, 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; todos incorporados en el presente documento por referencia).

Los polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína también pueden detectarse usando ensayos diseñados para medir la producción inducida por IL-28 e IL-29 de uno o más factores de crecimiento u otras macromoléculas adicionales. Se ha observado que determinados miembros de la familia de proteínas que comprenden IL-28 e IL-29 aumentan el número de monocitos circulantes *in vivo*. La activación de monocitos es importante en la inmunidad tanto innata como adaptativa. Por ejemplo, se ha observado que la activación de monocitos estimula la presentación de antígenos mediante diversos mecanismos. La presentación de antígenos promueve la activación y proliferación de linfocitos T, tanto linfocitos T citotóxicos como linfocitos T auxiliares. La maduración y activación de células dendríticas también promueve la activación de linfocitos T y la inmunidad tanto innata como adaptativa. También se ha observado que el aumento de monocitos y macrófagos activados aumenta la actividad citolítica. Por lo tanto, IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína serían útil como un agente antiinfeccioso, potenciando respuestas inmunitarias innatas, mediadas por células y humorales. Se observaron aumentos en cuanto a tinción ICAM en monocitos CD14+ lo que sugería que IL-28 e IL-29 desempeñaban una función en la activación de monocitos. Aunque los datos demuestran que los miembros de familia promueven una respuesta antiviral contra virus, también pueden afectar a bacterias y parásitos.

Se realizaron ensayos de activación de monocitos (1) para investigar la capacidad de las proteínas IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína para estimular adicionalmente la activación de monocitos y (2) para examinar la capacidad de las proteínas IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína para modular la activación de monocitos inducida por endotoxinas o inducida por la unión (Fuhlbrigge y col., J. Immunol. 138: 3799-3802, 1987). Los niveles de IL-1 α y TNF α producidos en respuesta a la activación se miden por ELISA (Biosource, Inc. Camarillo, CA). Debido a CD14 (receptor de LPS) las células de monocitos/macrófagos son extremadamente sensibles a las endotoxinas, y las proteínas con niveles moderados de actividad similar a las endotoxinas activarán estas células.

Los niveles aumentados de monocitos sugieren que IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína puede tener un efecto directo sobre las células progenitoras mieloides en la médula ósea. El aumento de diferenciación de células progenitoras mieloides a monocitos es esencial restableciendo la inmunocompetencia, por ejemplo, después de quimioterapia. Por tanto, la administración de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína a pacientes que reciben quimioterapia podría promover su recuperación y su capacidad de resistir la infección normalmente asociada con regímenes quimioterapéuticos. Por tanto, se amplía el número de monocitos o de células progenitoras de monocitos, cultivando células de médula ósea o de sangre periférica, con las moléculas de la presente invención de tal manera que haya un aumento de células progenitoras de monocitos o monocitos para conseguir este efecto *in vitro* o *ex vivo*. La presente memoria descriptiva describe la administración *in vivo* de las moléculas de la presente invención a un mamífero que necesita aumentar las células progenitoras de monocitos o monocitos. El aumento de monocitos y de células progenitoras de monocitos puede medirse usando procedimientos bien conocidos por médicos, facultativos y otras personas expertas en la técnica. Los monocitos son células que se incluyen en el linaje mielóide de células hematopoyéticas, de manera que afectan a otras células en las que el linaje no sería raro. Por ejemplo, cuando un factor facilita la diferenciación o proliferación de un tipo de célula en el linaje mielóide o linfóide, este puede afectar a la producción de otras células con un progenitor o célula madre común.

La actividad hematopoyética de las proteínas IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína puede ensayarse en diversas células hematopoyéticas en cultivo. Los ensayos preferidos incluyen ensayos primarios de colonias de médula ósea y ensayos de colonias de linaje limitado de fase tardía, conocidos en la técnica (por ejemplo, Holly y col., Publicación WIPO WO 95/21920). Las células medulares se siembran en placas en un medio semisólido adecuado (por ejemplo metilcelulosa al 50% que contiene suero bovino fetal al 15%, albúmina de suero bovino al 10% y mezcla de antibiótico PSN al 0,6%) se incuban en presencia del polipéptido de ensayo, después se observan al microscopio para detectar la formación de colonias. Como controles se usan factores hematopoyéticos conocidos. La actividad mitogénica de los polipéptidos IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína en líneas celulares hematopoyéticas puede medirse como se ha desvelado anteriormente.

La migración celular se ensaya esencialmente como desvelan Kähler y col. (Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 17: 932-939, 1997). Se considera que una proteína es quimiotáctica si esta induce la migración de células desde un área de baja concentración de proteínas a un área de alta concentración de proteínas. Un ensayo típico se realiza usando las cámaras de Boyden modificadas separando las dos cámaras con una membrana de poliestireno (Transwell; Corning Costar Corp.). La muestra de ensayo, diluida en medio que contiene BSA al 1%, se añade a la cámara inferior de una placa de 24 pocillos que contiene pocillos Trans. Después, las células se siembran en placas en el inserto Transwell que se ha tratado previamente con gelatina al 0,2%. La migración celular se mide después de 4 horas de incubación a 37 °C. Las células que no han migrado se eliminan de la parte superior de la membrana Transwell y las células unidas a la cara inferior de la membrana se fijan y se tiñen con cristal violeta al 0,1%. Después, las células teñidas se extraen con ácido acético al 10% y se mide la absorbancia a 600 nm. Después se calcula la migración a partir de una curva de calibrado convencional. La migración celular también puede medirse usando el procedimiento matrigel de Grant y col. ("Angiogenesis as a component of epithelial-mesenchymal interactions" in Goldberg and Rosen, Epithelial-Mesenchymal Interaction in Cancer, Birkhäuser Verlag, 1995, 235-248; Baatout, Anticancer Research 17: 451-456, 1997).

La actividad de la adhesión celular se ensaya esencialmente como desvelan LaFleur y col. (J. Biol. Chem. 272: 32798-32803, 1997). En resumen, placas de microtitulación se revisten con la proteína de ensayo, los sitios no específicos se bloquean con BSA y se siembran en placas células (tales como células de la musculatura lisa, leucocitos y células endoteliales) a una densidad de aproximadamente 10^4 - 10^5 células/pocillo. Las células se incuban a 37 °C (típicamente durante aproximadamente 60 minutos), después las células no adherentes se eliminan mediante un lavado suave. Las células adherentes se cuantifican mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante tinción con cristal violeta, lisando las células y determinando la densidad óptica del lisado). Los pocillos de control se revisten con una proteína adhesiva conocida, tal como fibronectina o vitronectina.

La expresión de los polinucleótidos IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína en animales proporciona modelos para estudios posteriores de los efectos biológicos de sobreproducción o inhibición de actividad de proteínas *in vivo*. En animales de ensayo, tales como ratones, pueden introducirse polinucleótidos que codifican IL-28 o IL-29 y polinucleótidos antisentido usando vectores virales o ADN desnudo, o pueden producirse animales transgénicos.

Un enfoque *in vivo* para ensayar proteínas de la presente invención utiliza sistemas de administración viral. Entre los virus ejemplares para esta finalidad se incluyen adenovirus, herpesvirus, retrovirus, virus de la vacuna y virus adenoasociados (AAV, por sus siglas en inglés). Los adenovirus, un virus de ADN bicatenario, son normalmente el vector de transferencia génico mejor estudiado para la administración de ácidos nucleicos heterólogos. Para una revisión, véase Becker y col., Meth. Cell Biol. 43: 161-89, 1994; y Douglas y Curiel, Science & Medicine 4: 44-53, 1997. El sistema de adenovirus ofrece diversas ventajas. Los adenovirus pueden (i) alojar insertos de ADN relativamente grandes; (ii) crecer a una elevada titulación; (iii) infectar una amplia diversidad de tipos celulares de mamíferos y (iv) usarse con muchos promotores diferentes, incluyendo promotores ubicuos, específicos de tejido y regulables. Dado que los adenovirus son estables en la corriente sanguínea, estos pueden administrarse por inyección intravenosa. Véase también Wu y col., J. Biol. Chem. 263: 14621-14624, 1988; Wu y col., J. Biol. Chem. 267: 963-967, 1992; y Johnston y Tang, Meth. Cell Biol. 43: 353-365, 1994.

También pueden generarse ratones transgénicos (Lowell y col., Nature 366: 740-742, 1993), modificados por ingeniería genética, que expresen un gen IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína, y ratones que presenten una ausencia completa de función génica IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína, denominados "ratones genosuprimidos" (*knockout*) (Snouwaert y col., Science 257: 1083, 1992). Estos ratones pueden emplearse para estudiar el gen IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína y la proteína codificada por el mismo en un sistema *in vivo*. Los promotores preferidos para la expresión transgénica incluyen promotores de genes de metalotioneína y albúmina.

La mayoría de las citocinas así como otras proteínas producidas por linfocitos activados desempeñan un papel biológico importante en la diferenciación, activación, reclutamiento celular y homeostasis de células en todo el organismo. Se espera que IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína e inhibidores de su actividad tengan una diversidad de aplicaciones terapéuticas. Estas aplicaciones terapéuticas incluyen el tratamiento de enfermedades que requieren regulación inmunitaria, incluyendo enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico y diabetes. La IL-28 o IL-29 pueden ser importantes en la regulación de la inflamación y, por lo tanto, serían útiles en el tratamiento de artritis reumatoide, asma y septicemia. Estas pueden desempeñar una función de IL-28 o IL-29 mediando la tumorigénesis, por lo cual un antagonista de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína sería útil en el tratamiento del cáncer. IL-28 o IL-29 pueden ser útiles modulando el sistema

inmunitario, por lo cual los antagonistas de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína pueden usarse para reducir el rechazo de injerto, prevenir la enfermedad de injerto frente a huésped, reforzar la inmunidad contra enfermedades infecciosas, tratar a pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo pacientes VIH⁺) o en la mejora de vacunas.

Se ha observado que los miembros de la familia de las proteínas de la presente invención tienen un efecto antiviral que es similar al del interferón- α . En los Estados Unidos se ha autorizado el interferón para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, condiloma acuminado, hepatitis C crónica, carcinoma de vejiga, carcinoma de cuello uterino, papilomatosis laringea, micosis fungoide, hepatitis B crónica, sarcoma de Kaposi en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, melanoma maligno, leucemia de células pilosas y esclerosis múltiple. Además, puede usarse IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína para tratar formas de aterosclerosis tales, aterosclerosis, inhibiendo la proliferación celular. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva describe el uso de proteínas, polipéptidos y péptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína que tienen actividad IL-28 o IL-29 para tratar dichas afecciones, así como para tratar retinopatía. La memoria descriptiva describe el uso de proteínas, polipéptidos y péptidos IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína que tienen actividad IL-28 o IL-29 contra trastornos linfoproliferativos, incluyendo linfomas de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, linfomas No Hodking, mieloma múltiple, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielocítica crónica.

También se ha observado que los interferones inducen la expresión de antígenos por células cultivadas (véase, por ejemplo Auth y col., Hepatology 18: 546 (1993), Guadagni y col., Int. J. Biol. Markers 9: 53 (1994), Girolomoni y col., Eur. J. Immunol. 25: 2163 (1995), y Maciejewski y col., Blood 85: 3183 (1995). Esta actividad potencia la capacidad de identificar *in vitro* nuevos antígenos asociados a tumores. Además, la capacidad de los interferones para aumentar el nivel de expresión de antígenos tumorales humanos indica que los interferones pueden ser útiles en un entorno adyuvante para inmunoterapia o para potenciar la inmunoescintigrafía usando anticuerpos contra antígenos tumorales (Guadagni y col., Cancer Immunol. Immunother. 26: 222 (1988); Guadagni y col., Int. J. Biol. Markers 9: 53 (1994)). Por tanto, la presente invención incluye el uso de proteínas, polipéptidos y péptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína que tienen actividad IL-28 e IL-29 como un adyuvante para inmunoterapia o para mejorar la inmunoescintigrafía usando anticuerpos contra antígenos tumorales.

La actividad y efecto de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína sobre el avance del tumor y la metástasis puede medirse *in vivo*. Se han desarrollado diversos modelos de ratón singénico para estudiar la influencia de los polipéptidos, compuestos u otros tratamientos sobre el avance del tumor. En estos modelos, las células tumorales que se hacen pasar por cultivos se implantan en ratones de la misma cepa que la del donante del tumor. Las células se desarrollarán en tumores que tienen similares características en los ratones receptores, y la metástasis también se producirá en algunos de los modelos. Los modelos tumorales apropiados para nuestros estudios incluyen, entre otros, el carcinoma pulmonar de Lewis (ATCC N° CRL-1642) y el melanoma B16 (ATCC N° CRL-6323). Estas son dos líneas tumorales normalmente usadas, singénicas para ratón C57BL6, que se cultivan y manipulan fácilmente *in vitro*. Los tumores resultantes del implante de cualquiera de estas líneas celulares pueden metastatizar a los pulmones en ratones C57BL6. El modelo de carcinoma pulmonar de Lewis se ha usado recientemente en ratones para identificar un inhibidor de la angiogénesis (O'Reilly MS, y col. Cell 79: 315-328, 1994). Ratones C57BL6/J se trataron con un agente experimental mediante una inyección diaria de proteína recombinante, agonista o antagonista o una inyección única de adenovirus recombinante. Tres días después de este tratamiento, se implantaron de 10^5 a 10^6 células debajo de la piel del dorso. Como alternativa, las propias células pueden infectarse con adenovirus recombinante, de manera que expresen IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína, antes del implante de tal manera que la proteína se sintetiza en el sitio del tumor o intracelularmente, en lugar de sistémicamente. Los ratones normalmente desarrollan tumores visibles a los 5 días. Se dejan crecer los tumores durante un periodo de hasta 3 semanas, tiempo durante el cual pueden alcanzar un tamaño de 1500 - 1800 mm³ en el grupo tratado con control. El tamaño del tumor y el peso corporal se controlan cuidadosamente a lo largo del experimento. En el momento del sacrificio, el tumor se extirpa y se pesa junto con los pulmones y el hígado. Se ha demostrado que el peso de los pulmones se correlaciona bien con la carga tumoral metastásica. Como una medición adicional, se cuenta la metástasis en la superficie pulmonar. El tumor resecado, los pulmones y el hígado se preparan para el examen histopatológico, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. La influencia del polipéptido expresado en cuestión, por ejemplo IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína, sobre la capacidad del tumor para reclutar vasculatura y experimentar metástasis puede por tanto ensayarse. Por otro lado, además del uso de adenovirus, las células implantadas pueden transfectarse transitoriamente con IL-28 e IL-29 mutante de Cisteína. En la técnica se conoce el uso de transfectantes de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína estables así como el uso de promotores inducibles para activar la expresión de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína *in vivo* y pueden usarse en este sistema para evaluar la inducción de la metástasis. Además, el medio acondicionado de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína puede inyectarse directamente en este modelo de ratón, y por tanto usarse en este sistema. Para una referencia general véase O'Reilly MS, y col. Cell 79: 315-328, 1994; y Rusciano D, y col. Murine Models of Liver Metastasis. Invasion Metastasis 14: 349-361, 1995.

La IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína también puede usarse para tratar la miocarditis, un trastorno que surge cuando el corazón está implicado en un proceso inflamatorio. Se cree que la infiltración de linfocitos y la miocitolisis se producen después de infección por virus, bacterias, hongos o parásitos (véase, por ejemplo Brodison y col., J. Infection 37: 99 (1998)). La IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína puede inyectarse por vía intravenosa o subcutánea para tratar infecciones asociadas con miocarditis. La IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína también puede administrarse

por vía intravenosa como una citocina inmunorreguladora en el tratamiento de miocarditis autoinmune. Las dosificaciones de interferón pueden extrapolarse usando un modelo autoinmune de miocarditis en el ratón A/J (Donermeyer, y col., J. Exp. Med. 182: 1291 (1995)).

Recientes informes han destacado la función de los interferones de tipo I en la prevención de diabetes inducida por virus introduciendo un fuerte estado antiviral en células beta pancreáticas inicialmente durante la infección viral (Flodstroem y col., Nature Immunology 3, 373 - 382 (2002)). Esto impide la pérdida de células beta debido a la muerte celular inducida por virus y a la autoinmunidad que la acompaña. La IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína también induce un estado antiviral en células que expresan el receptor de IL-28. El receptor de IL-28 se expresa a altos niveles en el tejido pancreático y por lo tanto IL-28 e IL-29 pueden desempeñar una función en la prevención de diabetes inducida por virus debido a la muerte de células beta. Además, la función de los interferones de tipo I en la prevención de la diabetes inducida por virus puede extenderse a otras enfermedades autoinmunes inducidas por virus y por lo tanto, IL-28 e IL-29 también pueden desempeñar una función en la prevención de otras enfermedades tales como esclerosis muscular, lupus y enfermedades autoinmunes inducidas por virus en tejidos que expresan el receptor de IL-28.

Los polipéptidos IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes vasculogénicos o angiogénicos, incluyendo el VEGF. Cuando se usa IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína en combinación con un agente adicional, los dos compuestos pueden administrarse simultánea o secuencialmente según sea apropiado para la afección específica que vaya a tratarse.

La IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína será útil en el tratamiento de tumorigénesis y por lo tanto podría ser útil en el tratamiento del cáncer. Una IL-28 puede inhibir líneas tumorales de linfocitos B lo que sugiere que puede tener beneficio terapéutico en el tratamiento de pacientes con IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína para inducir las células tumorales de linfocitos B dentro de un estado menos proliferativo. El ligando podía administrarse en combinación con otros agentes ya en uso incluyendo agentes terapéuticos convencionales así como moduladores inmunes tales como interferón alfa. Se ha demostrado que los interferones alfa/beta son eficaces en el tratamiento de algunas leucemias y en modelos de enfermedades animales y los efectos inhibidores del crecimiento del interferón alfa y de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína pueden ser aditivos para líneas celulares derivadas de tumores de linfocitos B.

La presente memoria descriptiva describe una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido aislado seleccionad del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Para su uso farmacéutico, las proteínas IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína se formulan para la administración tópica o parenteral, particularmente intravenosa o subcutánea, de acuerdo con procedimientos convencionales. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán el polipéptido IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5% en agua o similares. Las formulaciones también pueden incluir uno o más excipientes conservantes, solubilizantes, agentes tamponantes, albúmina para prevenir la pérdida de proteínas en las superficies de los viales, etc. Los procedimientos de formulación son bien conocidos en la técnica y se desvelan, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 19ª ed., 1995. Preferentemente, la IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína se usará a una concentración de aproximadamente 10 a 100 µg/ml de volumen total, aunque también pueden usarse concentraciones en el intervalo de 1 ng/ml a 1000 µg/ml. Para la aplicación tópica, tal como para la promoción de curación de heridas, la proteína se aplicará en el intervalo de 0,1-10 µg/cm² de área herida, determinan el médico la dosis exacta de acuerdo con patrones aceptados, teniendo en cuenta la naturaleza y la gravedad de la afección que vaya a tratarse, las características del paciente etc. La determinación de la dosis se encuentra dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica. La dosificación es diaria o intermitente durante el periodo de tratamiento. La administración intravenosa será mediante inyección o infusión en embolada durante un periodo típico de una a varias horas. También pueden emplearse formulaciones de liberación sostenida. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína es una cantidad suficiente para producir un cambio clínicamente significativo en la afección tratada, tal como un cambio clínicamente significativo en la carga viral o función inmune, una reducción significativa en la morbilidad, o una puntuación histológica significativamente aumentada.

Como una ilustración, las formulaciones farmacéuticas pueden proporcionarse como un kit que comprenda un envase que comprenda un polipéptido de IL-28 o IL-29 de la presente invención. Pueden proporcionarse polipéptidos terapéuticos en forma de una solución inyectable para dosis sencillas o múltiples, o como un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Como alternativa, dicho kit puede incluir un dispensador para polvo seco, un generador de aerosol líquido, o nebulizador para la administración de un polipéptido terapéutico. Dicho kit puede comprender adicionalmente información escrita sobre indicaciones y uso de la composición farmacéutica. Además, dicha información puede incluir un comentario acerca de que la formulación del polipéptido de IL-28 o IL-29 está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida al polipéptido de IL-28 o IL-29.

La presente memoria descriptiva describe un procedimiento para la producción de un anticuerpo contra un polipéptido que comprende: inocular a un animal un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161, en el que el polipéptido suscita una respuesta inmunitaria en el animal para producir el anticuerpo; y aislar el anticuerpo del animal. La presente memoria descriptiva describe un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) producido por el procedimiento desvelado anteriormente, en el que el anticuerpo se une a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161. El anticuerpo desvelado anteriormente puede unirse específicamente un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159 y 161. La presente memoria descriptiva describe un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido como se describe en el presente documento. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo humanizado derivado de un anticuerpo monoclonal murino, un fragmento de anticuerpo y un anticuerpo monoclonal humano. El fragmento de anticuerpo puede ser como se describe en el presente documento, en el que dicho fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en F(ab'), F(ab), Fab', Fab, Pv, scFv y una unidad de reconocimiento mínima.

La presente memoria descriptiva describe un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente al anticuerpo como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión a antígeno de los mismos tales como fragmentos F(ab')₂ y Fab, anticuerpos monocatenarios y similares, incluyendo anticuerpos modificados por ingeniería genética. Los anticuerpos no humanos pueden humanizarse injertando las CDR no humanas en regiones marco conservadas y constantes, o incorporando todos los dominios variables no humanos (opcionalmente "ocultándolos" con una superficie similar a la humana por sustitución de restos expuestos, en el que el resultado es un anticuerpo "cubierto"). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden conservar restos no humanos en los dominios armazón de la región variable humana para potenciar las características de unión adecuadas. A través de la humanización de anticuerpos, puede aumentarse la semivida biológica y reducir las posibles reacciones inmunitarias adversas tras la administración a seres humanos. Un experto en la técnica puede generar anticuerpos humanizados con dominios constantes específicos y diferentes (es decir, subclases de Ig diferentes) para facilitar o inhibir diversas funciones inmunitarias asociadas con dominios constantes de anticuerpos particulares. Se define que los anticuerpos se unen específicamente si se unen al polipéptido o proteína de IL-28 o IL-29 mutante de Cisteína con una afinidad al menos 10 veces mayor que la unión de afinidad al polipéptido o proteína (IL-28 o IL-29 no mutante de Cisteína) control. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la afinidad de un anticuerpo monoclonal (véase, por ejemplo Scatchard, Ann. NY. Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

En la técnica se conocen bien procedimientos para preparar anticuerpos policlonales y monoclonales (véase por ejemplo Hurrell, J. G. R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982, incorporado por referencia en el presente documento). El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una parte de la misma. Para la inmunización, si la parte polipeptídica es de "tipo hapteno", dicha parte puede unirse o ligarse ventajosamente con un transportador macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o toxoide tetánico).

Para detectar anticuerpos que se unan específicamente a los polipéptidos de IL-28 o IL-29 mutantes de Cisteína, puede usarse una diversidad de ensayos conocidos por los expertos en la técnica. En Using Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 se describen con detalle ensayos ejemplares. Como ejemplos representativos de dichos ensayos se incluyen: inmunoelectroforesis concurrente, radioinmunoensayos, radioinmunoprecipitaciones, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos de transferencia puntual, ensayos de transferencia de Western, ensayos de inhibición o competición, ensayos de tipo sándwich.

Para determinadas aplicaciones, incluyendo usos diagnósticos *in vivo* e *in vitro*, es ventajoso el empleo de anticuerpos marcados. Las etiquetas o marcas directas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; las etiquetas o marcadores indirectos pueden contemplar el uso de biotina-avidina u otros pares de complemento/anti-complemento como productos intermedios. Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares y estos conjugados usarse para diagnósticos *in vivo* o aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, inhibición de la proliferación celular). Véase, en general, Ramakrishnan y col., Cancer Res. 56: 1324-11330, 1996.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

Plásmidos de expresión en mamíferos

Mediante recombinación homóloga se construyó un plásmido de expresión que contenía zcyto20 y zcyto21. Se generaron fragmentos de ADNc de zcyto20 y zcyto21 usando amplificación con PCR. Para la PCR se utilizaron los siguientes cebadores:

zcyto20/pZMP21: zc40923 y zc43152 SEC ID Nos: 42 y 43, respectivamente; y zcyto21/pZMP21: zc40922, y zc43153 SEC ID Nos: 2 y 73, respectivamente.

La mezcla de reacción de la PCR se procesó en un gel de agarosa al 1% y se extrajo en gel una banda correspondiente al tamaño del inserto usando un Kit de Extracción en Gel QIAquick™ (Qiagen, Valencia, CA).

El plásmido pZMP21, cortado con BglII, se usó para la recombinación con el fragmento de inserto de la PCR. El plásmido pZMP21 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor del MPSV y sitios de restricción múltiples para la inserción de secuencias codificantes; un origen de replicación de *E. coli*; una unidad de expresión del marcador de selección de mamífero que comprende un promotor del SV40, un potenciador y un origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador del SV40; y secuencias URA3 y CEN-ARS necesarias para la selección y replicación en *S. cerevisiae*. Este se construyó a partir de pZP9 (depositado en la Colección Americana de Cultivo Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el N° de Registro 98668) con los elementos genéticos de levadura extraídos de pRS316 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el N° de Registro 77145), un elemento del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) de poliovirus y el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C terminal del dominio transmembrana.

Independientemente, se combinaron cien microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con 10 µl del inserto de ADN y 100 ng del vector pZMP21 cortado anterior y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2-cm. La mezcla de levadura/ADN se electroimpulsó usando ajustes de suministro energético de 0,75 kV (BioRad Laboratories, Hercules, CA) (5 kV/cm), ∞ ohms y 25 µF. A la cubeta se añadieron seiscientos µl de sorbitol 1,2 M y la levadura se sembró en placa en una alícuota de 100 µl y 300 µl en dos placas URA-D y se incubó a 30 °C. Después de aproximadamente 72 horas, los transformantes de levadura Ura⁺ de una sola placa se resuspendieron en H₂O 1 ml y se centrifugaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 0,5 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Los quinientos microlitros de la mezcla de lisis se añadieron a un tubo Eppendorf que contenía perlas de vidrio lavadas con ácido 250 µl y fenol-cloroformo 300 µl, se sometió a agitación vorticial durante 3 minutos y se centrifugó durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf a máxima velocidad. Trescientos microlitros de la fase acuosa se transfirieron a un tubo limpio y el ADN se precipitó con 600 µl de etanol (EtOH) y 30 µl de acetato sódico 3 M, seguido de centrifugación durante 30 minutos a máxima velocidad. El sedimento de ADN se resuspendió en TE 30 µl.

La transformación de células huésped de *E. coli* electrocompetentes (MC1061) se realizó usando 5 µl de preparación de ADN de levadura y 50 µl de células. Las células se electroimpulsaron a 2,0 kV, 25 µF y 400 ohms. Después de la electroporación, se añadió 1 ml de SOC (Bacto™ Tryptone al 2% (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5% (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) y después las células se sembraron en placas en una alícuota de 50 µl y 200 µl en dos placas AMP LB (caldo LB (Lennox), Bacto™ Agar al 1,8% (Difco), Ampicilina 100 mg/l).

Los insertos de tres clones de cada construcción se sometieron a análisis de secuencia y se seleccionó un clon de cada construcción, que contenía la secuencia correcta. Se aisló ADN plasmídico a gran escala usando un kit disponible en el mercado (QIAGEN Plasmid Mega Kit, Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las construcciones correctas se denominaron zcyto20/pZMP21 y zcyto21/pZMP21.

Ejemplo 2

Expresión de construcciones de mamífero en células CHO

Se digirieron 200 µg de una construcción zcyto20/pZMP21 y zcyto21/pZMP21 con 200 unidades de Pvu I a 37 °C durante tres horas y después se precipitaron con IPA y se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El sobrenadante se decantó del sedimento, y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se dejó incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó en una microcentrífuga durante 10 minutos a 14.000 RPM y el sobrenadante se aspiró del sedimento. Después, el sedimento se resuspendió en 750 µl de medio PF-CHO en un ambiente estéril y se dejó incubando a 60 °C durante 30 minutos. Las células CHO se centrifugaron y se resuspendieron usando la solución de medio-ADN. La mezcla ADN/célula se colocó en una cubeta con un hueco de 0,4 cm y se sometió a electroporación usando los siguientes parámetros: 950 µF, alta capacitancia y 300 V.

Después, el contenido de la cubeta se retiró y se diluyó a 25 ml con medio PF-CHO y se colocó en un matraz de agitación de 125 ml. El matraz se colocó en una incubadora sobre un agitador a 37 °C, CO₂ al 6% y se agitó a 120 RPM.

Ejemplo 3

5 Purificación y análisis de la proteína zcyto20-CHO

A. Purificación de la proteína zcyto20-CHO

La proteína zcyto20 (IL-28A) recombinante se produjo a partir de un grupo de líneas celulares DXB11-CHO. Los cultivos se recogieron y los medios se esterilizaron por filtración usando un filtro de 0,2 µm.

La purificación de la proteína zcyto20-CHO se consiguió mediante el uso secuencial de una columna Poros HS 50 (Applied Biosystems, Framingham, MA), una columna WCX Monolítica (Isco, Inc., Lincoln, NE), una columna ToyoPearl Butyl 650S (TosoH, Montgomeryville, PA) y una columna Superdex 75 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Los medios de cultivo de DXB11-CHO se ajustaron a un pH de 6,0 antes de cargar sobre una columna Poros 50 HS. La columna se lavó con MES (ácido 2-Morfolinetanosulfónico) 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6 y la proteína unida se eluyó con un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna (VC) al 60% de MES 50 mM, NaCl 2 M, pH 6. Las fracciones de elución se recogieron y se confirmó la presencia de la proteína zcyto20 mediante SDS-PAGE con una tinción de Coomassie. Estas fracciones que contenían la proteína zcyto20 se agruparon, se diluyeron con agua destilada doble a una conductividad de aproximadamente 20 mS y se cargaron en una columna WCX Monolítica. La columna se lavó con 93% de MES 50 mM, NaCl, 100 mM, pH 6 y 7% de MES 50 mM, NaCl 2 M, pH 6. La proteína unida se eluyó con un gradiente lineal de 25-VC del 7% al 50% de MES 50 mM, NaCl 2 M, pH 6. Las fracciones de elución se recogieron y se confirmó la presencia de la proteína zcyto20 por SDS-PAGE con una tinción de Coomassie. Las fracciones que contienen la proteína zcyto20 se agruparon, se ajustaron a sulfato amonio 1 M y se cargaron en una columna ToyoPearl Butyl 650S. La Zcyto20 se eluyó con un gradiente en disminución de sulfato de amonio y las fracciones que contenían la zcyto20 pura se agruparon y concentraron para inyección en una columna Superdex 75. Las fracciones que contenían la proteína zcyto20 procedente de la columna de filtración en gel se agruparon se agruparon, se concentraron, se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm y se congelaron a -80 °C. La concentración de la proteína final purificada se determinó mediante un ensayo BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) y análisis de aminoácidos con HPLC.

B. Análisis SDS-PAGE y transferencia de Western de la proteína zcyto20-CHO

La proteína zcyto20 recombinante se analizó por SDS-PAGE (Nupage 4-12% Bis-Tris, Invitrogen, Carlsbad, CA) y transferencia de Western usando, como anticuerpo primario, IgG anti-zcyto21-CEE-BV de conejo que reacciona en cruzado con la proteína zcyto20-CHO. El gel se sometió a electroporación usando mini-cell Xcell II de Invitrogen (Carlsbad, CA) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) usando el módulo de transferencia Xcell II de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el manual del instrumento. La transferencia se procesó a 500 mA durante 50 minutos en un tampón que contenía base Tris 25 mM, glicina 200 mM y metanol al 20%. La membrana se bloqueó con leche en polvo desnatada al 10% en 1 x PBS durante 10 minutos, después se exploró con el anticuerpo primario en 1x PBS que contenía leche desnatada en polvo al 2,5%. La transferencia se marcó durante una hora a temperatura ambiente al mismo tiempo que se agitaba. Para el marcaje con anticuerpo secundario, la transferencia se lavó tres veces con PBS durante 10 minutos cada vez y después se exploró con anti IgG de conejo de cabra conjugado con HRP (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) durante una hora. La transferencia se lavó tres veces con PBS 1x durante 10 minutos cada vez y se reveló usando una mezcla 1:1 de reactivos Super-Signal[®] ULTRA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) y la señal se capturó usando un Lumi-Imager (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania).

C. Resumen de purificación y análisis de la proteína

La proteína zcyto20 purificada del medio CHO migró predominantemente como un doblete a aproximadamente 20 kDa y como un dímero triplete menor a aproximadamente 30 kDa en un gel Bis-Tris al 4-12% en condiciones no reductoras. En condiciones reductoras, todas se colapsaron en una sola banda de 20 kDa. El mapeo peptídico mediante SM (espectrometría de masas) indicó una mezcla de dos isómeros con respecto al enlace disulfuro y la presencia de sitios de glucosilación unidos a N.

Ejemplo 4

50 Purificación y análisis de la proteína zcyto21-CHO

A. Purificación de la proteína zcyto21-CHO

La proteína zcyto21 recombinante se produjo a partir de líneas celulares DXB11-CHO estables. Los cultivos se recogieron y los medios se esterilizaron por filtración usando un filtro de 0,2 µm. Las proteínas se purificaron de los medios acondicionados comenzando con una combinación de cromatografía de intercambio catiónico y aniónico seguido de una cromatografía de interacción hidrófoba y una cromatografía de exclusión por tamaño. Los medios de

cultivo DXB111-CHO se ajustaron a un pH de 6,0 antes de cargar en una columna Poros 50 HS (Applied Biosystems, Framingham, MA). La columna se lavó con 1x PBS, pH 6 y la proteína unida se eluyó con 5x PBS, pH 8,4. La fracción de elución se recogió y la presencia de la proteína zcyto21 se confirmó mediante SDS-PAGE con una tinción de Coomassie. Después, esta fracción se eluyó a una conductividad de 13 mS y su pH se ajustó a 8,4 y se hizo fluir a través de una columna Poros 50 HQ (Applied Biosystems, Framingham, MA). Después, el paso de flujo, que contenía la proteína zcyto21, se ajustó a aproximadamente 127 mS con sulfato de amonio y se cargó en una columna Toyopearl Fenil 650S (TosoH, Montgomeryville, PA). La proteína zcyto21 se eluyó con un gradiente en disminución de sulfato de amonio y las fracciones que contenían la proteína zcyto21 pura se agruparon y se concentraron para inyección en una columna Superdex 75 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La concentración de la proteína purificada final se determinó mediante un ensayo BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) y análisis de aminoácidos con HPLC.

B. Análisis SDS-PAGE y transferencia de Western de la proteína zcyto21-CHO

La proteína zcyto21 recombinante se analizó por SDS-PAGE (Nupage 4-12% Bis-Tris, Invitrogen, Carlsbad, CA) y transferencia de Western usando, como anticuerpo primario, IgG anti-zcyto21-CEE-BV de conejo. El gel se sometió a electroporación usando mini-cell Xcell II de Invitrogen (Carlsbad, CA) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) usando un módulo de transferencia Xcell II de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el manual del instrumento. La transferencia se realizó a 500 mA durante 50 minutos en un tampón que contenía base Tris 25 mM, glicina 200 mM y metanol al 20%. La transferencia transferida se bloqueó con leche en polvo desnatada al 10% en 1 x PBS durante 10 minutos y después se exploró con el anticuerpo primario en 1x PBS que contenía leche en polvo desnatada al 2,5%. La transferencia se marcó durante una hora a temperatura ambiente al mismo tiempo que se agitaba. Para el marcaje del anticuerpo secundario, la transferencia se lavó tres veces durante 10 minutos cada vez con PBS y después se exploró con anti IgG-HRP de conejo de cabra conjugado con HRP (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) durante una hora. La transferencia se lavó tres veces con 1x PBS durante 10 minutos cada vez y se reveló usando una mezcla 1:1 de reactivos Super-Signal® ULTRA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) y la señal se capturó usando un Lumi-Imager (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania).

C. Resumen de purificación y análisis de la proteína

La proteína zcyto21 purificada del medio CHO migró como dos o más bandas de aproximadamente 28 kDa en un gel Bis-Tris 4-12% en condiciones reductoras y no reductoras. El mapeo peptídico mediante SM indicó una mezcla de dos isómeros con respecto al enlace disulfuro y la presencia de un sitio de glucosilación unido a N y diversos sitios de glucosilación unidos a O.

Ejemplo 5

Identificación de formas de IL-29

Fracciones máximas de grupos purificados de IL-29 se digirieron durante una noche a 37 °C con tripsina de calidad secuenciadora (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) en tampón fosfato a aproximadamente pH 6,3 para limitar el reordenamiento disulfuro. Cada digestión se analizó mediante HPLC de fase inversa (Agilent, Palo Alto, CA), conectada en línea a un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-tiempo vuelo (Micromass, Milford MA). Los espectros se recogieron, se convirtieron de masa a una proporción de carga con respecto a masa y se compararon con todos los péptidos teóricos y con las combinaciones peptídicas unidas por enlaces disulfuro resultantes de la digestión de IL-29 con tripsina. Los enlaces disulfuro se asignaron comparando los espectros antes y después de la reducción con una asignación de masas apropiadas con respecto a los péptidos unidos por enlaces disulfuro en IL-29. El material de la fracción N° 20 mostró el patrón de enlace disulfuro C15 - C112 y C49 - C145 observándose C171 como una S-glutationil cisteína (refiriéndose todo a la SEC ID N°: 4). El material de la fracción N° 51 mostró el patrón de enlace disulfuro C49 - C145 y C112 - C171 observándose C15 como una S-glutationil cisteína (refiriéndose a la SEC ID N°: 4).

Ejemplo 6

Plásmidos de expresión en *E. coli*

Construcción del vector de expresión, pTAP237

El plásmido pTAP237 se generó insertando un engarce generado por PCR en el sitio SmaI de pTAP186 por recombinación homóloga. El plásmido pTAP186 derivaba de los plásmidos pRS316 (un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae*) y pMAL-c2, un plásmido de expresión de *E. coli* derivado de pKK223-3 y que comprende el promotor *tac* y el terminador *rrnB*. El plásmido pTAP186 contiene un gen de resistencia a kanamicina en el cual el sitio SmaI se ha destruido y tiene sitios NotI y SfiI flanqueando las secuencias ARS-CEN6 y URA3 de levadura, facilitando su eliminación del plásmido por digestión con NotI. El engarce generado por PCR reemplazó la secuencia acopladora de expresión en pTAP186 con la secuencia RBS II sintética. Se preparó a partir de 100 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos zc29,740 y zc29,741, como se muestra en las SEC ID Nos: 44 y 45, respectivamente, y aproximadamente 5 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos zc29,736 y zc29,738, como se

muestra en las SEC ID Nos: 46 y 47, respectivamente. Estos oligonucleótidos se combinaron por PCR durante diez ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, seguido por inmersión a 4 °C. Los productos PCR resultantes se concentraron por precipitación con dos veces el volumen de etanol al 100%. El sedimento se resuspendió en 10 µl de agua para usar para recombinar en el vector receptor pTAP186 digerido con SmaI para producir la construcción que contiene la secuencia RBS II sintética. Aproximadamente 1 µg del engarce generado por PCR y 100 ng de pTAP186 digerido con SmaI se mezclaron entre sí y se transformaron en células de levadura competentes (*S. cerevisiae*). Después, la levadura se sembró en placas -URA D y se dejó a temperatura ambiente durante aproximadamente 72 horas. Después los transformantes Ura⁺ de una sola placa se resuspendieron en H₂O 1 ml y se centrifugó brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 0,5 ml de tampón de lisis. El ADN se recuperó y se transformó en MC1061 de *E. coli*. Los clones se exploraron mediante PCR de colonias como se desvela anteriormente usando 20 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos zc29,740 y zc29,741, como se muestra en las SEC ID Nos: 44 y 45, respectivamente. Los clones que presentaban la banda de tamaño correcto en un gel de agarosa se sometieron a análisis de secuencia. El plásmido correcto se denominó pTAP237.

Ejemplo 7

Optimización de codones de la IL-29 mutante de cisteína

A. Generación de las construcciones de expresión naturales de IL-29 por optimización de codones

La secuencia del gen IL-29 humano natural no se expresó bien en la cepa W3110 de *E. coli*. El examen de los codones usados en la secuencia codificante de IL-29 indica que esta contiene un exceso de los últimos codones frecuentemente usados en *E. coli* con un valor CAI igual a 0,206. El CAI es una medida estadística de sesgo de codón sinónimo y puede usarse para predecir el nivel de producción de proteínas (Sharp y col., Nucleic Acids Res. 15(3): 1281-95, 1987). Los genes que codifican proteínas altamente expresadas tienden a tener valores CAI elevados (>0,6), mientras que las proteínas codificadas por genes con valores CAI bajos (≤0,2) generalmente se expresan de un modo ineficaz. Esto sugiere una razón de la mala producción de IL-29 en *E. coli*. Adicionalmente, los codones poco frecuentes se agrupan en una segunda mitad del mensaje lo que conduce a una mayor probabilidad de parada traduccional, terminación prematura de la traducción e incorporación errónea de aminoácidos (Kane JF. Curr. Spin. Biotechnol. 6(5): 494-500, 1995).

Se ha demostrado que el nivel de expresión de proteínas cuyos genes contienen codones poco frecuentes puede mejorarse enormemente cuando el nivel de determinados ARNt poco frecuentes aumenta en el huésped (Zdanovsky y col., Applied Environmental Microb. 66: 3166-3173, 2000; You y col., Biotechniques 27: 950-954, 1999). El plásmido pRARE lleva genes que codifican los ARNt de diversos codones que rara vez se usan en *E. coli* (argU, argW, leuW, proL, ileX y glyT). Los genes están bajo el control de sus promotores naturales (Novy, citado anteriormente). La coexpresión con pRARE potenció la producción de IL-29 en *E. coli* y produjo aproximadamente 200 mg/l. Estos datos sugieren re-sintetizando el gen que codifica IL-29 con un uso de codón más apropiado se proporciona un vector mejorado para la expresión de grandes cantidades de IL-29.

La secuencia codificante de IL-29 optimizada por codones se construyó a partir de dieciséis oligonucleótidos solapantes: zc44,566 (SEC ID N°: 48), zc44,565 (SEC ID N°: 49), zc44,564 (SEC ID N°: 50), zc44,563 (SEC ID N°: 51), zc44,562 (SEC ID N°: 52), zc44,561 (SEC ID N°: 53), zc44,560 (SEC ID N°: 54), zc44,559 (SEC ID N°: 55), zc44,558 (SEC ID N°: 56), zc44,557 (SEC ID N°: 57). La extensión del cebador de estos oligonucleótidos solapantes seguido por amplificación PCR produjo un gen de IL-29 de longitud completa con codones optimizados para la expresión en *E. coli*. El producto PCR final se insertó en el vector de expresión pTAP237 por recombinación homóloga de la levadura. La construcción de expresión se extrajo de la levadura y se transformó en MC1061 de *E. coli* competente. Se identificaron clones resistentes a kanamicina se identificó por PCR de colonias. Se verificó un clon positivo por secuenciación y posteriormente se transformó en la cepa huésped de producción W3110. El vector de expresión con la secuencia IL-29 optimizada se denominó pSDH184. El gen resultante se expresó muy bien en *E. coli*, aumentando los niveles de expresión con la nueva construcción a aproximadamente 250 mg/l.

B. Generación de la construcción de expresión del mutante de cisteína C172S de zcyto21 optimizada por codones

La estrategia usada para generar el mutante de Cisteína C172S de zcyto21 se basa en el Kit de Mutagénesis Dirigida QuikChange (Stratagene). Se diseñaron cebadores para introducir la mutación C172S en base a las recomendaciones del fabricante. Estos cebadores se denominaron ZG44,340 (SEC ID N°: 58) y ZG44,341 (SEC ID N°: 59). Se realizó PCR para generar el mutante de Cisteína C172S de zcyto21 de acuerdo con las instrucciones de Mutagénesis QuikChange. Se establecieron cinco reacciones de 50 µl idénticas. Como molde para la reacción se usaron 2,5 µl de ADN (secuencia estructural del vector de levadura ausente) de pSDH175. Se preparó un cóctel de PCR usando las siguientes cantidades de reactivos: 10 x de tampón PCR 30 µl, ZG44,340 125 ng (27,42 ml), ZG44,341 125 ng (9,18 ml), dNTP 6 µl, Pfu Turbo polimerasa 6 µl (Stratagene, La Jolla, CA) y agua 206,4 µl. En cada reacción, 47,5 µl del cóctel se dividieron en alícuotas. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 95 °C durante 30 segundos seguido de 16 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 1 minuto, 68 °C durante 7 minutos, seguido de un ciclo a 68 °C durante 7 minutos, y finalmente con un mantenimiento a 4 °C. Las cinco reacciones PCR se consolidaron en un tubo. Siguiendo las instrucciones del fabricante, a la reacción PCR, se

añadieron 5 µl de la enzima de restricción DpnI y se incubó a 37 °C durante 2 horas. El ADN se precipitó añadiendo Acetato Sódico 3 Molar al 10% y dos volúmenes de etanol al 100%. La precipitación se realizó a -20 °C durante 20 minutos. El ADN se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos y el sedimento se secó al vacío con velocidad. El sedimento de ADN se resuspendió en 20 µl de agua. El ADN resultante de la PCR se transformó en la cepa DH10B de *E. coli*. Se mezclaron 5 µl de ADN con 40 µl de células DH10B ElectroMAX (Invitrogen). Después, la mezcla de células y ADN se sometió a electroporación en una cubeta de 0,1 cm (Bio-Rad) usando un Gene Pulser II™ de Bio-Rad establecido a 1,75 kV, 100 Ω y 25 µF. Después, las células electroporadas se cultivaron a 37 °C durante 1 hora. La mezcla se sembró en placas en una placa con kanamicina 25 µg/ml + LB y se incubó a 37 °C durante una noche. Se exploraron 10 clones para determinar la presencia del inserto C172S de zcyto21. El ADN se aisló de los diez clones usando el Kit de QIAprep™ Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA) y se analizó para determinar la presencia del inserto cortando con las enzimas de restricción XbaI y PstI. Nueve clones contenían el inserto y se secuenciaron para garantizar que la mutación C172S de zcyto21 se había introducido. Se confirmó la secuencia de un clon y posteriormente se marcó como pSDH188.

Ejemplo 8

Construcción de expresión de IL-29 en *E. coli*

Usando PCR se aisló un fragmento de ADN de IL-29 que contenía la secuencia natural. En la reacción se usaron los cebadores zc41,212 (SEC ID N°: 60) que contenían 41 pares de bases (pb) de la secuencia flanqueante del vector y 24 pb correspondientes al extremo amino de IL-29, y el cebador zc41,041 (SEC ID N°: 61) que contenía 38 pb correspondientes al extremo 3' del vector que contenía el inserto de zcyto21. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto; seguido de una inmersión a 4 °C. Para el análisis, se procesó una pequeña muestra (2-4 µl) de la muestra de la PCR sobre un gel de agarosa al 1% con tampón TBE 1X y se observó la banda esperada de un fragmento de aproximadamente 500 pb. El volumen restante de los 100 µl de reacción se precipitó con etanol absoluto 200 µl. El sedimento se resuspendió en 10 µl de agua para usarse para recombinar en el vector receptor pTAP238 cortado con SmaI para producir la construcción que codifica zcyto21 como se ha descrito anteriormente. El clon con la secuencia correcta se denominó pTAP377. El clon pTAP377 se digirió con NotI/NcoI (ADN 10 µl, tampón 3 New England BioLabs 5 µl, NotI 2 µl, NcoI 2 µl, agua 31 µl durante 1 hora a 37 °C) y volvió a ligarse con tampón ADN ligasa de T4 (7 µl de la digestión previa, 2 µl de tampón 5X, 1 µl de ADN ligasa de T4). Esta etapa eliminó la secuencia de levadura, CEN-ARS, para simplificar el vector. El ADN de pTAP377 se digirió de un modo diagnosticable con Pvu2 y Pst1 para confirmar la ausencia de la secuencia de levadura. El ADN de pTAP377 se transformó en la cepa W3110/pRARE de *E. coli*, una cepa huésped portadora de copias extra de genes de ARNt de *E. coli* poco frecuentes.

Ejemplo 9

Construcción de expresión de IL-28A en *E. coli*

Usando PCR se aisló un fragmento de ADN que contenía la secuencia natural de zcyto20 (como se muestra en la SEC ID N°: 1). Los cebadores zc43,431 (SEC ID N°: 62) contenían 41 pb de la secuencia flanqueante del vector y 24 pb correspondientes al extremo amino de zcyto20 y el cebador zc43,437 (SEC ID N°: 63) contenía 38 pb correspondientes al extremo 3' del vector que contenía el inserto zcyto20. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto; seguido de una inmersión a 4 °C. Para el análisis, se procesó una pequeña muestra (2-4 µl) de la muestra de la PCR sobre un gel de agarosa al 1% con tampón TBE 1X y se observó la banda esperada de un fragmento de aproximadamente 500 pb. El volumen restante de los 100 µl de reacción se precipitó con etanol absoluto 200 µl. El sedimento se resuspendió en 10 µl de agua para usarse para recombinar en el vector receptor pTAP238 cortado con SmaI para producir la construcción que codifica zcyto20 como se ha descrito anteriormente. El clon con la secuencia correcta se denominó pYEL7. Este se digirió con NotI/NcoI (ADN 10 µl, tampón 3 New England BioLabs 5 µl, NotI 2 µl, NcoI 2 µl, agua 31 µl durante 1 hora a 37 °C) y volvió a ligarse con tampón ADN ligasa de T4 (7 µl de la digestión previa, 2 µl de tampón 5X, 1 µl de ADN ligasa de T4). Esta etapa eliminó la secuencia de la levadura CEN-ARS, para simplificar el vector. El ADN de pYEL377 religado se digirió de un modo diagnosticable con Pvu2 y Pst1 para confirmar la ausencia de la secuencia de la levadura. El ADN de pYEL7 se transformó en la cepa W3110/pRARE de *E. coli*.

Ejemplo 10

Construcción de expresión del mutante de Cisteína C172S de zcyto21

La estrategia usada para generar el mutante de Cisteína C172S de zcyto21 (SEC ID N°: 28) se basa en el Kit de Mutagénesis Dirigida Quik-Change® (Stratagene, La Jolla, CA). Se diseñaron cebadores para introducir la mutación C172S en base a las recomendaciones del fabricante. Estos cebadores se denominaron ZG44,327 y ZG44,328 (SEC ID N°: 64 y 65, respectivamente). Se realizó PCR para generar el mutante de Cisteína C172S de zcyto21 de acuerdo con las instrucciones de Mutagénesis de QuikChange. Como molde para la reacción se usaron 2,5 µl de ADN (secuencia estructural del vector de levadura ausente) de pTAP377. Se preparó un coctel PCR usando las

siguientes cantidades de reactivos: 10 x de tampón PCR 30 µl, ZG44,327 125 ng (27,42 µl) (SEC ID N°: 64), ZG44,328 125 ng (9,18 µl) (SEC ID N°: 65), dNTP 6 µl, Pfu Turbo polimerasa 6 µl (Stratagene), y agua 206,4 µl. En cada reacción, 47,5 µl del coctel se dividió en alícuotas. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 95 °C durante 30 segundos seguido por 16 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 1 minuto, 68 °C durante 7 minutos, seguido por un ciclo a 68 °C durante 7 minutos y finalizando con un mantenimiento a 4 °C. Las cinco reacciones PCR se consolidaron en un tubo. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron 5 µl de enzima de restricción DpnI a la reacción PCR y se incubó a 37 °C durante 2 horas. El ADN se precipitó añadiendo Acetato Sódico 3 Molar al 10% y dos volúmenes de etanol al 100% (Aaper Alcohol, Shelbyville, KY). La precipitación se realizó a -20 °C durante 20 minutos. El ADN se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos y el sedimento se secó al vacío con velocidad. El sedimento de ADN se resuspendió en agua 20 µl. El ADN resultante de la PCR se transformó en la cepa DH10B de *E.coli*. Se mezclaron 5 µl de ADN con 40 µl de células DH10B ElectroMAX (Invitrogen Carlsbad, CA). Después, la mezcla de células y ADN se sometió a electroporación en una cubeta de 0,1 cm (Bio-Rad Hercules, CA) usando un Gene Pulser II™ de Bio-Rad establecido a 1,75 kV, 100 Ω y 25 µF. Después, las células electroporadas se cultivaron a 37 °C durante 1 hora. La mezcla se sembró en placas en una placa con kanamicina 25 µg/ml + LB y se incubó a 37 °C durante una noche. Se exploraron 10 clones para determinar la presencia del inserto IL-29. El ADN se aisló de los diez clones usando el Kit Spin Miniprep de QIAprep™ (Qiagen) y se analizó para determinar la presencia del inserto cortando con las enzimas de restricción XbaI (Roche) y PstI (New England Biolabs). Nueve clones contenían el inserto y se secuenciaron para garantizar que se había introducido la mutación C172S de *zcyto21*. Se verificó la secuencia de un clon (aislado N° 6) y posteriormente se marcó como pSDH171. Para generar un mutante C15S de *zcyto21* puede implementarse una estrategia similar.

Ejemplo 11

Construcción de expresión del mutante de Cisteína C49S de *zcyto20*

La secuencia codificante del mutante de Cisteína C49S de *zcyto20* se generó mediante PCR solapada (SEC ID N°: 20). Las primeras 187 bases de la secuencia de IL-28A natural (SEC ID N°: 1) se generaron por amplificación con PCR usando, como molde, pYEL7 (SEC ID N°: 67) y los cebadores oligonucleotídicos *zc43,431* (SEC ID N°: 62) y *zc45,399* (SEC ID N°: 66). El segundo fragmento de ADN desde la base 105 a la 531 se generó por amplificación con PCR usando, como molde, pYEL7 (SEC ID N°: 67) y los cebadores oligonucleotídicos *zc45,398* (SEC ID N°: 68) y *zc43,437* (SEC ID N°: 63). Los cebadores *zc45,399* (SEC ID N°: 66) y *zc45,398* (SEC ID N°: 68) contenían la secuencia modificada específica que cambió la cisteína 49 a una serina. Estos dos productos de la PCR se combinaron y se amplificaron mediante PCR solapada usando los cebadores oligonucleotídicos *zc43,431* (SEC ID N°: 62) y *zc43,437* (SEC ID N°: 63). El producto PCR final se insertó en el vector de expresión pTAP238 por recombinación homóloga de levaduras (Raymond y col. Biotechniques. Enero 26(1): 134-8, 140-1, 1999). La construcción de expresión se extrajo de la levadura y se transformó en la cepa competente DH10B de *E. coli*. Los clones resistentes a kanamicina se exploraron por PCR para colonias. Se verificó un clon positivo por secuenciación y posteriormente se transformó en la cepa huésped de producción W3110/pRARE. La construcción de expresión con la secuencia codificante del mutante de Cisteína C49S de *zcyto20* se denominó pCHAN9.

Ejemplo 12

Construcción de expresión del mutante Cisteína C51S de *zcyto20*

La secuencia codificante del mutante de Cisteína C51S de *zcyto20* se generó por PCR solapada (SEC ID N°: 24). Las primeras 193 bases de la secuencia de IL-28 natural se generaron por amplificación con PCR usando, como molde, pYEL7 (SEC ID N°: 67) y los cebadores oligonucleotídicos *zc43,431* (SEC ID N°: 62) y *zc45,397* (SEC ID N°: 63). El segundo fragmento de ADN desde la base 111 a la 531 se generó por amplificación con PCR usando, como molde, pYEL7 (SEC ID N°: 67) y los cebadores oligonucleotídicos *zc45,396* (SEC ID N°: 70) y *zc43,437* (SEC ID N°: 63). Los cebadores *zc45,397* (SEC ID N°: 69) y *zc45,396* (SEC ID N°: 70) contenían la secuencia modificada específica que cambió la cisteína 51 a una serina. Estos dos productos de la PCR se combinaron y se amplificaron mediante PCR solapada usando los cebadores oligonucleotídicos *zc43,431* (SEC ID N°: 62) y *zc43,437* (SEC ID N°: 63). El producto PCR final se insertó en nuestro vector de expresión de uso interno pTAP238 por recombinación homóloga de levaduras (Raymond y col. citado anteriormente). La construcción de expresión se extrajo de la levadura y se transformó en la cepa competente DH10B de *E. coli*. Los clones resistentes a kanamicina se exploraron por PCR para colonias. Se verificó un clon positivo por secuenciación y posteriormente se transformó en la cepa huésped de producción W3110/pRARE. La construcción de expresión con la secuencia codificante del mutante de Cisteína C50S de *zcyto20* se denominó pCHAN10.

Ejemplo 13

Expresión de mutantes de Cisteína de IL-28A, IL-29 y Cys a Ser en *E. coli*

En experimentos diferentes, *E. coli* transformadas con cada uno de los vectores de expresión descritos en los Ejemplos 6-9 se inocularon, en medio Superbroth II 100 ml (Becton Dickinson, San Diego, CA), con Antifoam 289 al 0,01% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), kanamicina 30 µg/ml, cloramfenicol 35 µg/ml y se cultivaron durante una noche a 37 °C. Se añadió un inóculo de 5 ml a 500 ml del mismo medio en un matraz de cultivo de 2 l que se agitó a

250 rpm a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una DO600 de 4. Después se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y la agitación continuó durante 2,5 horas más. Las células se centrifugaron a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Los sedimentos celulares se congelaron a -80 °C hasta su uso en un momento posterior.

Ejemplo 14

5 Replegamiento y purificación de IL-28

A. Preparación de cuerpos de inclusión

La IL-29 natural humana se expresó en la cepa W3110 de *E. coli* como cuerpos de inclusión como se ha descrito anteriormente. Un sedimento celular de una fermentación de alimentación discontinua se resuspendió en Tris 50 mM, pH 7,3. La suspensión se pasó a través de un homogeneizador APV-Gaulin (Invensys APV, Tonawanda, Nueva York) tres veces a 8000 psi. El material insoluble se recuperó por centrifugación a 15.000 g durante 30 minutos. El sedimento se lavó de manera consecutiva con Tris 50 mM, Triton X100 al 1% (v/v), pH 7,3 y Urea 4 M. Después, los cuerpos de inclusión se dispersaron en Tris 50 mM, clorhidrato de guanidina 6 M, DTT 5 mM a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, el material se centrifugó a 15.000 g durante 1 hora. El sobrenadante de esta etapa contiene IL-29 soluble reducida.

15 B. Replegamiento

La IL-29 solubilizada se disolvió lentamente en Tris 50 mM, pH 8, Arginina 0,75 M, PEG3350 al 0,05%, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, KCl 0,4 mM, NaCl 10 mM, Glutación reducido 4 mM, Glutación oxidado 0,8 mM a temperatura ambiente agitando al mismo tiempo. La concentración final de IL-29 en el tampón de replegamiento fue de 0,1 mg/ml. La mezcla de replegamiento se dejó a temperatura ambiente durante una noche. Después se usó ácido acético concentrado para ajustar el pH de la suspensión a 5. Después la suspensión se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. El análisis RP-HPLC de la mezcla de replegamiento mostró dos picos prominentes.

C. Purificación

La mezcla de replegamiento se diluyó en línea (1:2) con NaOAc 50 mM a pH 5 y se cargó en una columna de intercambio catiónico Sepharose Fast Flow de Pharmacia SP (North Peapack, NJ). La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de NaOAc 50 mM, NaCl 400 mM, pH 5. La IL-29 unida se eluyó con NaOAc 50 mM, NaCl 1,4 M, pH 5. Se añadió (NH₄)₂SO₄ sólido al conjunto eluido de la etapa de intercambio catiónico de tal manera que la concentración final de (NH₄)₂SO₄ fuese de 0,5 M. Después, el material se cargó en una columna HIC ToyoPearl Fenil 650S (Tosoh Biosep, Montgomery, PA). Después la columna se lavó con 3 volúmenes de columna de NaOAc 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 1 M, pH 5. Se usó un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna de NaOAc 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 1 M, pH 5 a NaOAc 50 mM, pH 5 para eluir la zcyto21 unida. Las fracciones se recogieron del eluido. En esta etapa se observaron dos picos prominentes. Se realizó análisis RP-HPLC de las fracciones eluidas. Se produjeron dos productos correspondientes a dos isómeros con enlace disulfuro después de un intercambio final de tampón en PBS, pH 7,3.

Ejemplo 15

35 Replegamiento y purificación del mutante de Cisteína de IL-29

Como se describe en el Ejemplo 3, la purificación de IL-29 produjo dos isómeros con enlace disulfuro. Se empleó una etapa de HIC FPLC para separar las dos formas. La separación no se resolvió inicialmente. Tuvo que usarse "amortiguación de picos" ("Peak Shaving") intensa para obtener isómeros sustancialmente puros (>95%). El rendimiento de esta etapa y por extensión de todo el proceso sufrió. Los rendimientos finales fueron de 8% y 9% para la forma C15-C112 y para la forma C112-C171 respectivamente. La IL-29 natural producida en CHO y sistemas de baculovirus (BV) también mostró un fenómeno similar. Se estableció que la forma C15-C112 del isómero es homóloga en cuanto a los patrones de enlaces disulfuro con respecto a los INF de tipo I. La forma C15-C112 también demostró una bioactividad 30 veces superior en comparación con la forma C112-C171 en un ensayo ISRE (véase más adelante).

45 Replegamiento y purificación de la muteína Cys172Ser de zcyto21

La preparación de cuerpos de inclusión, el replegamiento y la purificación del polipéptido C172S de zcyto21 (SEC ID N°: 29) es esencialmente igual que la de la IL-29 natural (SEC ID N°: 4). El análisis RP-HPLC de la mezcla de replegamiento de la muteína mostró solo un pico prominente correspondiente a la forma C15-C112 de la IL-29 natural. Una cromatografía HIC (de interacción hidrofoba) posterior mostró solo un pico sencillo. Por lo tanto no fue necesario emplear "amortiguación de picos" intensa. El rendimiento final de todo el proceso es casi del 50%. El polipéptido Cys172Ser de zcyto21 (SEC ID N°: 29) mostró una bioactividad equivalente a la de la forma C15-C112 de la IL-29 natural en el ensayo ISRE mostrado en el Ejemplo 16.

Ejemplo 16Actividad antiviral: efecto citopático en células HeLa y L929

Se realizaron ensayos funcionales iniciales para determinar la actividad antiviral usando medios acondicionados de células renales embrionarias humanas (HEK, *human embryonal kidney*) transfectadas de manera transitoria. La producción de este medio acondicionado se describe de la siguiente manera. Usando procedimientos convencionales, se clonó un ADNc de longitud completa de IL-28A, IL-28B o IL-29 humano o murino en el vector pzp7Z. Las construcciones IL-28A, IL-28B o IL-29 humana o murina se transfectaron en células HEK 293. En resumen, para cada construcción se sembraron en placas 700.000 células/pocillo (placas de 6 pocillos) aproximadamente 18 h antes de la transfección en DMEM 2 milímetros + suero bovino fetal al 10%. Por pocillo, 1,5 microgramos de ADN de IL-28A, IL-28B o IL-29 humano o murino y 0,5 microgramos de ADN de pIRES2-EGFP (Clontech) se añadieron a 6 microlitros de reactivo Fugene 6 (Roche Biochemicals) en un total de 100 microlitros de DMEM. Como control negativo, se usaron solo dos microorganismos de ADN de pIRES2-EGFP. Estas mezclas de transfección se añadieron 30 minutos después a las células 293 previamente sembradas en placas. Veinticuatro horas después los medios celulares se retiraron y se añadió DMEM + albúmina de suero bovino al 0,1%. Los medios acondicionados se recogieron después de 48 horas, se filtraron a través de un filtro de 0,45 micrómetros y se usaron en los ensayos antivirales e indicadores.

Se realizaron ensayos antivirales usando células de carcinoma cervicouterino humano (HeLa) y células fibroblásticas de ratón (L929). El primer día, el medio acondicionado que contenía IL-28A, IL-28B o IL-29 humana o murina se diluyó y se sembró en placas con 50.000 células en una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos. Después de una incubación de 24 horas a 37 °C, el medio se retiró y sustituyó por medio que contenía virus de la encefalomiocarditis a una multiplicidad de infección de 0,1. Las células se incubaron de nuevo durante 24 horas a 37 °C. Después los pocillos de cultivo se puntuaron visualmente en una escala de 4 puntos para determinar la presencia de efectos citopáticos, que después se convirtieron a %CPE como se muestra en la Tabla 7. Como control, se incluyó medio acondicionado procedente de las células transfectadas solo con GFP e interferón α -2a humano o interferón alfa murino purificado.

Tabla 7: Determinación del Efecto Citopático

Designación	Observación del Efecto Citopático (CPE)
-	Sin CPE
+/-	Posible CPE (aproximadamente 1% de superficie monocapa)
+	CPE limitado a una placa (aproximadamente 5% de la superficie)
+1	CPE limitado a tres placas, afectando a menos del 25% de la monocapa
1	CPE 25%
1-2	CPE 37%
2	CPE 50%
2-3	CPE 62%
3	CPE 75%
3-4	CPE 87%
4	CPE 100%

La Tabla 8 muestra que el medio acondicionado que contiene IL-28A, IL-28B o IL-29 humana o murina inhibió la infección viral (%CPE) en células HeLa de una manera dependiente de la dosis, mientras que el medio acondicionado, control con GFP, no bloqueó significativamente la presencia del efecto citopático. Como se muestra en la Tabla 9, el medio acondicionado que contiene IL-28A, IL-28B o IL-29 humana o murina no inhibió la infección viral en células L929. En ambos experimentos el interferón purificado mostró actividad antiviral positiva.

Tabla 8: Porcentaje del Efecto Citopático de IL-28A, IL-28B o IL-29 humana o murina en Células HeLa usando Medio Acondicionado (MA)

Concentración Relativa de MA	Control con GFP	zcyto20 IL-29 (MA)	zcyto21 IL-28A (MA)	zcyto22 IL-28B (MA)	zcyto24 de ratón IL-28 (MA)	zcyto25 de ratón IL-28 (MA)	hIFN-a-2a	Concentración de hIFN- α -2a
No añadido	87	87	87	87	87	87	87	0 ng/ml
0,008X	87	10	56	0	0	10	15	0,0001 ng/ml
0,0156X	87	2,5	31	0	0	5	8,3	0,001 ng/ml
0,0325X	87	5	10	0	0	5	1,7	0,01 ng/ml
0,0625X	87	2,5	10	0	0	0	0	0,1 ng/ml
0,125X	87	0	5	0	0	0	0	1 ng/ml
0,25X	87	0	0	0	0	0	0	10 ng/ml
0,5X	87	0	0	0	0	0	0	100 ng/ml

Tabla 9: Porcentaje del Efecto Citopático de IL-28A, IL-28B o IL-29 humana o murina en Células L929 usando Medio Acondicionado (MA)

Concentración Relativa de MA	Control con GFP	zcyto20 (MA)	zcyto21 (MA)	zcyto22 (MA)	zcyto24 (MA)	zcyto25 (MA)	mIFN-alfa	Concentración de mIFN-alfa
No añadido	87	87	87	87	87	87	87	0 ng/ml
0,008X	87	87	87	87	87	87	87	0,0001 ng/ml
0,0156X	87	87	87	87	87	87	87	0,001 ng/ml
0,0325X	87	87	87	87	87	87	87	0,01 ng/ml
0,0625X	87	87	87	87	87	87	58	0,1 ng/ml
0,125X	87	87	87	87	87	87	6,7	1 ng/ml
0,25X	87	87	87	87	87	87	0	10 ng/ml
0,5X	87	87	87	87	87	87	0	100 ng/ml

Ejemplo 17

Señalización mediante la ruta de respuesta a interferón

- La interacción de interferones de tipo 1 con su receptor específico conduce a la inducción de diversos genes responsables de su actividad antiviral/antiproliferativa. Esto incluye 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2-5 OAS), Pkr quinasa (Pkr) dependiente de ARN bicatenario, escramblasa fosfolipídica y molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1). También se produce la inducción de genes con una función aún desconocida, tal como un producto génico estimulado por interferón de 56 kDa (ISG-56k). Para determinar si alguno de estos genes, o todos, se inducían después del tratamiento de las células con IL-28A, se trataron células linfoides B Daudi humanas durante 72 horas con medio acondicionado procedente de células Sf9 infectadas con baculovirus que expresaban IL-28A. El medio acondicionado procedente de células Sf9 infectadas con baculovirus natural se usó como un control negativo. Después del tratamiento, las células se recogieron y se lisaron para el aislamiento del ARN total. Un microgramo de ARN total se convirtió a ADNc usando transcriptasa inversa y se usó como un molde para la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores oligonucleotídicos específicos de genes estimulados por interferón humano descritos anteriormente. Se usaron cebadores oligonucleotídicos para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa humana (G3PDH) como un control de genes no estimulados con interferón. Los resultados muestran una clara inducción de ISG-56k, Pkr, 2-5 OAS y escramblasa fosfolipídica después del tratamiento de células con IL-28A. No se observó inducción para ICAM-1 o para el control de genes no estimulados con interferón, G3PDH.

Ejemplo 18Ensayo indicador de transducción de señal

Se usó un ensayo indicador de traducción de señal para determinar la interacción funcional de IL-28 e IL-29 humana y de ratón con el receptor de IL-28. Se transfectaron células renales embrionarias humanas (HEK) con un plásmido indicador que contenía un elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE) que dirigía la transcripción de un gen indicador de luciferasa en presencia o en ausencia de los vectores de expresión pZP7 que contenían los ADNc de los receptores de citocina de clase II (incluyendo el receptor DIRS1 humano, IFN α R1, IFN α R2 e IL-28). La actividad luciferasa después de la estimulación de las células transfectadas con ligandos de clase II (incluyendo IL-28A (SEC ID N°: 2), IL-29 (SEC ID N°: 4), IL-28B (SEC ID N°: 6), zcyto10, huIL10 y huIFNa-2a) refleja la interacción del ligando con receptores de citocina transfectados y naturales en la superficie celular. Los resultados y procedimientos se describen más adelante.

Transfecciones de células

Se transfectaron células HEK 293 de la siguiente manera: 700.000 células 293/pocillo (placas de 6 pocillos) se sembraron en placas aproximadamente 18 h antes de la transfección en DMEM 2 milímetros + suero bovino fetal al 10%. Por pocillo, 1 microgramo de ADN de pISRE-Luciferasa (Stratagene), 1 microgramo de ADN de receptor de citocina y 1 microgramo de ADN de pIRES2-EGFP (Clontech), se añadieron a 9 microlitros de reactivo Eugene 6 (Roche Biochemicals) en un total de 100 microlitros de DMEM. Se usaron dos microgramos de ADN de pIRES2-EGFP cuando no se incluyó ADN del receptor de citocina. Esta mezcla de transfección se añadió 30 minutos después a las células 293 previamente sembradas en placas. Veinticuatro horas después las células transfectadas se retiraron de la placa usando tripsina-EDTA y se volvió a sembrar en placas a aproximadamente 25.000 células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos. Aproximadamente 18 horas antes de la estimulación con ligando, los medios se cambiaron a DMEM + FBS al 0,5%.

Ensayos indicadores de transducción de señal

Los ensayos indicadores de transducción de señal se realizaron de la siguiente manera: Después de una incubación de 18 h a 37 ° C en DMEM + FBS al 0,5%, las células transfectadas se estimularon con diluciones (en DMEM + FBS al 0,5%) de los siguientes ligandos de clase II; IL-28A, IL-29, IL-28B, zcyto10, huIL10 y huIFNa-2a. Después de una incubación de 4 horas a 37 ° C, las células se lisaron y se midieron las unidades relativas de luz (URL) en un luminómetro después de la adición de un sustrato de luciferasa. Los resultados obtenidos se muestran como el factor de inducción de las URL de las muestras experimentales sobre el medio de control solo (URL de muestras experimentales/URL de medio solo = factor de inducción). La Tabla 10 muestra que IL-28A, IL-29 e IL-28B inducen la señalización ISRE en las células 293 transfectadas con ISRE-luciferasa proporcionando un factor de inducción de 15 a 17 en la actividad luciferasa sobre el medio solo. La adición de ADN de la subunidad alfa del receptor de IL-28 (SEC ID N°: 11), usando el CRF2-4 endógeno (SEC ID N°: 71), a la mezcla de transfección, produjo una inducción adicional con factor de 6 a 8 en la señalización ISRE por IL-28A, IL-29 e IL-28B proporcionando una inducción total con un factor de 104 a 125. Ninguno de los otros ADN de los receptores de citocina de clase II transfectados produjeron una señalización ISRE aumentada. Estos resultados indican que IL-28A, IL-29 e IL-28B interaccionan funcionalmente con el receptor de citocina IL-28. La Tabla 10 también muestra que huIFNa-2a puede reducir la señalización ISRE en células 293 transfectadas con ISRE-luciferasa proporcionando una inducción con factor 205 de actividad luciferasa en comparación con medio solo. Sin embargo, la adición de ADN del receptor de IL-28 a la transfección condujo a una reducción de factor 11 en la señalización ISRE (en comparación con ADN ISRE-luciferasa solo), lo que sugiere que la sobreexpresión del receptor de IL-28 efectúa negativamente señalización de interferón, a diferencia de los efectos positivos de la sobreexpresión del receptor de IL-28 sobre la señalización de IL-28A, IL-29 e IL-28B.

Tabla 10

Señalización del Elemento de Respuesta Estimulado por Interferón (ISRE) de Células 293 Transfectadas Después de Estimulación con Citocina de Clase II (Factor de Inducción)		
Ligando	ISRE-Luc.	ISRE-Luc./IL-28R
IL-28A (125 ng/ml)	15	125
IL-29 (125 nng/ml)	17	108
IL-28B (125 ng/ml)	17	104
HuIFNa-2a (100 ng/ml)	205	18
Zcyto10 (125 ng/ml)	1,3	1
HuIL10 (100 ng/ml)	1	0,5

Ejemplo 19Ensayos de transducción de señal con mutantes de Cisteína IL-29*Transfecciones de células*

Para producir células HEK 293 que sobreexpresan de manera estable el receptor de IL-28 humano, se transfectaron células 293 de la siguiente manera: 300.000 células 293/pocillo (placas de 6 pocillos) se sembraron en placas aproximadamente 6 h antes de la transfección en 2 mililitros de DMEM + suero bovino fetal al 10%. Por pocillo, 2 microgramos de un vector de expresión pZP7 que contenía el ADNc de la subunidad alfa del receptor de IL-28 humano (SEC ID N°: 11) se añadieron a 6 microlitros de reactivo Eugene 6 (Roche Biochemicals) en un total de 100 microlitros de DMEM. Esta mezcla de transfección se añadió 30 minutos después a las células 293 sembradas previamente en placas. Cuarenta y ocho horas después las células transfectadas se pusieron bajo selección con puromicina 2 microgramos/mililitro. Las células resistentes a puromicina se mantuvieron como una población de células.

Las células HEK 293 que sobreexpresaban el receptor de IL-28 humano se transfectaron de la siguiente manera: 700.000 células 293/pocillo (placas de 6 pocillos) se sembraron en placas aproximadamente 18 h antes de la transfección en 2 mililitros de DMEM + suero bovino fetal al 10%. Por pocillo, 1 microgramo de KZ157 que contenía un elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE) que dirigía la transcripción de un gen indicador de luciferasa, se añadieron a 3 microlitros de reactivo Eugene 6 (Roche Biochemicals) en un total de 100 microlitros de DMEM. Esta mezcla de transfección se añadió 30 minutos después a las células HEK 293 previamente sembradas en placas. Cuarenta y ocho horas después las células transfectadas se retiraron de la placa usando tripsina-EDTA y se volvió a sembrar en placas en G418 500 microgramos/ml (Geneticin, Life Technologies). Las células resistentes a puromicina y a G418 se mantuvieron como una población de células.

Ensayos indicadores de traducción de señal

Los ensayos indicadores de transducción de señal se realizaron de la siguiente manera: células HEK 293 que sobreexpresaban el receptor de IL-28 humano y que contenían KZ157 se trataron con tripsina-EDTA y se resembraron en placas a aproximadamente 25.000 células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos. Aproximadamente 18 h antes de la estimulación con ligando, los medios se cambiaron a DMEM + FBS al 0,5%.

Después de una incubación de 18 h a 37 °C en DMEM + FBS al 0,5%, las células transfectadas se estimularon con diluciones (en DMEM + FBS al 0,5%) de las diferentes formas de zcyto21 derivado de *E. coli* que contenía diferentes patrones de unión a cisteína. Después de una incubación de 4 horas a 37 °C, las células se lisaron y se midieron las unidades relativas de luz (URL) en un luminómetro después de la adición de un sustrato de luciferasa. Los resultados obtenidos se muestran como el factor de inducción de las URL de las muestras experimentales sobre el medio de control solo (URL de muestras experimentales/URL de medio solo = factor de inducción).

La Tabla 11 muestra que la forma C1-C3 (C16-C113) de IL-29 derivada de *E. coli* natural puede inducir mejor la señalización ISRE que la forma C3-C5 natural (C113-C172) o una mezcla de la forma C1-C3 y la forma C3-C5 (C16-C113, C113-C172) natural, todas refiriéndose a la SEC ID N°: 15.

La Tabla 12 muestra que C1-C3 (C16-C113) de IL-29 derivada de *E. coli* natural y C1-C3 (C16-C113; SEC ID N°: 15) de IL-29 derivada de *E. coli* mutante de Cisteína (C172S) (SEC ID N°: 29) pueden igualmente inducir la señalización ISRE en células HEK 293 que sobreexpresan el receptor de IL-28 humano.

Tabla 11

Señalización ISRE por diferentes formas de IL-29 derivadas de <i>E. coli</i> (Factor de Inducción)			
Concentración de Citocina (ng/ml)	forma C1-C3 (C16-C113)	forma C3-C5 (C113-C172)	Mezcla de C1-C3 y C3-C5
100	36	29	34
10	38	25	35
1	32	12	24
0,1	10	2	5
0,01		3 1	1
0,001	1	1	1

Tabla 12

Señalización ISRE por diferentes formas de IL-29 derivadas de <i>E. coli</i> (Factor de Inducción)		
Concentración de Citocina (ng/ml)	C1-C3 natural	C1-C3 Mutante de Cisteína C172S
1000	9,9	8,9
100	9,3	8,7
10	9,3	8,1
1	7,8	7
0,1	4,6	3,3
0,01	1,9	1,5
0,001	1,3	0,9

Ejemplo 20Inducción de IL-28A, IL-29, IL-28B por poli I:C e infección viral

- 5 Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica humana recién aisladas en presencia de ácido poliinosínico-ácido policitidílico (poli I:C; 100 mg/ml) (SIGMA; St. Louis, MO), virus de la encefalomiocarditis (EMCV) con una MOI de 0,1 o en medio solo. Después de 15 horas de incubación, se aisló ARN total de las células y se trató con DNasa sin RNasa. Se usaron 100 ng de ARN total como molde para la RT-PCR de una etapa usando la RT-PCR de Una Etapa de Superscript con el Kit Platinum Taq y cebadores específicos de genes como recomienda el fabricante (Invitrogen).

En células sin tratar se observaron cantidades de escasas a indetectables de ARN de IL-28A, IL-28B e IL-29, IFN- α e IFN- β . Por otro lado, la cantidad de ARN de IL-28A, IL-29, IL-28B aumentó mediante tratamiento con poli I:C e infección viral y también se observó para los interferones de tipo I. Estos experimentos indican que los interferones de tipo I, IL-28A, IL-29, IL-28B pueden inducirse por ARN bicatenario o infección viral.

Ejemplo 21Actividad señalizadora de IL-28, IL-29 en comparación con IFN α en células HepG2A. Transfecciones de células

- Se transfectaron células HepG2 de la siguiente manera: 700.000 células HepG2/pocillo (placas de 6 pocillos) se sembraron en placas aproximadamente 18 h antes de la transfección en 2 mililitros de DMEM + suero bovino fetal al 10%. Por pocillo, 1 microgramo de ADN de pISRE-Luciferasa (Stratagene) y 1 microgramo de ADN de pIRES2-EGFP (Clontech) se añadieron a 6 microlitros de reactivo Eugene 6 (Roche Biochemicals) en un total de 100 microlitros de DMEM. Esta mezcla de transfección se añadió 30 minutos después a las células HepG2 previamente sembradas en placa. Veinticuatro horas después las células transfectadas se retiraron de la placa usando tripsina-EDTA y se resembraron a aproximadamente 25.000 células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos.
- 25 Aproximadamente 18 horas antes de la estimulación con ligando, los medios se cambiaron a DMEM + FBS al 0,5%.

B. Ensayos Indicadores de transducción de señal

- Los ensayos indicadores de transducción de señal se realizaron de la siguiente manera: Después de una incubación de 18 h a 37 ° C en DMEM + FBS al 0,5%, las células transfectadas se estimularon con 100 ng/ml de ligandos IL-28A, IL-29, IL-28B, zcyto24, zcyto25 y huIFN- α 2a. Después de una incubación de 4 horas a 37 ° C, las células se lisaron y se midieron las unidades relativas de luz (URL) en un luminómetro después de la adición de un sustrato con luciferasa. Los resultados obtenidos se muestran como el factor de inducción de las URL de las muestras experimentales sobre el control solo con medio (URL de muestras experimentales/URL de medio solo = factor de inducción). La Tabla 13 muestra que IL-28A, IL-29 e IL-28B, zcyto24 y zcyto25 inducen la señalización ISRE en células hepáticas HepG2 humanas con ISRE-luciferasa.

Tabla 13: Factor de Inducción de la Señalización ISRE dependiente de Citocinas en células HepG2

Citocina	Factor de Inducción
IL-28A	5,6
IL-29	4
IL-28B	5,8
Zcyto24	4,7
Zcyto25	3
HuIFN- α 2a	5,8

Ejemplo 22Actividad antiviral de IL-29 en comparación con IFN α en células HepG2

- 5 Se adaptó un ensayo antiviral para el EMCV (Colección Americana de Cultivos Tipo N° VR-129B, Manassas, VA) con células humanas (Familletti, P., y col., Methods Enzym. 78: 387-394, 1981). Las células se sembraron en placas con citocinas y se incubaron 24 horas antes de la exposición al EMCV a una multiplicidad de infección de 0,1 a 1. Las células se analizaron para determinar la viabilidad con un bioensayo de captación con colorante 24 horas después de la infección (Berg, K., y col., Apmis 98: 156-162, 1990). A las células diana se les proporcionó MTT y se
- 10 incubaron a 37 °C durante 2 horas. Se añadió una solución solubilizadora, se incubó durante una noche a 37 °C y se determinó la densidad óptica a 570 nm. La DO570 es directamente proporcional a la actividad antiviral.

- Los resultados muestran la actividad antiviral cuando IL-29 e IFN se ensayan con células HepG2: IL-29, IFN- β e IFN α -2a se añadieron a diversas concentraciones a células HepG2 antes de la infección por el EMCV y del ensayo de captación con colorante. Se representa la media y la desviación típica de la DO570 de los pocillos por triplicado. La
- 15 DO570 es directamente proporcional a la actividad antiviral. Para IL-29, la CE50 fue de 0,60 ng/ml; para IFN- α 2a, la CE50 fue de 0,57 ng/ml; y para IFN- β , la CE50 fue de 0,46 ng/ml.

Ejemplo 23Expresión de ARNm de IL-28RA en hígado y subgrupos de linfocitos

- 20 Para examinar adicionalmente la distribución de ARNm para IL-28RA, se realizó RT-PCR semicuantitativa usando el sistema SDS 7900HT (Applied Biosystems, CA). Se realizó RT-PCR de una etapa usando ARN total 100 ng para cada muestra y cebadores específicos de genes. Se generó una curva patrón para cada conjunto de cebador usando ARN Bjab y los valores de todas las muestra se normalizaron frente a HPRT. Los resultados normalizados se resumen en las Tablas 14-17. También se muestran los valores normalizados para IFNAR2 y CRF2-4.

- 25 Tabla 14: los linfocitos B y T expresan niveles significativos de ARNm de IL-28RA. Se observan bajos niveles en células dendríticas y en la mayoría de los monocitos.

Tabla 14

Célula/Tejido	IL-28RA	IFNAR2	CRF2-4
Células Dendríticas no estim.	0,04	5,9	9,8
Células Dendríticas +IFNg	0,07	3,6	4,3
Células Dendríticas	0,16	7,85	3,9
CD14+ estim. con LPS/IFNg	0,13	12	27
CD14+monocitos en reposo	0,12	11	15,4
Hu CD14+ No act.	4,2	TBD	TBD
Hu CD14+ LPS 1 ug/ml act.	2,3	TBD	TBD
H. Agmídala inflamada	3	12,4	9,5
H. linfocitos B+PMA/Iono 4 y 24 h.	3,6	1,3	1,4
Hu CD19+ en reposo	6,2	TBD	TBD
H α CD19 + 4 horas PMA/Iono	10,6	TBD	TBD

(continuación)

Célula/Tejido	IL-28RA	IFNAR2	CRF2-4
Hu CD19 + 24 h. Act. PMA/Iono	3,7	TBD	TBD
IgD + linfocitos B	6,47	13,15	6,42
IgM + linfocitos B	9,06	15,4	2,18
IgD - linfocitos B	5,66	2,86	6,76
Células NK + PMA/Iono	0	6,7	2,9
Hu CD3 + No activado	2,1	TBD	TBD
CD4 + en reposo	0,9	8,5	29,1
CD4 + No estim. 18 h.	1,6	8,4	13,2
CD4 + +Poli I/C	2,2	4,5	5,1
CD4 + + PMA/Iono	0,3	1,8	0,9
CD3 neg reposo	1,6	7,3	46
CD3 neg no estim. 18 h.	2,4	13,2	16,8
CD3 neg+Poli I/C 18 h.	5,7	7	30,2
CD3 neg+LPS 18 h.	3,1	11,9	28,2
CD8 + no estim. 18 h.	1,8	4,9	13,1
CD8 + estim. con PMA/Ion 18 h.	0,3	0,6	1,1

Como se muestra en la Tabla 14, las líneas celulares derivadas de hígado y de tejido hepático normal presentan niveles sustanciales de ARNm de IL-28RA y CRF2-4.

5

Tabla 15

Célula/Tejido	IL-28RA	IFNAR2	CRF2-4
HepG2	1,6	3,56	2,1
HepG2 UGAR 5/10/02	1,1	1,2	2,7
HepG2, CGAT HKES081501C	4,3	2,1	6
HuH7 5/10/02	1,63	16	2
HuH7 hepatoma - CGAT	4,2	7,2	3,1
Hígado, normal - CGAT N° HXYZ020801K	11,7	3,2	8,4
Hígado, TAN – Tejido adyacente normal	4,5	4,9	7,7
Hígado, TAN – Tejido adyacente normal	2,2	6,3	10,4
Hep SMVC vena hep	0	1,4	6,5
Hep SMCA arteria hep	0	2,1	7,5
Fibroblastoma hepático	0	2,9	6,2
Carcinoma hepatocelular.	3,8	2,9	5,8
Adenocarcinoma hepático	8,3	4,2	10,5
SK-Hep-I adenocarcinoma hepático	0,1	1,3	2,5
AsPC-1 Hu. Adenocarcinoma pancreático	0,7	0,8	1,3
Hu. Hep. Células estrelladas	0,025	4,4	9,7

Como se muestra en la Tabla 15, las células epiteliales de las vías respiratorias primarias contienen abundantes niveles de IL-28RA y CRF2-4.

Tabla 16

Célula/Tejido	IL-28RA	IFNAR2	CRF2-4
U87MG - glioma	0	0,66	0,99
NHBE no estim.	1,9	1,7	8,8
NHBE + TNF-alfa	2,2	5,7	4,6
NHBE + poli I/C	1,8	nd	nd
Células Epiteliales de las Vías Respiratorias Pequeñas	3,9	3,3	27,8
FPHN – Fibroblastos Pulmonares Humanos Normales	0	nd	nd

Como se muestra en la Tabla 16, IL-28RA está presente en muestras de ensayo de hígado normal y enfermo, con expresión aumentada en tejido de muestras de ensayo infectadas con Hepatitis C y Hepatitis B.

5

Tabla 17

Célula/Tejido	IL-28RA	CRF2-4	IFNAR2
Hígado con Necrosis por Coagulación	8,87	15,12	1,72
Hígado con Hepatitis Autoinmune	6,46	8,90	3,07
Hepatitis Neonatal	6,29	12,46	6,16
Enfermedad Hepática Terminal	4,79	17,05	10,58
Disfunción Hepática Fulminante	1,90	14,20	7,69
Disfunción Hepática Fulminante	2,52	11,25	8,84
Cirrosis, biliar primaria	4,64	12,03	3,62
Cirrosis Alcohólica (de Laennec)	4,17	8,30	4,14
Cirrosis, Criptogénica	4,84	7,13	5,06
Hepatitis C+, con cirrosis	3,64	7,99	6,62
Hepatitis C+	6,32	11,29	7,43
Hepatitis fulminante secundaria a Hep A	8,94	21,63	8,48
Hepatitis C+	7,69	15,88	8,05
Hepatitis B+	1,61	12,79	6,93
Hígado Normal	8,76	5,42	3,78
Hígado Normal	1,46	4,13	4,83
Hígado con TAN (Tejido adyacente normal)	3,61	5,43	6,42
Hígado con TAN	1,97	10,37	6,31
Hígado Fetal Hu	1,07	4,87	3,98
Carcinoma hepatocelular	3,58	3,80	3,22
Adenocarcinoma Hepático	8,30	10,48	4,17
hep. SMVC, Vena hep.	0,00	6,46	1,45
Hep SMCA Arteria hep	0,00	7,55	2,10
Fibroblastoma hepático	0,00	6,20	2,94
hepatoma HuH7	4,20	3,05	7,24
Carcinoma hepatocelular HepG2	3,40	5,98	2,11
Adenocarcinoma hepático 9K-Hep-1.	0,03	2,53	1,30
HepG2 No estim.	2,06	2,98	2,28

(continuación)

Célula/Tejido	IL-28RA	CRF2-4	IFNAR2
HepG2+zcyto21	2,28	3,01	2,53
HepG2+IFN α	2,61	3,05	3,00
Hígado de Mujer Normal - degradado	1,38	6,45	4,57
Hígado Normal - degradado	1,93	4,99	6,25
Hígado Normal - degradado	2,41	2,32	2,75
Hígado Enfermo - degradado	2,33	3,00	6,04
Hepatocitos Primarios de Clonetics	9,13	7,97	13,30

Como se muestra en las Tablas 18-22, IL-28RA puede detectarse en linfocitos B normales, líneas de células de linfoma B, linfocitos T, líneas celulares de linfoma T (Jurkat), linfocitos normales y transformados (linfocitos T y linfocitos B) y en monocitos humanos normales.

5

Tabla 18

	HPRT Media	IL-28RA Media	IL-28RA norm	IFNAR2	IFNR2 norm.	CRF2-4	CRF2-4 Norm
CD14+24h no estim. N° A38	13,1	68,9	5,2	92,3	7,0	199,8	15,2
CD14+24h estim. N° A38	6,9	7,6	1,1	219,5	31,8	276,6	40,1
CD14+24h no estim. N° A112	17,5	40,6	2,3	163,8	9,4	239,7	13,7
CD14+24h estim. N° A112	11,8	6,4	0,5	264,6	22,4	266,9	22,6
CD14+en reposo N° X	32,0	164,2	5,1	1279,7	39,9	699,9	21,8
CD14+ +LPS N° X	21,4	40,8	1,9	338,2	15,8	518,0	24,2
CD14+24h no estim. N° A39	26,3	86,8	3,3	297,4	11,3	480,6	18,3
CD14+24h estim. N° A39	16,6	12,5	0,8	210,0	12,7	406,4	24,5
HL60 en reposo	161,2	0,2	0,0	214,2	1,3	264,0	1,6
HL60+PMA	23,6	2,8	0,1	372,5	15,8	397,5	16,8
U937 en reposo	246,7	0,0	0,0	449,4	1,8	362,5	1,5
U937+PMA	222,7	0,0	0,0	379,2	1,7	475,9	2,1
Jurkat en reposo	241,7	103,0	0,4	327,7	1,4	36,1	0,1
Jurkat activadas	130,7	143,2	1,1				
Colo205	88,8	43,5	0,5				
HT-29	26,5	30,5	1,2				

Tabla 19

	HPRT DT	IL-28RA DT
Mono 24 h no estim. N° A38	0,6	2,4
Mono 24 h estim. N° A38	0,7	0,2
Mono 24 h no estim. N° A112	2,0	0,7
Mono 24 h estim. N° A112	0,3	0,1
Mono en reposo N° X	5,7	2,2
Mono+LPS N° X	0,5	1,0
Mono 24 h no estim. N° A39	0,7	0,8
Mono 24 h estim. N° A39	0,1	0,7
HL60 en reposo	19,7	0,1
HL60+PMA	0,7	0,4
U937 en reposo	7,4	0,0
U937+PMA	7,1	0,0
Jurkat en reposo	3,7	1,1
Jurkat Activadas	2,4	1,8
Colo205	1,9	0,7
HT-29	2,3	1,7

Tabla 20

	Media Hprr	Media IFNAR2	Media IL-28RA	Media CRF
CD3+/CD4+ 0	10,1	85,9	9,0	294,6
CD4/CD3+ No estim. 18 h	12,9	108,7	20,3	170,4
CD4+/CD3+ +Poli I/C 18 h	24,1	108,5	52,1	121,8
CD4+/CD3+ + PM/Iono 18 h	47,8	83,7	16,5	40,8
CD3 neg 0	15,4	111,7	24,8	706,1
CD3 neg No estim. 18 h	15,7	206,6	37,5	263,0
CD3 neg +Poli I/C 18 h	9,6	67,0	54,7	289,5
CD3 neg +LPS 18 h	14,5	173,2	44,6	409,3
CD8+ No estim. 18 h	6,1	29,7	11,1	79,9
CD8+ + PMA/Iono 18 h	78,4	47,6	26,1	85,5
12.8.1 - NHBE No estim.	47,4	81,1	76,5	415,6
12.8.2 - NHBE+TNF-alfa	42,3	238,8	127,7	193,9
SAEC	15,3	49,9	63,6	426,0

Tabla 21

	IL-28RA Norm.	CRF Norm.	IFNAR2 Norm.	IL-28RA DT	CRF DT	IFNAR2 DT
CD3+/CD4+ 0	0,9	29,1	8,5	0,1	1,6	0,4
CD4/CD3+ No estim. 18 h	1,6	13,2	8,4	0,2	1,6	1,4
CD4+/CD3+ +Poli I/C 18 h	2,2	5,1	4,5	0,1	0,3	0,5
CD4+/CD3+ + PMA/Iono 18 h	0,3	0,9	1,8	0,0	0,1	0,3
CD3 neg 0	1,6	46,0	7,3	0,2	4,7	1,3
CD3 neg No estim. 18 h	2,4	16,8	13,2	0,4	2,7	2,3
CD3 neg +Poli I/C 18 h	5,7	30,2	7,0	0,3	1,7	0,8
CD3 neg+LPS 18 h	3,1	28,2	11,9	0,4	5,4	2,9
CD8+ No estim. 18 h	1,8	13,1	4,9	0,1	1,1	0,3
CD8+ + PMA/Iono 18 h	0,3	1,1	0,6	0,0	0,1	0,0
12.8.1 - NHBE No estim.	1,6	8,8	1,7	0,1	0,4	0,1
12.8.2 -NHBE+TNF-alfa	3,0	4,6	5,7	0,1	0,1	0,1
SAEC	4,1	27,8	3,3	0,2	1,1	0,3

Tabla 2.2

	DT HPRT	DT IFNAR2	DT IL-28RA	DT CRF
CD3+/CD4+ 0	0,3	3,5	0,6	12,8
CD4/CD3+ No estim. 18 h	1,4	13,7	1,1	8,5
CD4+/CD3+ +Poli I/C 18 h	1,3	9,8	1,6	3,4
CD4+/CD3+ + PMA/Iono 18 h	4,0	10,3	0,7	3,7
CD3 neg 0	1,4	16,6	1,6	28,6
CD3 neg No estim. 18 h	2,4	16,2	2,7	12,6
CD3 neg +Poli I/C 18 h	0,5	7,0	1,0	8,3
CD3 neg +LPS 18 h	1,0	39,8	5,6	73,6
CD8+ No estim. 18 h	0,2	1,6	0,5	6,1
CD8+ + PMA/Iono 18 h	1,3	1,7	0,2	8,1
12.8.1- NHBE No estim.	2,4	5,6	2,7	2,8
12.8.2 - NHBE+TNF-alfa	0,5	3,4	3,5	3,4
SAEC	0,5	4,8	1,8	9,9

5 Ejemplo 24

La IL-28 de ratón no tiene efecto sobre la proliferación de células Daudi

Células Daudi humanas se resuspendieron en RPMI + FBS al 10% a 50.000 células/mililitro y 5000 células por pocillo se sembraron en una placa de 96 pocillos. A cada pocillo se añadió IL-29-CEE (IL-29 conjugada con etiqueta glu), IFN- γ o IFN- α 2a en diluciones en serie con factor de dilución 2. IL-29-CEE se usó a un intervalo de concentración de 1000 ng/ml a 0,5 ng/ml. IFN- γ se usó a un intervalo de concentración de 125 ng/ml a 0,06 ng/ml. IFN- α 2a se usó a un intervalo de concentración de 62 ng/ml a 0.03 ng/ml. Las células se incubaron durante 72 horas a 37 °C. Después de 72 h se añadió Azul de Alamar (Accumed, Chicago, IL) a 20 microlitros/pocillo. Posteriormente las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5%, durante 24 horas. Las placas se leyeron en el lector de placa Fmax™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) usando el programa Pro de SoftMax™ a longitudes de onda de 544 (Excitación) y 590 (Emisión). El Azul de Alamar proporciona una lectura fluorométrica basada en la actividad

metabólica de las células y es por tanto una medida directa de proliferación celular en comparación con un control negativo. Los controles indican que IL-29-CEE, a diferencia de IFN- α 2a, no tiene efecto significativo sobre la proliferación de células Daudi.

Ejemplo 25

5 La IL-28 de ratón no tiene efecto antiproliferativo sobre linfocitos B de ratón

Se aislaron linfocitos B de ratón de 2 bazo de ratones Balb/C, (de 7 meses de vida) por agotamiento de células CD43+ usando perlas magnéticas MACS. Los linfocitos B purificados se cultivaron *in vitro* con LPS, anticuerpos monoclonales anti-IgM o anti-CD40. La IL-28 de ratón o IFN α de ratón se añadió a los cultivos y a las 48 h se añadió 3 H-timidina y después de 72 horas de cultivo se midió la incorporación de 3 H-timidina.

10 IFN α a 10 ng/ml inhibió la incorporación de 3 H-timidina por linfocitos T de ratón estimulados bien con LPS o con anti-IgM. Sin embargo, IL-28 de ratón no inhibió la incorporación de 3 H-timidina a ninguna concentración ensayada incluyendo 1000 ng/ml. Por otro lado, tanto mIFN α como IL-28 de ratón aumentaron la incorporación de 3 H timidina por linfocitos T estimulados con MAb anti-CD40.

15 Estos datos demuestran que, a diferencia de IFN α , IL-28 de ratón, no presenta actividad antiproliferativa incluso a altas concentraciones. Además, zcyto24 potencia la proliferación en presencia de anticuerpos monoclonales (MAb) anti-CD40. Los resultados ilustran que IL-28 de ratón difiere de IFN α en que IL-28 de ratón no presenta actividad antiproliferativa sobre linfocitos T de ratón, incluso a altas concentraciones. Además, IL-28 de ratón potencia la proliferación en presencia de anticuerpos monoclonales anti-CD40.

Ejemplo 26

20 Ensayo de expansión en médula ósea

Células mononucleares de médula ósea recientes (Poietic Technologies, Gaithersburg, Md.) se adhirieron a plástico durante 2 horas en α MEM, FBS al 10%, β -mercaptoetanol 50 micromolar, FLT3L 2 ng/ml a 37 °C. Después, las células no adherentes se sembraron en placas de 25.000 a 45.000 células/pocillo (placas de cultivo tisular de 96 pocillos) en α MEM, FBS al 10%, β -mercaptoetanol 50 micromolar, FLT3L 2 ng/ml en presencia o en ausencia de IL-29-CEE 1000 ng/ml, IL-29-CEE 100 ng/ml, IL-29-CEE 10 ng/ml, IFN- α 2a 100 ng/ml, IFN- α 2a 10 ng/ml o IFN- α 2a 1 ng/ml. Estas células se incubaron con diversas citocinas para ensayar la expansión o diferenciación de células hematopoyéticas de la médula ósea (IL-2 20 ng/ml, IL-3 2 ng/ml, IL-4 20 ng/ml, IL-5 20 ng/ml, IL-7 20 ng/ml, IL-10 20 ng/ml, IL-12 20 ng/ml, IL-15 20 ng/ml, IL-21 10 ng/ml o sin citocina añadida). Después de 8 a 12 días se añadió Azul de Alamar (Accumed, Chicago, Ill) a 20 microlitros/pocillo. Posteriormente las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5%, durante 24 horas. Las placas se leyeron en el lector de placa Fmax™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) usando el programa Pro de SoftMax™, a longitudes de onda de 544 (Excitación) y 590 (Emisión). El Azul de Alamar proporciona una lectura fluorométrica basada en la actividad metabólica de las células y es por tanto una medición directa de la proliferación celular en comparación con un control negativo.

35 IFN- α 2a produjo una inhibición significativa de la expansión de la médula ósea en todas las condiciones ensayadas. Por otro lado, IL-29 no tuvo efecto significativo sobre la expansión de células de la médula ósea en presencia de IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-21 o sin citocina añadida. Se observó una pequeña inhibición de la expansión de células en la médula ósea en presencia de IL-2 o IL-15.

Ejemplo 27

Inhibición de la señalización de IL-28 e IL-29 con el receptor soluble (zcytoR19/CRF2-4)

40 A. Ensayo indicador de transducción de señal

Para mostrar las propiedades inhibitoras de los receptores solubles homodimérico zcytoR19-Fc4 y heterodimérico zcytoR19-Fc/CRF2-4-Fc sobre la señalización de zcyto20, zcyto21 y zcyto24, puede usarse un ensayo indicador de transducción de señal. Se transfectaron células renales embrionarias humanas (HEK) que sobreexpresaban el receptor de zcytoR19 con un plásmido indicador que contenía un elemento de respuesta estimulada por interferón (ISRE) que dirigía la transcripción de un gen indicador de luciferasa. La actividad luciferasa tras la estimulación de las células transfectadas con ligandos (incluyendo zcyto20 (SEC ID N°: 2), zcyto21 (SEC ID N°: 4), zcyto24 (SEC ID N°: 8)) refleja la interacción del ligando con el receptor soluble.

B. Transfecciones de células

50 Células HEK 293 que sobreexpresaban zcytoR19 se transfectaron de la siguiente manera: 700.000 células 293/pocillo (placa de 6 pocillos) se sembraron en placas aproximadamente 18 h antes entre la transfección en 2 mililitros de DMEM + suero bovino fetal al 10%. Por pocillo, 1 microgramo de ADN de pISRE-Luciferasa (Stratagene) y 1 microgramo de ADN de pIRES2-EGFP (Clontech) se añadieron a 6 microlitros de reactivo Eugene 6 (Roche Biochemicals) en un total de 100 microlitros de DMEM. Esta mezcla de transfección se añadió 30 minutos

después a las células 293 previamente sembradas en placas. Veinticuatro horas después las células transfectadas se retiraron de la placa usando tripsina-EDTA y se resembraron en placas a aproximadamente 25.000 células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos. Aproximadamente 18 h antes de la estimulación con ligando, el medio se cambió a DMEM + FBS al 0,5%.

5 C. Ensayos indicadores de transducción de señal

Se realizaron ensayos indicadores de transducción de señal de la siguiente manera: Después de una incubación de 18 h a 37 °C en DMEM + FBS al 0,5%, las células transfectadas se estimularon con zcyto20, zcyto21 o zcyto24 10 ng/ml y 10 microgramos/ml de los siguientes receptores solubles: homodímero zcytor19-Fc humano, heterodímero zcytor19-Fc humano/CRF2-4-Fc humano, homodímero CRF2-4-Fc humano, homodímero zcytor19-Ig murino. Después de una incubación de 4 horas a 37 °C, las células se lisaron, y se midieron las unidades relativas de luz (URL) en un luminómetro después de la adición de un sustrato con luciferasa. Los resultados obtenidos se muestran como el porcentaje de inhibición de la señalización inducida por ligando en presencia del receptor soluble con respecto a la señalización en presencia de PBS solo. La Tabla 23 muestra que el receptor soluble heterodimérico zcytor19-Fc humano/CRF2-4 humano puede inhibir la señalización inducida por zcyto20, zcyto21 y zcyto24 entre un 16 y un 45% de control. El receptor soluble homodimérico zcytor19-Fc humano también puede inhibir la señalización inducida por zcyto21 un 45%. No se observaron efectos significativos con los receptores solubles homodiméricos huCRF2-4-Fc o muzcytor19-Ig.

Tabla 23: Porcentaje de Inhibición de la señalización del Elemento de Respuesta Estimulado por Interferón (ISRE) Inducido por Ligando por Receptores Solubles

Ligando	Huzcytor19-Fc/ huCRF2-4-Fc	Huzcytor19-Fc	HuCRF2-4-Fc	Muzcytor19-Ig
Zcyto20	16%	92%	80%	91%
Zcyto21	16%	45%	79%	103%
Zcyto24	47%	90%	82%	89%

Ejemplo 28

IL-28 e IL-29 inhiben la replicación del VIH en PBMC humanas recientes

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus patógeno que infecta células del sistema inmunitario. Los linfocitos T CD4 y los monocitos son los tipos celulares principalmente infectados. Para ensayar la capacidad de IL-28 e IL-29 para inhibir la replicación del VIH *in vitro*, se infectaron PBMC de donantes normales con el virus VIH en presencia de IL-28, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas recientes se aislaron de sangre entera obtenida de donantes seleccionados que eran seronegativos para el VIH y VHB. Las células de sangre periférica se sedimentaron/lavaron 2-3 veces por centrifugación a velocidad baja y se resuspendieron en PBS para eliminar las plaquetas contaminantes. Las células sanguíneas lavadas se diluyeron a 1:1 con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS) y se estratificaron sobre 14 ml de Medio de Separación de Linfocitos ((LSM; cellgro™ by Mediatech, Inc. Herndon, VA); densidad 1,078 +/-0,002 g/ml) en un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron durante 30 minutos a 600 x G. Las PBMC formando bandas se aspiraron suavemente de la interfaz resultante y posteriormente se lavaron 2X en PBS por centrifugación a baja velocidad. Después del lavado final, se realizó el recuento de las células por exclusión con azul de tripano y se resuspendieron a 1×10^7 células/ml en RPM 1640 complementado con Suero Bovino Fetal (FBS) al 15%, L-glutamina 2 mM, PHA-P 4 µg/ml. Las células se dejaron incubando durante 48-72 horas a 37 °C. Después de la incubación, las PBMC se centrifugaron y resuspendieron en RPMI 1640 con FBS al 15%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, gentamicina 10 µg/ml e IL-2 humana recombinante 20 U/ml. Las PBMC se mantuvieron en el medio a una concentración de $1-2 \times 10^6$ células/ml con cambios de medios bisemanales hasta que se usaron en el protocolo de ensayo. Los monocitos se agotaron del cultivo como resultado de la adherencia al matraz de cultivo tisular.

Para el ensayo PBMC convencional, se agruparon células estimuladas con PHA-P de al menos dos donantes normales, se diluyeron en medio reciente a una concentración final de 1×10^6 células/ml y se sembraron en placa en los pocillos interiores de una microplaca de fondo redondo de 96 pocillos a 50 µl/pocillo (5×10^4 células/pocillo). Se prepararon diluciones de ensayo a una concentración 2X en tubos de microtitulación y 10 µl de cada concentración se colocaron en pocillos apropiados en un formato convencional. Se añadieron IL-28, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG a concentraciones de 0-10 µg/ml, normalmente en diluciones logarítmicas 1/2. En cada pocillo de ensayo se pusieron 50 µl de una dilución predeterminada de reserva de virus (MOI final de 0,1). Los pocillos que solo contenían células y virus añadidos se usaron para el control de virus. Se prepararon placas diferentes de modo idéntico sin virus para estudios de citotoxicidad de fármacos usando un sistema de ensayo MTS. Los cultivos de PBMC se conservaron

durante siete días después de la infección, momento en el que se recogieron muestras de sobrenadante acelular y se sometieron a ensayo para determinar la actividad de la transcriptasa inversa y los niveles de antígeno p24.

Una disminución en la actividad de la transcriptasa inversa o niveles de antígeno p24 con IL-28, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG serían indicadores de actividad antiviral. Los resultados demostrarían que IL-28 e IL-29 pueden tener valor terapéutico en el tratamiento del VTH y SIDA.

Ejemplo 29

IL-28 e IL-29 inhiben la replicación del GBV-B en células hepáticas de marmota

El HCV es un miembro de la familia *Flaviviridae* de virus de ARN. El VHC no se replica bien en cultivos *ex vivo* ni *in vitro* y por lo tanto, no existen sistemas satisfactorios para ensayar la actividad anti-VHC de moléculas *in vitro*. El virus GB B (GBV-B) es un supuesto modelo atractivo para su uso en el desarrollo de agentes antivirales anti-VHC ya que tiene un nivel de identidad de secuencia relativamente alto con el VHC y es un virus hepatotrópico. Hasta ahora, el virus solo puede desarrollarse en los hepatocitos primarios de determinados primates no humanos. Esto se consigue aislando hepatocitos *in vitro* e infectándolos con GBV-B o aislando hepatocitos de marmotas infectadas con GBV-B y usándolos directamente con compuestos antivirales.

Los efectos de IL-28, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG se ensayaron sobre la producción de ARN extracelular del GBV-B mediante RT-PCR TaqMan y sobre un reactivo CellTiter96[®] usando citotoxicidad (Promega, Madison, WI) a seis diluciones semilogarítmicas de IL-28, IL-29 o el polipéptido MetIL-29C172S-PEG por triplicado. Los cultivos no tratados sirvieron como controles celulares y virales. Tanto RIBAVIRIN[®] (200 µg/ml a la mayor concentración de ensayo) como IFN-α (5000 UI/ml en el ensayo más elevado) se incluyeron como compuestos de control positivos. Se aislaron cultivos de hepatocitos primarios y se sembraron en placas revestidas con colágeno. Al día siguiente los cultivos se trataron con las muestras de ensayo (IL-28, IL-29, MetIL-29C172S-PEG, IFNα o RIBAVIRIN[®]) durante 24 horas antes de exponerse a viriones del GBV-B o tratarse directamente con las muestras de ensayo cuando se usan hepatocitos infectados *in vivo*. Las muestras de ensayo y los medios se añadieron al día siguiente y se volvieron a colocar tres días después. De tres a cuatro días después (días 6-7 posteriores a la adición de la muestra de ensayo) el sobrenadante se recogió y se realizó un recuento de células usando CellTiter96[®]. El ARN viral se extrajo del sobrenadante y se cuantificó con copias por triplicado en un ensayo RT-PCR TaqMan cuantitativo usando un ARN transcrito *in vivo* que contenía la diana de RT-PCR como un patrón. Se realizó el recuento del promedio de las muestras copiadas. La inhibición de la producción de virus se sometió a ensayo representando los valores promedio de ARN y el número de células de las muestras por triplicado con respecto a los virus no tratados y controles celulares. Se calculó la concentración inhibidora del fármaco resultante de la inhibición al 50% de la producción de ARN de GBV-B (CI50) y la concentración tóxica resultante de la destrucción del 50% de los números de células con respecto a los valores de control (CT50) extrapolando a partir de gráficos creados con los datos.

La inhibición de la producción de ARN de GBV-B por IL-28 y 29 es un indicativo de las propiedades antivirales de IL-28 e IL-29 en este virus similar a la Hepatitis C en hepatocitos, el órgano principal de infección de Hepatitis C y los resultados positivos sugieren que IL-28 o IL-29 pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones por VHC en seres humanos.

Ejemplo 30

IL-28 IL-29 y MetIL-29C172S-PEG inhibe la replicación del VHB en células WT10

La hepatitis B crónica (VHB) es una de las infecciones virales más comunes y graves de los seres humanos que pertenece a la familia de virus *Hepadnaviridae*. Para ensayar las actividades antivirales de IL-28 e IL-29 contra el VHB, IL-28, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG se ensayaron contra el VHB en un sistema de infección *in vitro* usando una variante de la línea hepática humana HepG2. IL-28, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG inhibieron la replicación viral en este sistema, lo que sugiere un valor terapéutico en el tratamiento del VHB en seres humanos.

Las células WT10 son un derivado de la línea celular hepática humana HepG2 2.2.15. Células WT10 se transfectaron de manera estable con el genoma del VHB, lo que permitió la expresión estable de transcritos del VHB en la línea celular (Fu y Cheng, Antimicrobial Agents Chemother. 44(12): 3402-3407, 2000). En el ensayo con WT10 el fármaco en cuestión y un control con 3TC se ensayarán a cinco concentraciones cada uno de ellos, diluido en series semilogarítmicas. Los criterios de valoración son PCR TaqMan para ADN del VHB extracelular (CI50) y los números de células usando reactivo CellTiter96 (CT50). El ensayo es similar al descrito por Korba y col. Antiviral Res. 15 (3): 217-228, 1991 y Korba y col., Antiviral Res. 19(1): 55-70, 1992. En resumen, células WT10 se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de 16-24 horas la monocapa confluyente de células HepG2-2.2.15 se lavó y el medio se sustituyó por medio completo que contenía diversas concentraciones de una muestra de ensayo por triplicado. Se usó 3TC como control positivo, mientras que como control negativo se añadió medio solo a las células (control viral, CV). Tres días después el medio de cultivo se sustituyó por medio reciente que contenía las muestras de ensayo diluidas apropiadamente. Seis después de la adición inicial del compuesto de ensayo, el sobrenadante del cultivo celular se recogió, se trató con pronasa y DNasa, y se usó en un ensayo PCR TaqMan cuantitativo en tiempo real. El ADN del VHB amplificado por PCR se detectó en tiempo real controlando

aumentos en las señales de fluorescencia que se producen a partir de la degradación exonucleolítica de una molécula sonda fluorescente inactivada que se hibrida con el ADN del VHB amplificado. Para cada amplificación PCR, se generó una curva patrón simultáneamente usando diluciones de ADN purificado del VHB. La actividad antiviral se calculó a partir de la reducción en los niveles del ADN del VHB (CI_{50}). Después, se empleó un ensayo de captación de colorante para medir la viabilidad celular que se usa para calcular la toxicidad (CT_{50}). El índice terapéutico (TT) se calcula como CT_{50}/CI_{50} .

IL-28, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG inhibieron la replicación viral HepB en células WT10 con una $CI_{50} < 0,032$ $\mu\text{g/ml}$. Esto demuestra actividad antiviral de IL-28 e IL-29 contra el VHB cultivado en líneas celulares hepáticas, proporcionando pruebas del valor terapéutico para el tratamiento del VHB en pacientes humanos.

Ejemplo 31

IL-28, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG inhibe la replicación del VDBV en células renales bovinas

El VHC es un miembro de la familia *Flaviviridae* de virus de ARN. Otros virus que pertenecen a esta familia son el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y el virus de la fiebre amarilla (VFA). El VHC no se replica bien en ninguno de los cultivos *ex vivo* o *in vivo* y por lo tanto estos no son sistemas para ensayar la actividad anti-VHC *in vitro*. Se usaron ensayos con el VDVB y el VFA como supuestos virus para el VHC para ensayar la actividad antiviral contra la familia de virus *Flaviviridae*.

Los efectos antivirales de IL-28, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG se ensayaron en ensayos de inhibición de efecto citopático (CPE). El ensayo midió la muerte celular usando células renales bovinas de Madin-Darby (MDBK) después de infección con virus VDVB citopático y la inhibición de la muerte celular añadiendo IL-28, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG. Las células MDBK se propagaron en medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía rojo fenol con suero equino al 10%, glutamina al 1% y penicilina-estreptomycin al 1%. Se realizaron ensayos de inhibición CPE en DMEM sin rojo fenol con FBS al 2%, glutamina al 1% y Pen-Strep al 1%. Un día antes de los ensayos, las células se trataron con tripsina (tripsina-EDTA 1%) se lavaron, se contaron y se sembraron en placa a 10^4 células/pocillo en placas BioCoat® de fondo plano de 96 pocillos (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) en un volumen de 100 μl /pocillo. Al día siguiente, el medio se eliminó y se añadió una alícuota pre-titulada de virus a las células. La cantidad de virus fue la dilución máxima que podría producir una destrucción celular completa (>80%) en el momento de desarrollo CPE máximo (día 7 para el VDVB). La viabilidad celular se determinó usando un reactivo CellTiter96® (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante, usando un lector de placa Vmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las muestras de ensayo se ensayaron a seis concentraciones cada una, se diluyeron en medio de ensayo en series semilogarítmicas. Se usó IFN α y RIBAVIRIN® como controles positivos. La muestra de ensayo se añadió en el momento de infección viral. Se determinaron los datos de fondo promedio y de corrección de color de la muestra para la reducción CPE en porcentaje y viabilidad celular en porcentaje a cada concentración con respecto a los controles y la CI_{50} se calculó con respecto a la CT_{50} .

IL-28, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG inhibieron la muerte celular introducida por el VDVB en células renales bovinas MDBK. IL-28 inhibió la muerte celular con una CI_{50} de 0,02 $\mu\text{g/ml}$, IL-29 inhibió la muerte celular con una CI_{50} de 0,19 $\mu\text{g/ml}$ y MetIL-29C172S-PEG inhibió la muerte celular con una CI_{50} de 0,45 $\mu\text{g/ml}$. Esto demuestra que IL-28 e IL-29 tienen actividad antiviral contra la familia de virus *Flaviviridae*.

Ejemplo 32

Inducción de genes estimulada con interferón por IL-28 e IL-29

A. Células mononucleares de sangre periférica humana

Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica humana recién aisladas en presencia de IL-29 (20 ng/ml), IFN α 2a (2 ng/ml) (PBL Biomedical Labs, Piscataway, NJ), o en medio solo. Las células se incubaron durante 6, 24, 48 o 72 horas y después se aisló el ARN total y se trató con DNasa sin RNasa. Se usó ARN total 100 ng como un molde para la RT-PCR® Semicuantitativa de Una Etapa usando Reactivos Master Mix® para RT-PCR de Una Etapa Taqman y cebadores específicos de genes como recomienda el fabricante (Applied Biosystems, Branchburg, NJ). Los resultados se normalizaron frente a HPRT y se muestran como el factor de inducción sobre el control solo con medio en cada momento. La Tabla 24 demuestra que IL-29 induce la Expresión de Genes Estimulada con Interferón en células mononucleares de sangre periférica humana en todos los momentos ensayados.

Tabla 24

	Factor de Inducción MxA	Factor de Inducción Pkr	Factor de Inducción OAS
6 h IL29	3,1	2,1	2,5
6 h IFN α 2a	17,2	9,6	16,2
24 h IL29	19,2	5,0	8,8
24 h IFN α 2a	57,2	9,4	22,3
48 h IL29	7,9	3,5	3,3
48 h IFN α 2a	18,1	5,0	17,3
72 h IL29	9,4	3,7	9,6
72 h IFN α 2a	29,9	6,4	47,3

B. Linfocitos T humanos activados

Se aislaron linfocitos T humanos por selección negativa de células mononucleares de sangre periférica recién extraídas usando el kit de aislamiento de células T Isolation[®] de Pan de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi, Auburn, CA). Después, los linfocitos T se activaron y expandieron durante 5 días con anti-CD3 unido a la placa, anti-CD28 soluble (0,5 μ g/ml), (Pharmingen, San Diego, CA) e Interleucina 2 (IL-2; 100 U/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN), se lavaron y después se expandieron durante 5 días más con IL-2. Después de la activación y expansión, las células se estimularon con IL-28A (20 ng/ml), IL-29 (20 ng/ml) o solo con medio durante 3, 6 o 18 horas. Se aisló ARN total y se trató con DNasa sin RNasa. Se realizó RT-PCR[®] Semicuantitativa de Una Etapa como se describe en el ejemplo anterior. Los resultados se normalizaron frente a HPRT y se muestran como el factor de inducción sobre el control solo con medio en cada momento. La Tabla 25 muestra que IL-28 e IL-29 inducen la expresión de Genes Estimulada con Interferón en linfocitos T humanos activados en todos los momentos ensayados.

Tabla 25

	Factor de Inducción MxA	Factor de Inducción Pkr	Factor de Inducción OAS
Donante N° 1 3 h IL28	5,2	2,8	4,8
Donante N° 1 3 h IL29	5,0	3,5	6,0
Donante N° 1 6 h IL28	5,5	2,2	3,0
Donante N° 1 6 h IL29	6,4	2,2	3,7
Donante N° 1 18 h IL28	4,6	4,8	4,0
Donante N° 1 18 h IL29	5,0	3,8	4,1
Donante N° 2 3 h IL28	5,7	2,2	3,5
Donante N° 2 3 h IL29	6,2	2,8	4,7
Donante N° 2 6 h IL28	7,3	1,9	4,4
Donante N° 2 6 h IL29	8,7	2,6	4,9
Donante N° 2 18 h IL28	4,7	2,3	3,6
Donante N° 2 18 h IL29	4,9	2,1	3,8

C. Hepatocitos humanos primarios

Se estimularon hepatocitos humanos recién aislados de dos donantes distintos (Cambrex, Baltimore, MD y CellzDirect, Tucson, AZ) con IL-28A (50 ng/ml), IL-29 (50 ng/ml), IFN α 2a (50 ng/ml) o solo medio durante 24 horas. Después de la estimulación, se aisló el ARN total y se trató con DNasa sin RNasa. Se realizó RT-PCR semicuantitativa de una etapa como se ha descrito anteriormente en el ejemplo anterior. Los resultados se normalizaron frente a HPRT y se muestran como el factor de inducción sobre el control solo con medio en cada momento. La Tabla 26 muestra que IL-28 e IL-29 inducen la expresión de Genes Estimulada con Interferón en hepatocitos humanos primarios después de 24 horas de estimulación.

Tabla 26

	Factor de Inducción MxA	Factor de Inducción Pkr	Factor de Inducción OAS
Donante N° 1 IL28	31,4	6,4	30,4
Donante N° 1 IL29	31,8	5,2	27,8
Donante N° 1 IFN- α 2a	63,4	8,2	66,7
Donante N° 2 IL28	41,7	4,2	24,3
Donante N° 2 IL29	44,8	5,2	25,2
Donante N° 2 IFN- α 2a	53,2	4,8	38,3

D. HepG2 y HuH7: Líneas celulares de hepatoma hepático humano

Se estimularon células HepG2 y HuH7 (ATCC N° 8065, Manassas, VA) con IL-28A (10 ng/ml), IL-29 (10 ng/ml), IFN α 2a (10 ng/ml), IFNB (1 ng/ml) (PBL Biomedical, Piscataway, NJ) o solo medio durante 24 o 48 horas. En un cultivo distinto, se estimularon células HepG2 como se ha descrito anteriormente con 20 ng/ml de MetIL-29C172S-PEG o MetIL-29-PEG. Se aisló ARN total y se trató con DNasa sin RNasa. Se usó ARN total 100 ng como molde para una RT-PCR semicuantitativa de una etapa como se ha descrito anteriormente. Los resultados se normalizaron frente a HPRT y se muestran como el factor de inducción sobre el control solo con medio en cada momento. La Tabla 27 muestra que IL-28 e IL-29 inducen la expresión de ISG en las líneas celulares de hepatoma hepático HepG2 y HuH7 después de 24 y 48 horas.

Tabla 27

	Factor de Inducción MxA	Factor de Inducción Pkr	Factor de Inducción OAS
HepG2 24 h IL28	12,4	0,7	3,3
HepG2 24 h IL29	36,6	2,2	6,4
HepG2 24 h IFN α 2a	12,2	1,9	3,2
HepG2 24 h IFN β	93,6	3,9	19,0
HepG2 48h IL28	2,7	0,9	1,1
HepG2 48h IL29	27,2	2,1	5,3
HepG2 48 h IFN α 2a	2,5	0,9	1,2
HepG2 48h IFN β	15,9	1,8	3,3
HuH7 24 h IL28	132,5	5,4	52,6
HuH7 24 h IL29	220,2	7,0	116,6
HuH7 24 h IFN α 2a	157,0	5,7	67,0
HuH7 24 h IFN β	279,8	5,6	151,8

(continuación)

	Factor de Inducción MxA	Factor de Inducción Pkr	Factor de Inducción OAS
HuH7 48h IL28	25,6	3,4	10,3
HuH7 48h IL29	143,5	7,4	60,3
HuH7 48 h IFN α 2a	91,3	5,8	32,3
HuH7 48h IFN β	65,0	4,2	35,7

Tabla 28

	Factor de Inducción MxA	Factor de Inducción OAS	Factor de Inducción Pkr
MetIL-29-PEG	36,7	6,9	2,2
MetIL-29C1725-PEG	46,1	8,9	2,8

- 5 Los datos mostrados son para las versiones metIL-29-PEG y metIL-29C172S-PEG 20 ng/ml de IL-29 después de cultivo durante 24 h.

Los datos mostrados se normalizaron frente a HPRT y se muestran como el factor de inducción sobre células no estimuladas.

Ejemplo 33

10 Actividad antiviral de IL-28 e IL-29 en el sistema de replicón del VHC

La capacidad de los fármacos antivirales para inhibir la replicación del VHC se sometió a ensayo *in vitro* con el sistema de replicón del VHC. El sistema de replicón consiste en la línea celular de hepatoma humano Huh7 que se ha transfectado con replicones de ARN subgenómico que dirigen la replicación constitutiva de los ARN genómicos del VHC (Blight, K. J. y col. Science 290: 1972-1974, 2000). El tratamiento de clones de replicón con IFN α a 10 UI/ml reduce la cantidad de ARN del VHC al 85% en comparación con las líneas celulares de control no tratadas. La capacidad de IL-28A e IL-29 para reducir la cantidad de ARN del VHC producido por los clones del replicón a las 72 horas indica que el estado antiviral conferido a las células Huh7, tras tratamiento con IL-28A/IL-29, es eficaz inhibiendo la replicación del replicón del VHC, y por lo tanto, muy probablemente es eficaz inhibiendo la replicación del VHC.

- 20 La capacidad de IL-28A e IL-29 para inhibir la replicación del VHC, determinada mediante el kit de ADN de cadena ramificada de Bayer, ha de realizarse en las siguientes condiciones:

1. solo IL28 a concentraciones crecientes (6)* hasta 1,0 μ g/ml
2. solo IL29 a concentraciones crecientes (6)* hasta 1,0 μ g/ml
3. solo PERIL29 a concentraciones crecientes (6)* hasta 1,0 μ g/ml
- 25 4. solo IFN α 2A a 0,3, 1,0 y 3,0 UI/ml
5. solo ribavirina.

El control positivo es IFN α y el control negativo es ribavirina.

Las células se tiñeron después de 72 horas con Azul de Alamar para evaluar la viabilidad.

*Las concentraciones para las condiciones 1-3 son:

- 30 1,0 μ g/ml, 0,32 μ g/ml, 0,10 μ g/ml, 0,032 μ g/ml, 0,010 μ g/ml, 0,0032 μ g/ml.

El clon de replicón (BB7) se trató 1X al día durante 3 días consecutivos con las dosis indicadas anteriormente. El ARN del VHC total se midió después de 72 horas.

Ejemplo 34

IL-28 e IL-29 tienen actividad antiviral contra virus patógenos

- 35 Se usaron dos procedimientos para ensayar la actividad antiviral *in vitro* de IL-28 e IL-29 contra un panel de virus

patógenos incluyendo, entre otros, adenovirus, virus paragripal, virus sincitial respiratorio, rinovirus, coxsackievirus, virus gripal, virus de la vacuna, virus del Nilo occidental, virus del dengue, virus de la encefalitis equina venezolana, virus pichinde y virus de la polio. Estos dos procedimientos son la inhibición del efecto citopático (CPE) inducido por virus (CPE) determinada mediante observación visual (microscópica) de las células y el aumento en la captación del colorante rojo neutro (RN) en las células. En el procedimiento de inhibición del CPE, se evalúan siete concentraciones del fármaco de ensayo (diluciones log 10, tales como 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 ng/ml) contra cada virus en microplacas de fondo plano de 96 pocillos que contienen células huésped. Los compuestos se añaden 24 horas antes que el virus y se usan a una concentración de aproximadamente 5 a 100 dosis infecciosas de cultivo celular por pocillo, dependiendo del virus, lo que equivale a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 a 0,0001 partículas infecciosas por célula. Los ensayos se leyeron después de una incubación a 37 °C durante un tiempo específico suficiente para permitir el desarrollo adecuado del efecto citopático viral. En el ensayo de captación del RN, se añadió colorante (concentración al 0,34% en medio) al mismo conjunto de placas usado para obtener las puntuaciones visuales. Después de 2 h, la intensidad de color del colorante absorbido por, y posteriormente eluido de, las células se determinó usando un auto lector de microplaca. La actividad antiviral se expresó como la concentración al 50% eficaz (inhibidora de virus) (CE50) determinada representando la concentración del compuesto frente al porcentaje de inhibición de un papel de gráfica semilogarítmica. Los datos CE50/CI50 en algunos casos puede determinarse mediante un programa informático de análisis de regresión apropiado. En general, los valores CE50 determinados mediante el ensayo RN son de dos a cuatro veces más elevados que la dosis obtenida mediante el procedimiento CPE.

Tabla 29: Ensayo Visual

Virus	Línea celular	Fármaco	CE50 Visual	CI50 Visual	IS Visual (CI50/CE50)
Adenovirus	A549	IL-28A	>10 µg/ml	> 10 µg/ml	0
Adenovirus	A549	IL-29	> 10 µg/ml	> 10 µg/ml	0
Adenovirus	A549	MetIL-29 C172S-PEG	> 10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus paragripal	MA-104	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus paragripal	MA-104	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus paragripal	MA-104	MetIL-29 C172S-PEG	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus sincitial respiratorio	MA-104	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus sincitial respiratorio	MA-104	IL-29	>10 µg/ml	> 10 µg/ml	0
Virus sincitial respiratorio	MA-104	MetIL-29 C172S-PEG	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Rinovirus 2	KB	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Rinovirus 2	KB	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Rinovirus 2	KB	MetIL-29 C172S-PEG	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Rinovirus 9	HeLa	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Rinovirus 9	HeLa	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Rinovirus 9	HeLa	MetIL-29 C172S-PEG	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Coxsackievirus B4	KB	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Coxsackievirus B4	KB	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Coxsackievirus B4	KB	MetIL-29 C172S-PEG	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Renal canina Maden-Darby	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Renal canina Maden-Darby	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0

(continuación)

Virus	Línea celular	Fármaco	CE50 Visual	CI50 Visual	IS Visual (CI50/CE50)
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Renal canina Maden-Darby	MetIL-29 C172S-PEG	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Vero	IL-28A	0,1 µg/ml	>10 µg/ml	>100
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Vero	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Vero	MetIL-29 C172S-PEG	0,045 µg/ml	>10 µg/ml	>222
Virus de la vacuna	Vero	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus de la vacuna	Vero	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus de la vacuna	Vero	MetIL-29 C172S-PEG	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus del Nilo Occidental	Vero	IL-28A	0,00001 µg/ml	>10 µg/ml	>1,000,0 00
Virus del Nilo Occidental	Vero	IL-29	0,000032 µg/ml	> 10 µg/ml	>300,000
Virus del Nilo Occidental	Vero	MetIL-29 C172S-PEG	0,001 µg/ml	>10 µg/ml	> 10,000
Virus del Dengue	Vero	IL-28A	0,01 µg/ml	>10 µg/ml	>1000
Virus del Dengue	Vero	IL-29	0,032 µg/ml	> 10 µg/ml	>312
Virus del Dengue	Vero	MetIL-29 C172S-PEG	0,0075 µg/ml	>10 µg/ml	>1330
Virus de la encefalitis equina venezolana	Vero	IL-28A	0,01 µg/ml	>10 µg/ml	>1000
Virus de la encefalitis equina venezolana	Vero	IL-29	0,012 µg/ml	>10 µg/ml	>833
Virus de la encefalitis equina venezolana	Vero	MetIL-29 C172S-PEG	0,0065 µg/ml	>10 µg/ml	>1538
Virus pichinde	BSC-1	IL-28A	>10 µg/ml	> 10 µg/ml	0
Virus pichinde	BSC-1	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus pichinde	BSC-1	MetIL-29 C172S-PEG	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Poliovirus	Vero	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Poliovirus	Vero	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Poliovirus	Vero	MetIL-29 C172S-PEG	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0

Tabla 30: Ensayo con Rojo Neutro

Virus	Línea celular	Fármaco	CE50 RN	CI50 RN	IS RN (CI50/CE50)
Adenovirus	A549	IL-28A	> 10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Adenovirus	A549	IL-29	> 10 µg/ml	>10 µg/ml	0

(continuación)

Virus	Línea celular	Fármaco	CE50 RN	CI50 RN	IS RN (CI50/ CE50)
Adenovirus	A549	MetIL-29 PEG C172S-	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus paragripal	MA-104	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus paragripal	MA-104	IL-29	> 10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus paragripal	MA-104	MetIL-29 PEG C172S-	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus sincitial respiratorio	MA-104	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus sincitial respiratorio	MA-104	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus sincitial respiratorio	MA-104	MetIL-29 PEG C172S-	5,47 µg/ml	>10 µg/ml	>2
Rinovirus 2	KB	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Rinovirus 2	KB	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Rinovirus 2	KB	MetIL-29 PEG C172S-	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Rinovirus 9	HeLa	IL-28A	1,726 µg/ml	>10 µg/ml	>6
Rinovirus 9	HeLa	IL-29	0,982 µg/ml	>10 µg/ml	>10
Rinovirus 9	HeLa	MetIL-29 PEG C172S-	2,051 µg/ml	>10 µg/ml	>5
Coxsackievirus B4	KB	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Coxsackievirus B4	KB	IL-29	> 10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Coxsackievirus B4	KB	MetIL-29 PEG C172S-	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Renal canina Maden-Darby	IL-28A	> 10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Renal canina Maden-Darby	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Renal canina Maden-Darby	MetIL-29 PEG C172S-	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Vero	IL-28A	0,25 µg/ml	>10 µg/ml	>40
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Vero	IL-29	2 µg/ml	>10 µg/ml	>5
Virus gripal (tipo A [H3N2])	Vero	MetIL-29 C 172S- PEG	1,4 µg/ml	>10 µg/ml	>7
Virus de la vacuna	Vero	IL-28A	> 10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus de la vacuna	Vero	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus de la vacuna	Vero	MetIL-29 PEG C172S-	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus del Nilo Oriental	Vero	IL-28A	0,0001 µg/ml	>10 µg/ml	>100,000
Virus del Nilo Occidental	Vero	IL-29	0,00025 µg/ml	>10 µg/ml	>40,000
Virus del Nilo Occidental	Vero	MetIL-29 PEG C172S-	0,00037 µg/ml	>10 µg/ml	>27,000

(continuación)

Virus	Línea celular	Fármaco	CE50 RN	CI50 RN	IS RN (CI50/ CE50)
Virus del Dengue	Vero	IL-28A	0,1 µg/ml	>10 µg/ml	>100
Virus del Dengue	Vero	IL-29	0,05 µg/ml	>10 µg/ml	>200
Virus del Dengue	Vero	MetIL-29 C172S-PEC3	0,06 µg/ml	>10 µg/ml	>166
Virus de la encefalitis equina venezolana	Vero	IL-28A	0,035 µg/ml	>10 µg/ml	>286
Virus de la encefalitis equina venezolana	Vero	IL-29	0,05 µg/ml	>10 µg/ml	>200
Virus de la encefalitis equina venezolana	Vero	MetIL-29 C172S-PEG	0,02 µg/ml	>10 µg/ml	>500
Virus pichinde	BSC-1	IL-28A	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus pichinde	BSC-1	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Virus pichinde	BSC-1	MetIL-29 C172S-PEG	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Poliovirus	Vero	IL-28A	> 1,672 µg/ml	>10 µg/ml	>6
Poliovirus	Vero	IL-29	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0
Poliovirus	Vero	MetIL-29 C172S-PEG	>10 µg/ml	>10 µg/ml	0

Ejemplo 35

IL-28, IL-29, metIL-29-PEG y metIL-29C172S-PEG estimulan la inducción de ISG en la línea celular hepática de ratón AML-12

- 5 Los genes estimulados por interferón (ISG) son genes inducidos por interferones (IFN) de tipo I y también por moléculas de la familia de IL-28 e IL-29, lo que sugiere que IFN, IL-28 e IL-29 inducen rutas similares lo que conduce a actividad antiviral. Los IFN de tipo I humanos (IFN α 1-4 e IFN β) tienen escasa o ninguna actividad sobre células de ratón, lo que se cree que está producido por la ausencia de reactividad cruzada entre especies. Para ensayar si la IL-28 e IL-29 humana tiene efectos sobre células de ratón, se evaluó la inducción de ISG por IL-28 e IL-29 humana mediante PCR en tiempo real en la línea celular derivada de hígado de ratón AML-12.

10 Las células AML-12 se sembraron en placas de 6 pocillos en medio DMEM completo a una concentración de 2×10^6 células/pocillo. Veinticuatro horas después de la siembra en placa de las células, se añadieron la IL-28 e IL-29 humana al cultivo a una concentración de 20 ng/ml. Como un control, las células se estimularon con IFN α de ratón (control positivo) o no se estimularon (negativo). Las células se recogieron a las 8, 24, 48 y 72 horas después de la adición de IL-28A (SEC ID N°: 2) o IL-29 (SEC ID N°: 4) humana derivada de CHO. Se aisló ARN de los sedimentos celulares usando RNAEasy-kit[®] (Qiagen, Valencia, CA). El ARN se trató con DNasa (Millipore, Billerica, MA) para depurar el ARN de cualquier ADN contaminante. El ADNc se generó usando la mezcla RT de Perkin-Elmer. La inducción de genes estimulados por interferón (ISG) se evaluó mediante PCR en tiempo real usando cebadores y sondas específicos de OAS, Pkr y Mx1 de ratón. Para obtener datos cuantitativos, se formó un dúplex de PCR en tiempo real con HPRT con PCR ISG. Se obtuvo una curva patrón usando cantidades conocidas de ARN de las PBL de ratón estimuladas con IFN. Todos los datos se muestran como expresión relativa con respecto a la expresión de HPRT interno.

20 La IL-28A e IL-29 humana estimuló la inducción ISG en la línea celular de hepatocitos de ratón AML-12 y demostró que, a diferencia de los IFN de tipo I, las proteínas de la familia de IL-28/29 muestran reactividad cruzada entre especies.

Tabla 31

Estimulación	OAS	PkR	Mx1
Ninguna	0,001	0,001	0,001
IL-28 Humana	0,04	0,02	0,06
IL-29 Humana	0,04	0,02	0,07
IL-28 de Ratón	0,04	0,02	0,08
IFN α de Ratón	0,02	0,02	0,01

Todos los datos mostrados se expresaron como un factor con respecto a la expresión del gen HPRT ng de ARNm de OAS = valor normalizado de cantidad de ARNm de OAS con respecto a ng interno del gen constitutivo de ARNm de HPRT, HPRT.

Como ejemplo, se muestran los datos a las 48 horas.

Tabla 32

células AML12			
	Factor de inducción de Mx1	Factor de inducción de OAS	Factor de inducción de nPkr
MetIL-29-PEG	728	614	8
MetIL-29C172S-PEG	761	657	8

Las células se estimularon con 20 ng/ml de metIL-29-PEG o metIL-29C172S-PEG durante 24 horas.

Los datos mostrados se normalizan frente a HPRT y se muestran como factor de inducción sobre células no estimuladas.

Ejemplo 36

Los ISG se inducen eficazmente en bazos de ratones transgénicos que expresan la IL-29 humana

Se generaron ratones transgénicos (Tg) que expresaban IL-29 bajo el control del promotor Eu-Ick. Para estudiar si la IL-29 humana tenía actividad biológica *in vivo* en ratones, se analizó la expresión de los ISG por PCR en tiempo real en los bazos de ratones transgénicos que expresaban IL-29 bajo el control de Eu-Ick.

Se generaron ratones transgénicos (C3H/C57BL/6) usando una construcción que expresaba el gen de IL-29 humano bajo el control del promotor Eu-Ick. Este promotor es activo en linfocitos T y linfocitos B. Ratones transgénicos y miembros de la misma camada no transgénicos (n=2/gp) se sacrificaron cuando tenían aproximadamente 10 semanas de vida. Los bazos de los ratones se aislaron. El ARN se aisló de los sedimentos celulares usando RNeasy-kit[®] (Qiagen). El ARN se trató DNasa para depurar el ARN de cualquier ADN contaminante. Se generó ADNc usando la mezcla Perkin-Elmer RT[®]. La inducción genes ISG se evaluó por PCR en tiempo real usando cebadores y sondas (5' FAM, 3' NFQ) específicos de OAS, Pkr y Mx1 de ratón. Para obtener datos cuantitativos, se formó un dúplex de PCR en tiempo real con HPRT con PCR ISG. Adicionalmente, se obtuvo una curva patrón usando cantidades conocidas de PBL de ratón estimuladas con IFN. Todos los datos se muestran como expresión relativa con respecto a la expresión de HPRT interno.

Los bazos aislados de ratones Tg que expresaban IL-29 mostraron una alta inducción de los ISG con OAS, Pkr y Mx1 en comparación con sus controles de los miembros de la misma camada no Tg lo que sugiere que la IL-29 es biológicamente activa en ratones *in vivo*.

Tabla 33

Ratones	OAS	PkR	Mx1
No-Tg	4,5	4,5	3,5
IL-29 Tg	12	8	21

Todos los datos mostrados son el factor de expresión con respecto a la expresión del gen de HPRT. Se muestra la expresión promedio en dos ratones.

Ejemplo 37

La proteína IL-28 e IL-29 humana induce expresión de genes ISG en hígado, bazo y sangre de ratones

- 5 Para determinar si la IL-28 e IL-29 humana inducía la expresión de genes estimulados por interferón *in vivo*, se inyectó en ratones la proteína IL-28A e IL-29 humana derivada de CHO. Además, también se ensayó la IL-29 derivada de *E. coli* en ensayos *in vivo* como se ha descrito anteriormente usando MetIL-29C172S-PEG y MetIL-29-PEG. A diversos momentos y a diferentes dosis, la inducción de genes ISG se midió en la sangre, bazo e hígados de los ratones.
- 10 A ratones C57BL/6 se les inyectó por vía i.p. o i.v. una serie de dosis (10 µg - 250 µg) de IL-28A e IL-29 humana derivada de CHO o MetIL-29C172S-PEG y MetIL-29C16-C113-PEG. Los ratones se sacrificaron a diversos momentos (1 h-48 h). Los bazos y los hígados se aislaron de los ratones y el ARN se aisló. El ARN también se aisló de las células sanguíneas. Las células se sedimentaron y el ARN se aisló de los sedimentos usando RNeasy-kit® (Qiagen). El ARN se trató con DNasa (Amicon) para depurar el ARN de cualquier ADN contaminante. Se generó
- 15 ADNc usando mezcla Perkin-Elmer RT (Perkin-Elmer). La inducción de genes ISG se midió por PCR en tiempo real usando cebadores y sondas específicos de OAS, Pkr y Mx1 de ratón. Para obtener datos cuantitativos, se formó un dúplex de PCR en tiempo real con HPRT con PCR ISG. Se calculó una curva patrón usando cantidades conocidas de PBS de ratón estimuladas con IFN. Todos los datos se muestran como expresión relativa con respecto a la expresión de HPRT interno. La IL-29 humana indujo la expresión de genes ISG (OAS, Pkr, Mx1) en los hígados, bazo y sangre de ratones de una manera dependiente de la dosis.
- 20

La expresión de los ISG alcanzó su máximo entre 1-6 horas después de la inyección y mostró una expresión prolongada por encima de los ratones de control hasta las 48 horas. En este experimento, la IL-28A humana no indujo la expresión de genes ISG.

Tabla 34

Inyección	OAS-1 h	OAS-6 h	OAS-24 h	OAS-48 h
Ninguna – hígado	1,6	1,6	1,6	1,6
IL-29 hígado	2,5	4	2,5	2,8
Ninguna - bazo	1,8	1,8	1,8	1,8
IL-29 - bazo	4	6	3,2	3,2
Ninguna – sangre	5	5	5	5
IL-29 sangre	12	18	11	10

- 25 Los resultados mostrados son el factor de expresión con respecto a la expresión del gen de HPRT. Se muestra un conjunto de datos de muestra para OAS inducida por IL-29 en hígado con una sola inyección de 250 µg por vía i.v.. Los datos mostrados son la expresión promedio de 5 animales diferentes/grupo.

Tabla 35

Inyección	OAS (24 h)
Ninguna	1,8
IL-29 10 µg	3,7
IL-29 50 µg	4,2
IL-29 250 µg	6

30

Tabla 36

	MetIL-29-PEG				MetIL-29C172S-PEG				Sin tratar
	3 h	6 h	12 h	24 h	3 h	6 h	12 h	24 h	24 h
PKR	18,24	13,93	4,99	3,77	5,29	5,65	3,79	3,55	3,70
OAS	91,29	65,93	54,04	20,81	13,42	13,02	10,54	8,72	6,60
Mx1	537,51	124,99	33,58	35,82	27,89	29,34	16,61	0,00	10,98

A los ratones se les inyectaron 100 µg de proteína por vía i.v.. Los datos mostrados son el factor de expresión de la expresión de HPRT de hígados de ratones. Se obtuvieron datos similares de la sangre y bazo de los ratones.

5 Ejemplo 38

IL-28 e IL-29 inducen la proteína ISG en ratones

Para analizar el efecto de la IL-28 e IL-29 humana sobre la inducción de la proteína ISG (OAS), se ensayaron el suero y el plasma de ratones tratados con IL-28 e IL-29 para determinar la actividad de OAS.

- 10 A ratones C57BL/6 se les inyectó por vía i.v PBS o una serie de concentraciones (10 µg-250 µg) de IL-28 o IL-29 humana. El suero y el plasma se aislaron de los ratones a diversos momentos y se midió la actividad OAS usando el kit de radioinmunoensayo (RIA) OAS de Eiken Chemicals (Tokio, Japón).

La actividad de OAS inducida por IL-28 e IL-29 en el suero y el plasma de los ratones muestra que estas proteínas son biológicamente activas *in vivo*.

Tabla 37

Inyección	OAS-1 h	OAS-6 h	OAS-24 h	OAS-48 h
Ninguna	80	80	80	80
IL-29	80	80	180	200

15

La actividad de OAS se muestra a pmol/dl de plasma para una sola concentración (250 mg) de IL-29 humana.

Ejemplo 39

IL-28 e IL-29 inhiben la patología adenoviral en ratones

- 20 Para ensayar las actividades antivirales de IL-28 e IL-29 contra virus que infectan el hígado, se sometieron a ensayo muestras de ensayo en ratones contra vectores adenovirales infecciosos que expresaban un gen interno de la proteína fluorescente verde (GFP). Cuando estos virus se inyectaron por vía intravenosa, se dirigieron principalmente al hígado para la expresión génica. Los adenovirus se replican mal, pero producen daño hepático debido a infiltrados celulares inflamatorios que pueden controlarse midiendo niveles de suero de enzimas hepáticas como AST y ALT, o mediante observación directa de patología hepática.

- 25 Diariamente a ratones C57B1/6 se administraron inyecciones intraperitoneales de IL-28 de ratón 50 µg (zcyto24 como se muestra en la SEC ID N°: 8) o metIL-29C172S- PEG durante 3 días. A los animales de control se les inyectó PBS. Una hora después de la 3ª dosis, a los ratones se les proporcionó una sola inyección en embolada intravenosa en la vena de la cola del vector adenoviral, AdGFP (1 X 10⁹ unidades formadoras de placas (ufp)). Después de esto, cada dos días a los ratones se les proporcionó una dosis adicional de PBS, IL-28 de ratón o metIL-29C172S-PEG durante 4 dosis más (total de 7 dosis). Una hora después de la dosis final de PBS, los ratones tratados con IL-28 de ratón o metIL-29C172S-PEG de ratón se sometieron a extracción sanguínea terminal y se sacrificaron. Se analizó el suero y el tejido hepático. El suero se analizó con respecto a enzimas hepáticas AST y ALT. El hígado se aisló y se analizó para detectar la expresión e histología de GFP. Para la histología, las muestras de hígado se fijaron en formalina y después se incluyeron en parafina seguido de tinción con H y E. Secciones de hígado que se habían ocultado para el tratamiento se examinaron con un microscopio óptico. Se observaron los cambios y se puntuaron sobre una escala diseñada para medir la patología e inflamación hepática.
- 30
- 35

IL-28 e IL-29 de ratón inhibieron la infección adenoviral y la expresión génica se midió por fluorescencia hepática. Los ratones tratados con PBS (n=8) tuvieron un promedio de fluorescencia hepática relativa de 52,4 (unidades

arbitrarias). Por otro lado, los ratones tratados con IL-28 (n=8) tuvieron una fluorescencia hepática relativa de 34,5 y los ratones tratados con IL-29 (n=8) tuvieron una fluorescencia hepática relativa de 38,9. Una reducción en la infección adenoviral y expresión génica condujo a una patología hepática reducida medida por niveles de ALT y AST en suero e histología. Los ratones tratados con PBS (n=8) tuvieron un valor medio de AST en suero de 234 U/l (unidades/litro) y un valor medio de ALT en suero de 250 U/l. Por otro lado, los ratones tratados con IL-28 (n=8) tuvieron un valor medio de AST en suero de 193 U/l y un valor medio de ALT en suero de 216 U/l y los ratones tratados con IL-29 (n=8) tuvieron un valor medio de AST en suero de 162 U/l y un valor medio de ALT en suero de 184 U/l. Además, la histología hepática indicó que los ratones a los que se había proporcionado IL-28 o IL-29 de ratón tuvieron puntuaciones hepáticas y de inflamación más bajas que el grupo tratado con PBS. Los hígados del grupo tratado con IL-29 también tuvieron menor proliferación de células sinusoidales, cifras mitóticas más bajas y menos cambios en los hepatocitos (por ejemplo vacuolación, presencia de núcleos múltiples, agrandamiento de hepatocitos) en comparación con el grupo tratado con PBS. Estos datos demuestran que IL-28 e IL-29 de ratón tienen propiedades antivirales contra un virus hepatotrófico.

Ejemplo 40

Modelos LCMV

Las infecciones por el virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML) en ratones son un modelo excelente de infección aguda y crónica. Estos modelos se usan para evaluar el efecto de las citocinas sobre la respuesta inmunitaria antiviral y los efectos de carga viral y la respuesta inmunitaria antiviral que tienen la IL-28 e IL-29. Los dos modelos usados son: infección por VCML cepa Armstrong (aguda) e infección por VCML del Clon 13 (crónica). (Véase, por ejemplo, Wherry y col., J. Virol. 77: 4911-4927, 2003; Blattman y col., Nature Med. 9(5): 540-547, 2003; Hoffman y col., J. Immunol. 170: 1339-1353, 2003). Existen tres fases de desarrollo de linfocitos T CD8 en respuesta a virus: 1) expansión, 2) contracción y 3) memoria (modelo agudo). Se inyecta IL-28 o IL-29 durante cada fase en los dos modelos, agudo y crónico. En el modelo crónico, la IL-28 o IL-29 se inyecta 60 días después de la infección para evaluar el efecto de IL-28 o IL-29 sobre la carga viral persistente. En ambos modelos, agudo y crónico, se inyecta IL-28 o IL-29 y se examina la carga viral en sangre, bazo e hígado. Pueden examinarse otros parámetros que incluyen: tinción por flujo con tetramer para contar el número de linfocitos T CD8+ específicos del VCML; capacidad de las células tetramer+ para producir citocinas cuando se estimulan con su antígeno VCML afín; y la capacidad de linfocitos T CD8+ específicos del VCML para proliferar en respuesta a su antígeno VCML afín. Los linfocitos T específicos de VCML se fenotipan mediante citometría de flujo para evaluar la activación de las células y el estado de diferenciación. Además, se examina la capacidad de CTL específica del VCML para lisar células diana que portan su antígeno VCML afín. También se evalúa el número y la función de linfocitos T CD4+ específicos del VCML.

Se determina una reducción en la carga viral después del tratamiento con IL-28 o IL-29. Una reducción del 50% de la carga viral en cualquier órgano, especialmente en el hígado, sería significativa. Para los ratones tratados con IL-28 o IL-29, también puede considerarse significativo un aumento del 20% en el porcentaje de linfocitos T positivos a tetramer que proliferan, fabrican citocinas o presentan un fenotipo maduro con respecto a los ratones no tratados.

La inyección con IL-28 o IL-29 que conduce a una reducción de la carga viral se debe a un control más eficaz de la infección viral específicamente en el modelo crónico en el que las titulaciones virales no tratadas permanecen elevadas durante un periodo de tiempo prolongado. Se considera significativa una reducción de factor 2 en la titulación viral con respecto a los ratones no tratados.

Ejemplo 41

Modelo gripal de infección viral aguda

A. Experimento preliminar para ensayar la actividad antiviral

Para determinar actividad antiviral de IL-28 o IL-29 sobre infección aguda por el virus de la gripe, se realiza un estudio *in vivo* usando ratones c57B1/6 infectados con el virus de la gripe usando el siguiente protocolo:

Animales: ratones BALB/c hembra de 6 semanas de vida (Charles River) con 148 ratones, 30 por grupo.
Grupos:

- (1) Control absoluto (no infectado) desarrollado en paralelo para la titulación de anticuerpos e histopatología (2 animales por grupo)
- (2) solución salina con Vehículo (i.p.)
- (3) Amantadina (control positivo) 10 µg/día durante 5 días (por vía oral) comenzando 2 horas antes de la inyección
- (4) Tratados con IL-28 o IL-29 (5 µg, i.p. comenzando 2 horas después de la inyección)
- (5) IL-28 o IL-29 (25 µg, i.p. comenzando 2 horas después de la infección)
- (6) IL-28 o IL-29 (125 µg, i.p. comenzando 2 horas después de la infección)

Día 0 – Excepto para los controles absolutos, todos los animales se infectaron con el virus de la gripe

Para la carga viral (10 a DL50)
Para pruebas de inmunología (DL30)

Día 0 - 9 – inyecciones diarias de IL-28 o IL-29 (i.p.)

Se registra el peso corporal y el aspecto general (3 veces/semana)

5 Día 3 – se sacrifica a 8 animales por grupo

Carga viral en pulmón derecho (TCID50)
Histopatología en pulmón izquierdo
Muestra de sangre para titulación de anticuerpos

10 Día 10 – se sacrifica a todos los animales supervivientes, se recogen muestras de sangre para la titulación de anticuerpos, se aíslan linfocitos pulmonares (4 grupos de 3) para ensayo CTL directo (en los 5 grupos) y se realiza inmunofenotipado cuantitativo para los siguientes marcadores: CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/CD8/CD11b, CD8/CD44/CD62L, CD3/DX5, GR-1/F480 y CD19.

Estudio N° 2

15 El estudio de eficacia de IL-28 o IL-29 en ratones C57B1/6 infectados con virus de ratón adaptados se realiza usando ratones C57B1/6 hembra de 8 semanas de vida (Charles River).

Grupo 1: Vehículo (i.p.)

Grupo 2: Control positivo: Anticuerpo neutralizante antigripal (antigripal A/USSR (H1N1) de cabra (Chemicon International, Temecula, CA); 40 µg/ratón a las 2 h y a las 4 h después de la infección (10 µl intranasal)

Grupo 3: IL-28 o IL-29 (5 µg, i.p.)

20 Grupo 4: IL-28 o IL-29 (25 µg, i.p.)

Grupo 5: IL-28 o IL-29 (125 µg, i.p.)

Después de las observaciones vitales se prepararon pruebas inmunológicas:

Día 0 – todos los animales se infectaron con el virus gripal (dosis determinada en el experimento 2)

Día 0 - 9 – inyecciones diarias de IL-28 o IL-29 (i.p.)

25 Cada dos días se registra el peso corporal y aspecto general

Día 10 – se sacrifican los animales supervivientes y se realiza un ensayo viral para determinar la carga viral pulmonar.

Aislamiento de linfocitos pulmonares (para ensayo CTL directo en los pulmones usando EL-4 como diana a diferentes proporciones E:T (en base a los mejores resultados de los experimentos 1 y 2).

30 Tinción con tetramer: Se evaluó el número de linfocitos T CD8+ que se unían a tetrámeros de Clase I del MHC que contenían el epítipo de la nucleoproteína (NP) A gripal usando complejos de MHC clase I con péptido virales: FLU-NP₃₆₆₋₃₇₄/D^b (ASNEN-METM), (LMCV péptido/D^b).

Inmunofenotipado cuantitativo de los siguiente: CD8, tetramer, IFN_γ intracelular, NK1.1, CD8, tetramer, CD62L, CD44, CD3(+ o -), NK1.1(+), IFN_γ intracelular, CD4, CD8, NK1.1, DX5, CD3 (+ o -), NK1.1, DX5, tetramer,

35 Para ajuste citométrico se utilizaron muestras de un solo color

Estudio de supervivencia/re-exposición

Día 30: Estudio de supervivencia con ratones tratados durante 9 días con diferentes dosis de IL-28 o IL-29 o con control positivo de anticuerpo antigripal. Se midió el peso corporal y la producción de anticuerpos en muestras de suero individuales (Total, IgG1, IgG2a, IgG2b).

40 Estudio de re-exposición

Día 0: Ambos grupos se infectarán con el virus A/PR (1LD30).

Grupo 6 no se tratará.

Grupo 7 se tratará durante 9 días con 125 µg de IL-28 o IL-29.

Día 30: Estudio de supervivencia

45 Se mide el peso corporal y la producción de anticuerpos en muestras de suero individuales (Total, IgG1, IgG2a, IgG2b).

Día 60: Estudio de re-exposición

Los supervivientes en cada grupo se dividirán en 2 subgrupos

Grupo 6A y 7A se re-expondrán al virus A/PR (1 DL30)

Grupo 6B y 7B se re-expondrán al virus A/PR (1 DL30).

- 5 Ambos grupos se supervisarán y el día del sacrificio se determinará. Se mide el peso corporal y la producción de anticuerpos en muestras de suero individuales (Total, IgG1, IgG2a, IgG2b).

Ejemplo 42

IL-28 e IL-29 tienen actividad antiviral contra el virus de la hepatitis B (VHB) *in vivo*

- 10 Un modelo de ratón transgénico (Guidotti y col., J. Virology 69: 6158-6169, 1995) da soporte a la replicación de altos niveles del VHB infeccioso y se ha usado como un modelo quimioterapéutico para infección del VHB. Se trataron ratones transgénicos con fármacos antivirales y después del tratamiento se midieron los niveles de ADN y ARN del VHB en el hígado y suero de los ratones transgénicos. Después del tratamiento también se midieron los niveles de proteína del VHB en suero de los ratones transgénicos. Este modelo se había usado para evaluar la eficacia de la lamivudina y del IFN- α en cuanto a la reducción de las titulaciones virales del VHB.
- 15 A ratones TG (macho) infectados con VHB se les administraron inyecciones intraperitoneales de 2,5, 25 o 250 microgramos de IL-28 o IL-29 cada dos días durante 14 días (un total de 8 dosis). Se extrajo sangre a los ratones para recoger suero el día del tratamiento (día 0) y el día 7. Una hora después de la dosis final de IL-29 los ratones se sometieron a extracción sanguínea terminal y se sacrificaron. El suero y el hígado se analizaron para detectar el ADN del VHB, ARN del VHB en hígado, ADN del VHB en suero, Hbc en hígado, Hbe en suero y HBs en suero.
- 20 La reducción de ADN del VHB en hígado, ARN del VHB en hígado, ADN del VHB en suero, Hbc en hígado, Hbe en suero o HBs en suero en respuesta a IL-28 o IL-29 refleja actividad antiviral de estos compuestos contra el VHB.

Ejemplo 43

IL-28 e IL-29 inhiben la replicación del herpesvirus-8 (HHV-8) humano en células BCBL-1

- 25 La actividades antivirales de IL-28 e IL-29 se ensayaron contra el HHV-8 en un sistema de infección *in vitro* usando una línea de células linfoides-B, BCBL-1.
- En el ensayo del HHV-8 se ensayaron el compuesto de ensayo y control con ganciclovir a cinco concentraciones cada uno, diluido en una serie semilogarítmica. Los criterios de valoración fueron PCR TaqMan para ADN del HHV-8 extracelular (CI₅₀) y números de células usando reactivo CellTiter96® (TC₅₀; Promega, Madison, WI). En resumen, células BCBL-1 se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de 16-24 horas, las células se lavaron y el medio se sustituyó por medio completo que contenía diversas concentraciones del compuesto de ensayo por triplicado. El ganciclovir fue el control positivo, mientras que el medio solo fue un control negativo (control viral, CV). Tres días después el medio de cultivo se sustituyó por medio reciente que contenía el compuesto de ensayo apropiadamente diluido. Seis días después de la administración inicial del compuesto de ensayo, se recogió el sobrenadante del cultivo celular, se trató con pronasa y DNasa y después se usó en un ensayo de PCR TaqMan cuantitativa en tiempo real.
- 30 El ADN del HHV-8 amplificado por PCR se detectó en tiempo real controlando los aumentos de las señales de fluorescencia producidas por la degradación exonucleolítica de una molécula sonda fluorescente inactivada que se hibrida con el ADN del HHV-8 amplificado. Para cada amplificación PCR, se generó simultáneamente una curva patrón usando diluciones de ADN del HHV-8 purificado. La actividad antiviral se calculó a partir de la reducción en cuanto a los niveles de ADN del HHV-8 (CI₅₀). Después se empleó un nuevo ensayo de captación de colorante para medir la viabilidad celular que se usó para calcular la toxicidad (CT₅₀). Se calculó el índice terapéutico (TI) como CT₅₀/CI₅₀.
- 40 IL-28 e IL-29 inhiben la replicación viral del HHV-8 en células BCBL-1. IL-28A tuvo un valor CI₅₀ de 1 µg/ml y un valor CT₅₀ de >10 µg/ml (TI >10). IL-29 tuvo un valor CI₅₀ de 6,5 µg/ml y un valor CT₅₀ de >10 µg/ml (TI >1,85). MetIL-29C172S-PEG tuvo un valor CI₅₀ de 0,14 µg/ml y un valor CT₅₀ de >10 µg/ml (TI >100).
- 45

Ejemplo 44

Actividad antiviral de IL-28 e IL-29 contra el virus de Epstein Barr (VEB)

- 50 La actividades antivirales de IL-28 e IL-29 se sometieron a ensayo contra el VEB en un sistema de infección *in vitro* en una línea de células linfoides B, P3HR-1. En el ensayo del VEB el compuesto de ensayo y un control se ensayaron a cinco concentraciones cada uno, diluidas en series semilogarítmicas. Los parámetros de evaluación fueron PCR TaqMan para el ADN del VEB extracelular (CI₅₀) y números de células usando reactivo CellTiter96®

(TC₅₀; Promega). En resumen, se sembraron células P3HR-1 en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de 16-24 horas las células se lavaron y el medio se sustituyó por medio completo que contenía diversas concentraciones del compuesto de ensayo por triplicado. Además de un control positivo, se añadió solo medio a las células como control negativo (control viral, CV). Tres días después el medio de cultivo se sustituyó por medio reciente que contenía el compuesto de ensayo apropiadamente diluido. Seis días después de la administración inicial del compuesto de ensayo, se recogió el sobrenadante del cultivo celular, se trató con pronasa y DNasa y después se usó en un ensayo de PCR TaqMan cuantitativa en tiempo real. El ADN del VEB amplificado por PCR se detectó en tiempo real controlando los aumentos de las señales de fluorescencia producidas por la degradación exonucleolítica de una molécula sonda fluorescente inactivada que se hibrida con el ADN del VEB amplificado. Para cada amplificación PCR, se generó simultáneamente una curva patrón usando diluciones de ADN del VEB purificado. La actividad antiviral se calculó a partir de la reducción en cuanto a los niveles de ADN del VEB (CI₅₀). Después se empleó un nuevo ensayo de captación de colorante para medir la viabilidad celular que se usó para calcular la toxicidad (CT₅₀). El índice terapéutico (TI) se calculó como CT₅₀/CI₅₀.

Ejemplo 45

Actividad antiviral de IL-28 e IL-29 contra el Herpesvirus Simple 2 (HSV-2)

Las actividades antivirales de IL-28 e IL-29 se ensayaron contra el HSV-2 en un sistema de infección *in vitro* en células Vero. Los efectos antivirales de IL-28 e IL-29 se evaluaron en cuanto a la inhibición de ensayos de efectos citopáticos (CPE). El ensayo implica la destrucción de células Vero por el virus HSV-2 citopático y la inhibición de la destrucción celular por IL-28 e IL-29. Las células Vero se propagaron en medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía rojo fenol con suero equino al 10%, glutamina al 1% y penicilina-estreptamicina al 1%, mientras que los ensayos de inhibición CPE se realizaron en DMEM sin rojo fenol con FBS al 2%, glutamina al 1% y Pen-Strep al 1%. El día anterior al ensayo, las células se trataron con tripsina (tripsina-EDTA al 1%), se lavaron, se realizó su recuento y se sembraron en placa a 10⁴ células/pocillo en una placa BioCoat[®] de fondo plano de 96 pocillos (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) en un volumen de 100 µl/pocillo. Al día siguiente, el medio se eliminó y a las células se añadió una alícuota pre-titulada de virus. La cantidad de virus usada es la dilución máxima que proporcionaría una muerte celular completa (>80%) en el momento del desarrollo CPE máximo. La viabilidad celular se determinó usando un reactivo CellTiter 96[®] (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante, usando un lector de placa Vmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los compuestos se ensayaron a seis concentraciones cada uno, se diluyeron en medio de ensayo en una serie semilogarítmica. Se usó aciclovir como un control positivo. Los compuestos se añadieron en el momento de la infección viral. Se determinaron los datos de fondo promedio y de corrección de color para la reducción CPE en porcentaje y viabilidad celular en porcentaje a cada concentración con respecto a los controles y la CI₅₀ se calculó con respecto a la CT₅₀.

En este ensayo, IL-28A, IL-29 y MetIL-29C172S-PEG no inhibieron la muerte celular (CI₅₀ de >10 µg/ml). En este ensayo tampoco se detectó actividad antiviral del IFN_γ.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics, L.L.C. and Bristol-Myers Squibb Company

<120> PREPARACIONES HOMOGÉNEAS DE IL-28 E IL-29

<130> P28736EP-D1-PCT-MRM/PJG

<140> EP 08150287.4

<141> 09-08-2004

<150> US 60/493.194

<151> 07-08-2003

<150> US 60/551.841

<151> 10-03-2004

<150> US 60/559.142

<151> 02-04-2004

<160> 161

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 734

<212> ADN

<213> Homo sapiens

```

<220>
<221> péptido_señal
<222> (53)...(127)

5  <221> péptido_maduro
    <222> (128) ... (655)

    <221> CDS
    <222> (53)...(655)

10 <400> 1

    tgggtgacag cctcagagtg tttcttctgc tgacaaagac cagagatcag ga atg aaa 58
                                     Met Lys
                                     -25

    cta gac atg act ggg gac tgc acg cca gtg ctg gtg ctg atg gcc gca 106
    Leu Asp Met Thr Gly Asp Cys Thr Pro Val Leu Val Leu Met Ala Ala
                -20                -15                -10

    gtg ctg acc gtg act gga gca gtt cct gtc gcc agg ctc cac ggg gct 154
    Val Leu Thr Val Thr Gly Ala Val Pro Val Ala Arg Leu His Gly Ala
                -5                1                5

    ctc ccg gat gca agg ggc tgc cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct 202
    Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser
    10                15                20                25

    cca cag gag ctg cag gcc ttt aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag 250

```

```

Pro Gln Glu Leu Gln Ala Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu
      30                      35                      40

tcg ctt ctg ctg aag gac tgc agg tgc cac tcc cgc ctc ttc ccc agg 298
Ser Leu Leu Leu Lys Asp Cys Arg Cys His Ser Arg Leu Phe Pro Arg
      45                      50                      55

acc tgg gac ctg agg cag ctg cag gtg agg gag cgc ccc atg gct ttg 346
Thr Trp Asp Leu Arg Gln Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Met Ala Leu
      60                      65                      70

gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac 394
Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp
      75                      80                      85

act gac cca gcc ctg gtg gac gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg 442
Thr Asp Pro Ala Leu Val Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu
      90                      95                      100                      105

cac cat atc ctc tcc cag ttc cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg 490
His His Ile Leu Ser Gln Phe Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr
      110                      115                      120

gca ggg ccc agg acc cgg ggc cgc ctc cac cat tgg ctg tac cgg ctc 538
Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu
      125                      130                      135

cag gag gcc cca aaa aag gag tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc 586
Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val
      140                      145                      150

acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc 634
Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala
      155                      160                      165

agt ggg gac ctg tgt gtc tga ccctcccacc agtcatgcaa cctgagattt 685
Ser Gly Asp Leu Cys Val *
170                      175

tatttataaaa ttagccactt gtcttaattt attgccaccc agtcgctat 734

```

<210> 2
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(25)

<400> 2

```

Met Lys Leu Asp Met Thr Gly Asp Cys Thr Pro Val Leu Val Leu Met
-25                      -20                      -15                      -10
Ala Ala Val Leu Thr Val Thr Gly Ala Val Pro Val Ala Arg Leu His
      -5                      1                      5
Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser
      10                      15                      20

```

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

<210> 3
 <211> 856
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> péptido_senial
 <222> (98)...(154)

<221> péptido_maduro
 <222> (155)...(700)

<221> CDS
 <222> (98)...(700)

<400> 3

aattaccttt tcaactttaca cacatcatct tggattgccc attttgogtg gctaaaaagc 60
 agagccatgc cgctggggaa gcagttgcga ttttagcc atg gct gca gct tgg acc 115
 Met Ala Ala Ala Trp Thr
 -15
 gtg gtg ctg gtg act ttg gtg cta ggc ttg gcc gtg gca ggc cct gtc 163
 Val Val Leu Val Thr Leu Val Leu Gly Leu Ala Val Ala Gly Pro Val
 -10 -5 1
 ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac att ggc agg 211
 Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg
 5 10 15
 ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag aag gcc agg 259
 Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg
 20 25 30 35
 gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt tgc agc tct 307
 Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser

ES 2 405 209 T3

	40	45	50	
cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag gtg agg gag				355
Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu				
	55	60	65	
cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag gtc ctg				403
Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu				
	70	75	80	
gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac cag ccc ctt				451
Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu				
	85	90	95	
cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt atc cag cct				499
His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro				
	100	105	110	115
cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac cac tgg ctg				547
Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu				
	120	125	130	
cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc tgc ctg gag				595
His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu				
	135	140	145	
gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctc aaa				643
Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys				
	150	155	160	
tat gtg gcc gat ggg aac ctg tgt ctg aga acg tca acc cac cct gag				691
Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu				
	165	170	175	
tcc acc tga caccacacac cttatttatg cgctgagccc tactccttcc				740
Ser Thr *				
180				
ttaatttatt tcctctcacc ctttatttat gaagctgcag ccctgactga gacatagggc				800
tgagtttatt gttttacttt tatacattat gcacaaataa acaacaagga attgga				856

<210> 4
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(19)

<400> 4

Met	Ala	Ala	Ala	Trp	Thr	Val	Val	Leu	Val	Thr	Leu	Val	Leu	Gly	Leu
				-15				-10						-5	
Ala	Val	Ala	Gly	Pro	Val	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys
			1				5				10				
Gly	Cys	His	Ile	Gly	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Ala
	15				20						25				

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

<210> 5
 <211> 734
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> péptido_señal
 <222> (53)...(127)

<221> péptido_maduro
 <222> (128)...(655)

<221> CDS
 <222> (53)...(655)

<400> 5

tgggtgacag cctcagagtg tttcttctgc tgacaaagac cagagatcag ga atg aaa 58
 Met Lys
 -25

cta gac atg acc ggg gac tgc atg cca gtg ctg gtg ctg atg gcc gca 106
 Leu Asp Met Thr Gly Asp Cys Met Pro Val Leu Val Leu Met Ala Ala
 -20 -15 -10

gtg ctg acc gtg act gga gca gtt cct gtc gcc agg ctc cgc ggg gct 154
 Val Leu Thr Val Thr Gly Ala Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala
 -5 1 5

ctc ccg gat gca agg ggc tgc cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct 202
 Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser
 10 15 20 25

cca cag gag ctg cag gcc ttt aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag 250
 Pro Gln Glu Leu Gln Ala Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu
 30 35 40

```

tcg ctt ctg ctg aag gac tgc aag tgc cgc tcc cgc ctc ttc ccc agg 298
Ser Leu Leu Leu Lys Asp Cys Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg
          45                      50                      55

acc tgg gac ctg agg cag ctg cag gtg agg gag cgc ccc gtg gct ttg 346
Thr Trp Asp Leu Arg Gln Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu
          60                      65                      70

gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac 394
Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp
          75                      80                      85

act gac cca gcc ctg ggg gat gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg 442
Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu
          90                      95                      100                      105

cac cat atc ctc tcc cag ctc cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg 490
His His Ile Leu Ser Gln Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr
          110                      115                      120

gca ggg ccc agg acc cgg ggc cgc ctc cac cat tgg ctg cac cgg ctc 538
Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu
          125                      130                      135

cag gag gcc cca aaa aag gag tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc 586
Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val
          140                      145                      150

acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc 634
Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala
          155                      160                      165

agc ggg gac ctg tgt gtc tga cccttccgcc agtcagcaa cctgagattt 685
Ser Gly Asp Leu Cys Val *
          170                      175

tatttataaaa ttagccactt ggcttaattt attgccaccc agtcgctat 734

```

<210> 6
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(25)

<400> 6

```

Met Lys Leu Asp Met Thr Gly Asp Cys Met Pro Val Leu Val Leu Met
-25          -20          -15          -10
Ala Ala Val Leu Thr Val Thr Gly Ala Val Pro Val Ala Arg Leu Arg
          -5          1          5
Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser
          10          15          20
Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu
          25          30          35

```

Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp Cys Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe
 40 45 50 55
 Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val
 60 65 70
 Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr
 75 80 85
 Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His
 90 95 100
 Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln
 105 110 115
 Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His
 120 125 130 135
 Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala
 140 145 150
 Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys
 155 160 165
 Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val
 170 175

<210> 7
 <211> 633
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> péptido_señal
 <222> (22)...(105)

<221> péptido_maduro
 <222> (106)...(630)

<221> CDS
 <222> (22)...(630)

<400> 7

tcacagaccc cggagagcaa c atg aag cca gaa aca gct ggg ggc cac atg 51
 Met Lys Pro Glu Thr Ala Gly Gly His Met
 -25 -20
 ctc ctc ctg ctg ttg cct ctg ctg ctg gcc gca gtg ctg aca aga acc 99
 Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ala Ala Val Leu Thr Arg Thr
 -15 -10 -5
 caa gct gac cct gtc ccc agg gcc acc agg ctc cca gtg gaa gca aag 147
 Gln Ala Asp Pro Val Pro Arg Ala Thr Arg Leu Pro Val Glu Ala Lys
 1 5 10
 gat tgc cac att gct cag ttc aag tct ctg tcc cca aaa gag ctg cag 195
 Asp Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Lys Glu Leu Gln
 15 20 25 30
 gcc ttc aaa aag gcc aag gat gcc atc gag aag agg ctg ctt gag aag 243
 Ala Phe Lys Lys Ala Lys Asp Ala Ile Glu Lys Arg Leu Leu Glu Lys
 35 40 45
 gac ctg agg tgc agt tcc cac ctc ttc ccc agg gcc tgg gac ctg aag 291

```

Asp Leu Arg Cys Ser Ser His Leu Phe Pro Arg Ala Trp Asp Leu Lys
      50                      55                      60

cag ctg cag gtc caa gag cgc ccc aag gcc ttg cag gct gag gtg gcc 339
Gln Leu Gln Val Gln Glu Arg Pro Lys Ala Leu Gln Ala Glu Val Ala
      65                      70                      75

ctg acc ctg aag gtc tgg gag aac atg act gac tca gcc ctg gcc acc 387
Leu Thr Leu Lys Val Trp Glu Asn Met Thr Asp Ser Ala Leu Ala Thr
      80                      85                      90

atc ctg ggc cag cct ctt cat aca ctg agc cac att cac tcc cag ctg 435
Ile Leu Gly Gln Pro Leu His Thr Leu Ser His Ile His Ser Gln Leu
      95                      100                      105                      110

cag acc tgt aca cag ctt cag gcc aca gca gag ccc agg tcc ccg agc 483
Gln Thr Cys Thr Gln Leu Gln Ala Thr Ala Glu Pro Arg Ser Pro Ser
      115                      120                      125

cgc cgc ctc tcc cgc tgg ctg cac agg ctc cag gag gcc cag agc aag 531
Arg Arg Leu Ser Arg Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Gln Ser Lys
      130                      135                      140

gag acc cct ggc tgc ctg gag gcc tct gtc acc tcc aac ctg ttt cgc 579
Glu Thr Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Ser Asn Leu Phe Arg
      145                      150                      155

ctg ctc acc cgg gac ctc aag tgt gtg gcc aat gga gac cag tgt gtc 627
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Cys Val Ala Asn Gly Asp Gln Cys Val
      160                      165                      170

tga cct
*

```

<210> 8
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(28)

<400> 8

```

Met Lys Pro Glu Thr Ala Gly Gly His Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro
      -25                      -20                      -15

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

Arg Ala Thr Arg Leu Pro Val Glu Ala Lys Asp Cys His Ile Ala Gln
      5                      10                      15                      20

Phe Lys Ser Leu Ser Pro Lys Glu Leu Gln Ala Phe Lys Lys Ala Lys
      25                      30                      35

Asp Ala Ile Glu Lys Arg Leu Leu Glu Lys Asp Leu Arg Cys Ser Ser
      40                      45                      50

His Leu Phe Pro Arg Ala Trp Asp Leu Lys Gln Leu Gln Val Gln Glu

```

```

      55      60      65
Arg Pro Lys Ala Leu Gln Ala Glu Val Ala Leu Thr Leu Lys Val Trp
 70      75      80
Glu Asn Met Thr Asp Ser Ala Leu Ala Thr Ile Leu Gly Gln Pro Leu
85      90      95      100
His Thr Leu Ser His Ile His Ser Gln Leu Gln Thr Cys Thr Gln Leu
      105      110      115
Gln Ala Thr Ala Glu Pro Arg Ser Pro Ser Arg Arg Leu Ser Arg Trp
      120      125      130
Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Gln Ser Lys Glu Thr Pro Gly Cys Leu
      135      140      145
Glu Ala Ser Val Thr Ser Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu
      150      155      160
Lys Cys Val Ala Asn Gly Asp Gln Cys Val
165      170

```

<210> 9
 <211> 632
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> péptido_señal
 <222> (22)...(105)

<221> péptido_maduro
 <222> (106)...(630)

<221> CDS
 <222> (22)...(630)

<400> 9

```

tcacagacccc cggagagcaa c atg aag cca gaa aca gct ggg ggc cac atg 51
                        Met Lys Pro Glu Thr Ala Gly Gly His Met
                        -25                        -20

ctc ctc ctg ctg ttg cct ctg ctg ctg gcc gca gtg ctg aca aga acc 99
Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ala Ala Val Leu Thr Arg Thr
      -15                        -10                        -5

caa gct gac cct gtc ccc agg gcc acc agg ctc cca gtg gaa gca aag 147
Gln Ala Asp Pro Val Pro Arg Ala Thr Arg Leu Pro Val Glu Ala Lys
      1                        5                        10

gat tgc cac att gct cag ttc aag tct ctg tcc cca aaa gag ctg cag 195
Asp Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Lys Glu Leu Gln
      15                        20                        25                        30

gcc ttc aaa aag gcc aag ggt gcc atc gag aag agg ctg ctt gag aag 243
Ala Phe Lys Lys Ala Lys Gly Ala Ile Glu Lys Arg Leu Leu Glu Lys
      35                        40                        45

gac atg agg tgc agt tcc cac ctc atc tcc agg gcc tgg gac ctg aag 291
Asp Met Arg Cys Ser Ser His Leu Ile Ser Arg Ala Trp Asp Leu Lys
      50                        55                        60

```

```

cag ctg cag gtc caa gag cgc ccc aag gcc ttg cag gct gag gtg gcc 339
Gln Leu Gln Val Gln Glu Arg Pro Lys Ala Leu Gln Ala Glu Val Ala
      65                      70                      75

ctg acc ctg aag gtc tgg gag aac ata aat gac tca gcc ctg acc acc 387
Leu Thr Leu Lys Val Trp Glu Asn Ile Asn Asp Ser Ala Leu Thr Thr
      80                      85                      90

atc ctg ggc cag cct ctt cat aca ctg agc cac att cac tcc cag ctg 435
Ile Leu Gly Gln Pro Leu His Thr Leu Ser His Ile His Ser Gln Leu
      95                      100                      105                      110

cag acc tgt aca cag ctt cag gcc aca gca gag ccc aag ccc ccg agt 483
Gln Thr Cys Thr Gln Leu Gln Ala Thr Ala Glu Pro Lys Pro Pro Ser
      115                      120                      125

cgc cgc ctc tcc cgc tgg ctg cac agg ctc cag gag gcc cag agc aag 531
Arg Arg Leu Ser Arg Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Gln Ser Lys
      130                      135                      140

gag act cct ggc tgc ctg gag gac tct gtc acc tcc aac ctg ttt caa 579
Glu Thr Pro Gly Cys Leu Glu Asp Ser Val Thr Ser Asn Leu Phe Gln
      145                      150                      155

ctg ctc ctc cgg gac ctc aag tgt gtg gcc agt gga gac cag tgt gtc 627
Leu Leu Leu Arg Asp Leu Lys Cys Val Ala Ser Gly Asp Gln Cys Val
      160                      165                      170

tga cc 632
*
```

<210> 10
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(28)

<400> 10

```

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

Glu Asn Ile Asn Asp Ser Ala Leu Thr Thr Ile Leu Gly Gln Pro Leu
 85 90 95 100
 His Thr Leu Ser His Ile His Ser Gln Leu Gln Thr Cys Thr Gln Leu
 105 110 115
 Gln Ala Thr Ala Glu Pro Lys Pro Pro Ser Arg Arg Leu Ser Arg Trp
 120 125 130
 Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Gln Ser Lys Glu Thr Pro Gly Cys Leu
 135 140 145
 Glu Asp Ser Val Thr Ser Asn Leu Phe Gln Leu Leu Leu Arg Asp Leu
 150 155 160
 Lys Cys Val Ala Ser Gly Asp Gln Cys Val
 165 170

<210> 11
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

290	295	300
Thr Pro Arg Val Arg	Ala Pro Ala Thr Gln Gln	Thr Arg Trp Lys Lys
305	310	315
Asp Leu Ala Glu Asp	Glu Glu Glu Glu Asp	Glu Glu Asp Thr Glu Asp
	325	330
Gly Val Ser Phe Gln	Pro Tyr Ile Glu Pro	Pro Ser Phe Leu Gly Gln
	340	345
Glu His Gln Ala Pro	Gly His Ser Glu Ala	Gly Gly Val Asp Ser Gly
	355	360
Arg Pro Arg Ala Pro	Leu Val Pro Ser Glu	Gly Ser Ser Ala Trp Asp
	370	375
Ser Ser Asp Arg Ser	Trp Ala Ser Thr Val	Asp Ser Ser Trp Asp Arg
385	390	395
Ala Gly Ser Ser Gly	Tyr Leu Ala Glu Lys	Gly Pro Gly Gln Gly Pro
	405	410
Gly Gly Asp Gly His	Gln Glu Ser Leu Pro	Pro Pro Glu Phe Ser Lys
	420	425
Asp Ser Gly Phe Leu	Glu Glu Leu Pro Glu	Asp Asn Leu Ser Ser Trp
	435	440
Ala Thr Trp Gly Thr	Leu Pro Glu Pro Asn	Leu Val Pro Gly Gly
	450	455
Pro Pro Val Ser Leu	Gln Thr Leu Thr Phe	Cys Trp Glu Ser Ser Pro
465	470	475
Glu Glu Glu Glu Glu	Ala Arg Glu Ser Glu	Ile Glu Asp Ser Asp Ala
	485	490
Gly Ser Trp Gly Ala	Glu Ser Thr Gln Arg	Thr Glu Asp Arg Gly Arg
	500	505
Thr Leu Gly His Tyr	Met Ala Arg	
515	520	

<210> 12
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> proteína madura de la SEC ID N°: 1, con adición de Met en 3'

<221> CDS
 <222> (1)...(531)

<400> 12

atg gtt cct gtc gcc agg ctc cac ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc	48
Met Val Pro Val Ala Arg Leu His Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly	
1 5 10 15	
tgc cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc	96
Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala	
20 25 30	
ttt aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tcg ctt ctg ctg aag gac	144
Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp	
35 40 45	
tgc agg tgc cac tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag	192
Cys Arg Cys His Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln	

ES 2 405 209 T3

50	55	60	
ctg cag gtg agg gag cgc ccc atg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg			240
Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Met Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu			
65	70	75	80
acg ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac act gac cca gcc ctg gtg			288
Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Val			
	85	90	95
gac gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag			336
Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln			
	100	105	110
ttc cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg			384
Phe Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg			
	115	120	125
ggc cgc ctc cac cat tgg ctg tac cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag			432
Gly Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys			
	130	135	140
gag tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc			480
Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg			
	145	150	155
ctc ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agt ggg gac ctg tgt gtc			528
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val			
	165	170	175
tga			531
*			

<210> 13
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> proteína madura de la SEC ID N°: 1, con adición de Met en 3'

<400> 13

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

```

          100          105          110
Phe Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg
          115          120          125
Gly Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys
          130          135          140
Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg
          145          150          155          160
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val
          165          170          175

```

<210> 14
 <211> 621
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> proteína madura de la SEC ID N°: 3, con adición de Met en 3'

<221> CDS
 <222> (1)...(549)

<400> 14

```

atg ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc 48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys
  1          5          10          15

cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc 96
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe
          20          25          30

aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg 144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp
          35          40          45

agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc 192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu
          50          55          60

cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg 240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr
          65          70          75          80

ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta 288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu
          85          90          95

gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc 336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala
          100          105          110

tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc 384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu
          115          120          125

cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct 432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala

```

```

130              135              140
ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg 480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
145              150              155              160
cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aac ctg tgt ctg aga acg tca 528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser
165              170              175
acc cac cct gag tcc acc tga caccacac cttatttatg cgtgagccc 579
Thr His Pro Glu Ser Thr *
180
tactccttcc ttaatttatt tcctctcacc ctttatttat ga 621

```

<210> 15
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> proteína madura de la SEC ID N°: 3, con adición de Met en 3'

<400> 15

```

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

```

<210> 16
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> proteína madura de la SEC ID N°: 5, con adición de Met en 3'

<221> CDS
 <222> (1)...(531)

<400> 16

atg gtt cct gtc gcc agg ctc cgc ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc	48
Met Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly	
1 5 10 15	
tgc cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc	96
Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala	
20 25 30	
ttt aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tcg ctt ctg ctg aag gac	144
Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp	
35 40 45	
tgc aag tgc cgc tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag	192
Cys Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln	
50 55 60	
ctg cag gtg agg gag cgc ccc gtg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg	240
Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu	
65 70 75 80	
acg ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac act gac cca gcc ctg ggg	288
Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly	
85 90 95	
gat gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag	336
Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln	
100 105 110	
ctc cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg	384
Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg	
115 120 125	
ggc cgc ctc cac cat tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag	432
Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys	
130 135 140	
gag tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc	480
Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg	
145 150 155 160	
ctc ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agc ggg gac ctg tgt gtc	528
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val	
165 170 175	
tga	531
*	

<210> 17

<211> 176

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína madura de la SEC ID N°: 5, con adición de Met en 3'

<400> 17

```

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

```

<210> 18
 <211> 528
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-28A mutante C48S

<221> CDS
 <222> (1)...(528)

<400> 18

```

gtt cct gtc gcc agg ctc cac ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc tgc 48
Val Pro Val Ala Arg Leu His Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys
1      5      10      15

cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc ttt 96
His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala Phe
20      25      30

aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tcg ctt ctg ctg aag gac tcc 144
Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ser
35      40      45

agg tgc cac tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag ctg 192
Arg Cys His Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln Leu

```

50	55	60	
cag gtg agg gag cgc ccc atg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg			240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Met Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr			
65	70	75	80
ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac act gac cca gcc ctg gtg gac			288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Val Asp			
	85	90	95
gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag ttc			336
Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Phe			
	100	105	110
cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg ggc			384
Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly			
	115	120	125
cgc ctc cac cat tgg ctg tac cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag gag			432
Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu			
	130	135	140
tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc			480
Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu			
	145	150	155
ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agt ggg gac ctg tgt gtc tga			528
Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val *			
	165	170	175

<210> 19

<211> 175

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-28A mutante C48S

<400> 19

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

Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu
 130 135 140
 Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu
 145 150 155 160
 Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val
 165 170 175

<210> 20
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> met IL-28A mutante C49S

<221> CDS
 <222> (1)...(531)

<400> 20

atg gtt cct gtc gcc agg ctc cac ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc 48
 Met Val Pro Val Ala Arg Leu His Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly
 1 5 10 15

tgc cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc 96
 Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala
 20 25 30

ttt aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tcg ctt ctg ctg aag gac 144
 Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp
 35 40 45

tcc agg tgc cac tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag 192
 Ser Arg Cys His Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln
 50 55 60

ctg cag gtg agg gag cgc ccc atg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg 240
 Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Met Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu
 65 70 75 80

acg ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac act gac cca gcc ctg gtg 288
 Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Val
 85 90 95

gac gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag 336
 Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln
 100 105 110

ttc cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg 384
 Phe Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg
 115 120 125

ggc cgc ctc cac cat tgg ctg tac cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag 432
 Gly Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys
 130 135 140

gag tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc 480

Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg
145 150 155 160

ctc ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agt ggg gac ctg tgt gtc 528
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val
165 170 175

tga 531
*

<210> 21
<211> 176
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> met IL-28A mutante C49S

<400> 21

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

<210> 22
<211> 528
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IL-28A mutante C50S

<221> CDS
<222> (1)...(528)

<400> 22

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

<210> 23
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-28A mutante C50S

<400> 23

Val Pro Val Ala Arg Leu His Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys
1 5 10 15

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

<210> 24
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> met IL-28A mutante C51S

<221> CDS
 <222> (1)...(531)

<400> 24

atg gtt cct gtc gcc agg ctc cac ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc 48
 Met Val Pro Val Ala Arg Leu His Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly
 1 5 10 15
 tgc cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc 96
 Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala
 20 25 30
 ttt aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tcg ctt ctg ctg aag gac 144
 Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp
 35 40 45
 tgc agg tcc cac tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag 192
 Cys Arg Ser His Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln
 50 55 60
 ctg cag gtg agg gag cgc ccc atg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg 240
 Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Met Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu
 65 70 75 80
 acg ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac act gac cca gcc ctg gtg 288
 Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Val
 85 90 95

```

gac gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag 336
Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln
      100              105              110

ttc cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg 384
Phe Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg
      115              120              125

ggc cgc ctc cac cat tgg ctg tac cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag 432
Gly Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys
      130              135              140

gag tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc 480
Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg
      145              150              155              160

ctc ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agt ggg gac ctg tgt gtc 528
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val
      165              170              175

tga
*

```

<210> 25
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> met IL-28A mutante C51S

<400> 25

```

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

```

<210> 26
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> IL-29 mutante C171S

5

<221> CDS
<222> (1)...(546)

<400> 26

```

ggt ccg gtt ccg acc tct aaa cca acc acc act ggt aaa ggt tgc cac 48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His
1 5 10 15

atc ggt cgt ttc aaa tct ctg tct ccg cag gaa ctg gct tct ttc aaa 96
Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys
20 25 30

aaa gct cgt gac gct ctg gaa gaa tct ctg aaa ctg aaa aac tgg tct 144
Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser
35 40 45

tgc tct tct ccg gtt ttc ccg ggt aac tgg gat ctg cgt ctg ctg cag 192
Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln
50 55 60

gtt cgt gaa cgt ccg gtt gct ctg gaa gct gaa ctg gct ctg acc ctg 240
Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu
65 70 75 80

aaa gtt ctg gaa gct gct gca ggt cct gct ctg gaa gat gtt ctg gat 288
Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp
85 90 95

cag ccg ctg cac act ctg cac cac atc ctg tct cag ctg cag gct tgc 336
Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys
100 105 110

att caa ccg caa ccg acc gct ggt ccg cgt ccg cgt ggt cgt ctg cac 384
Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His
115 120 125

cac tgg ctg cat cgt ctg cag gaa gct ccg aaa aaa gaa tct gct ggt 432
His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly
130 135 140

tgc ctg gaa gct tct gtt acc ttc aac ctg ttc cgt ctg ctg acc cgt 480
Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg
145 150 155 160

gat ctg aaa tac gtt gct gat ggt aac ctg tct ctg cgt acc tct acc 528
Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Ser Leu Arg Thr Ser Thr
165 170 175

cat ccg gaa tct acc taa 546
His Pro Glu Ser Thr *
180

```

10

<210> 27
<211> 181
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> IL-29 mutante C171S

<400> 27

5

```

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

```

<210> 28
<211> 549
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> met IL-29 mutante C172S

15

<221> CDS
<222> (1)...(549)

<400> 28

20

```

atg ggt ccg gtt ccg acc tct aaa cca acc acc act ggt aaa ggt tgc 48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys
  1          5          10          15

```

```

cac atc ggt cgt ttc aaa tct ctg tct ccg cag gaa ctg gct tct ttc 96
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe
                20                25                30

aaa aaa gct cgt gac gct ctg gaa gaa tct ctg aaa ctg aaa aac tgg 144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp
                35                40                45

tct tgc tct tct ccg gtt ttc ccg ggt aac tgg gat ctg cgt ctg ctg 192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu
                50                55                60

cag gtt cgt gaa cgt ccg gtt gct ctg gaa gct gaa ctg gct ctg acc 240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr
                65                70                75                80

ctg aaa gtt ctg gaa gct gct gca ggt cct gct ctg gaa gat gtt ctg 288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu
                85                90                95

gat cag ccg ctg cac act ctg cac cac atc ctg tct cag ctg cag gct 336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala
                100                105                110

tgc att caa ccg caa ccg acc gct ggt ccg cgt ccg cgt ggt cgt ctg 384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu
                115                120                125

cac cac tgg ctg cat cgt ctg cag gaa gct ccg aaa aaa gaa tct gct 432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala
                130                135                140

ggg tgc ctg gaa gct tct gtt acc ttc aac ctg ttc cgt ctg ctg acc 480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
                145                150                155                160

cgt gat ctg aaa tac gtt gct gat ggt aac ctg tct ctg cgt acc tct 528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Ser Leu Arg Thr Ser
                165                170                175

acc cat ccg gaa tct acc taa 549
Thr His Pro Glu Ser Thr *
                180

```

<210> 29
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> met IL-29 mutante C172S

<400> 29

```

Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys
1          5          10          15
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe

```

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

<210> 30
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia degenerada de la SEC ID N°: 18

<221> misc_feature
 <222> (1)...(525)
 <223> n = A, T, C o G

<400> 30

```

gtncngtng cnmgnytnca yggngenytn ccngaygcnm gnggntgyca yathgcncar 60
ttyaarwsny tnwsnccnca rgarytnca gcnttyaarm gngcnaarga ygcnytngr 120
garwsnytny tnytnaarga ywsnmngntgy caywsnmngny tnttyccnmg nacntgggay 180
ytnmgncary tncargtnmg ngarmgnccn atggcnytn gngcngaryt ngcnytnacn 240
ytnaargtny tngargcnac ngcngayacn gayccngcny tngtngaygt nytngaycar 300
ccnytncaaya cnytncaaya yathytnwsn carttymgng cntgyathca rccncarccn 360
acngcnggnc cnmgnacnmg nggnmgnytn caycaytggy tntaymgnytn ncargargcn 420
ccnaaraarg arwsnccngg ntgyytngr gcnwsngtna cnttyaayyt nttymgnytn 480
ytnacnmgng ayytnaaytg ygtngcnwsn gnggayytnt gygtn 525
  
```

<210> 31
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia degenerada de la SEC ID N°: 20

<221> misc_feature
 <222> (1)...(525)
 <223> n = A, T, C o G

<400> 31

```
gtncncgtng cnmgnytnca yggngcnytn ccngaygcnm gnggntgyca yathgncar 60
ttyaarwsny tnwsnccnca rgarytnear gcnttyaarm gngcnaarga ygcnytngr 120
garwsnytny tnytnaarga ywsnmgtgy caywsnmgny tnttyccnmg nacntggggy 180
ytnmgncary tncargtnmg ngarmgnccn atggcnytnng argcngaryt ngcnytnacn 240
ytnaargtny tngargcnac ngcngayaen gayccngcny tngtngaygt nytngaycar 300
ccnytncaya cnytncaica yathytwnsn carttymgng cntgyathca rccncarccn 360
acngcnggnc cnmgnacnmg nggnmgnytn caycaytggy tntaymgnyt ncargargcn 420
ccnaaraarg arwsnccngg ntgyytngar gcnwsngtna cnttyaayyt nttymgnytn 480
ytnacnmgng ayytnaaytg ygtngcnwsn gnggayytnt gygtn 525
```

<210> 32
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia degenerada de la SEC ID N°: 22

<221> misc_feature
 <222> (1)...(525)
 <223> n = A, T, C o G

<400> 32

```
gtncncgtng cnmgnytnca yggngcnytn ccngaygcnm gnggntgyca yathgncar 60
ttyaarwsny tnwsnccnca rgarytnear gcnttyaarm gngcnaarga ygcnytngr 120
garwsnytny tnytnaarga ywsnmgtgy caywsnmgny tnttyccnmg nacntggggy 180
ytnmgncary tncargtnmg ngarmgnccn atggcnytnng argcngaryt ngcnytnacn 240
ytnaargtny tngargcnac ngcngayaen gayccngcny tngtngaygt nytngaycar 300
ccnytncaya cnytncaica yathytwnsn carttymgng cntgyathca rccncarccn 360
acngcnggnc cnmgnacnmg nggnmgnytn caycaytggy tntaymgnyt ncargargcn 420
ccnaaraarg arwsnccngg ntgyytngar gcnwsngtna cnttyaayyt nttymgnytn 480
ytnacnmgng ayytnaaytg ygtngcnwsn gnggayytnt gygtn 525
```

<210> 33
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia degenerada de la SEC ID N°: 24

<221> misc_feature
 <222> (1)...(525)
 <223> n = A, T, C o G

<400> 33

```
gtncncgtng cnmgnytnca yggngcnytn ccngaygcnm gnggntgyca yathgncar 60
ttyaarwsny tnwsnccnca rgarytnear gcnttyaarm gngcnaarga ygcnytngr 120
garwsnytny tnytnaarga ywsnmgtgy caywsnmgny tnttyccnmg nacntggggy 180
ytnmgncary tncargtnmg ngarmgnccn atggcnytnng argcngaryt ngcnytnacn 240
ytnaargtny tngargcnac ngcngayaen gayccngcny tngtngaygt nytngaycar 300
ccnytncaya cnytncaica yathytwnsn carttymgng cntgyathca rccncarccn 360
acngcnggnc cnmgnacnmg nggnmgnytn caycaytggy tntaymgnyt ncargargcn 420
ccnaaraarg arwsnccngg ntgyytngar gcnwsngtna cnttyaayyt nttymgnytn 480
ytnacnmgng ayytnaaytg ygtngcnwsn gnggayytnt gygtn 525
```

<210> 34
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia degenerada de la SEC ID N°: 26

5 <221> misc_feature
<222> (1)...(525)
<223> n = A, T, C o G

<400> 34

gtncengtn g cnmgnytnca yggngcnytn ccngaygcnm gnggntgyca yathgcncar 60
tityaarwsny tnwsnccnca rgarytn car gcnttyaarm gngcnaarga ygcnytn gar 120
garwsnytny tnytnaarga ywsnmgntgy caywsnmgny tnttyccnm g nacntggg ay 180
ytnmgncary tncargtnmg ngarmgncn atggcnytn g argcngaryt ngcnytnacn 240
ytnaargtny tngargcnac ngcngayacn gayccngcny tngtn gaygt nytngaycar 300
ccnytnca ya cnytnca yca yathytnwsn carttymgng cntgyathca rccncarccn 360
acngcnggnc cnmgncnmg nggnmgnytn caycaytggy tntaymgnyt ncargargcn 420
ccnaaraarg arwsnccngg ntgyytn gar gcnwsngtna cnttyaayyt nttymgnytn 480
ytnacnmgng ayytnaaytg ygtngcnwsn gnggayytnt gygtn 525

10 <210> 35
<211> 525
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia degenerada de la SEC ID N°: 28

20 <221> misc_feature
<222> (1)...(525)
<223> n = A, T, C o G

<400> 35

25 gtncengtn g cnmgnytnca yggngcnytn ccngaygcnm gnggntgyca yathgcncar 60
tityaarwsny tnwsnccnca rgarytn car gcnttyaarm gngcnaarga ygcnytn gar 120
garwsnytny tnytnaarga ywsnmgntgy caywsnmgny tnttyccnm g nacntggg ay 180
ytnmgncary tncargtnmg ngarmgncn atggcnytn g argcngaryt ngcnytnacn 240
ytnaargtny tngargcnac ngcngayacn gayccngcny tngtn gaygt nytngaycar 300
ccnytnca ya cnytnca yca yathytnwsn carttymgng cntgyathca rccncarccn 360
acngcnggnc cnmgncnmg nggnmgnytn caycaytggy tntaymgnyt ncargargcn 420
ccnaaraarg arwsnccngg ntgyytn gar gcnwsngtna cnttyaayyt nttymgnytn 480
ytnacnmgng ayytnaaytg ygtngcnwsn gnggayytnt gygtn 525

30 <210> 36
<211> 175
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IL-28A mutante C48X

35 <221> VARIANTE
<222> (48)...(48)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

40 <400> 36

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

<210> 37
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> met IL-28A mutante C49X

<221> VARIANTE
 <222> (49)...(49)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 37

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

<210> 38
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> IL-28A mutante C50X

10

<221> VARIANTE
 <222> (50)...(50)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 38

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

15

<210> 39
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> met IL-28A mutante C51X

25

<221> VARIANTE
 <222> (51)...(51)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

30

<400> 39

```

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

```

<210> 40
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 mutante C171X

<221> VARIANTE
 <222> (171)...(171)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 40

```

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

```

<210> 41
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> met IL-29 mutante C172X

<221> VARIANTE
 <222> (172)...(172)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 41

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

<210> 42
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico ZC40923

<400> 42
 tccaggaat tcataataggc cggccacat gaaactagac atgactggg 49

<210> 43
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico ZC43152

<400> 43

gggggtgggta caaccccaga gctgttttaa ggcgcgcctc tagactatit ttagacacac 60
 aggtccccac tggc 74

ES 2 405 209 T3

```

5      <210> 44
      <211> 50
      <212> ADN
      <213> Secuencia artificial

      <220>
      <223> cebador oligonucleotídico ZC29740

10     <400> 44
      ttgacaatta atcatcggt cgtataatgt gtggaattgt gagcggataa 50

      <210> 45
      <211> 42
      <212> ADN
15     <213> Secuencia artificial

      <220>
      <223> cebador oligonucleotídico ZC29741

20     <400> 45
      tctgatttaa tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cg 42

      <210> 46
      <211> 62
25     <212> ADN
      <213> Secuencia artificial

      <220>
      <223> cebador oligonucleotídico ZC29736
30     <400> 46

      gtggaattgt gagcggataa caatttcaca cagaattcat taaagaggag aaattaactc 60
      cc 62

35     <210> 47
      <211> 63
      <212> ADN
      <213> Secuencia artificial

40     <220>
      <223> cebador oligonucleotídico ZC29738

      <400> 47

      gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca cccgggagtt aatttctcct ctttaatgaa 60
      ttc 63
45

      <210> 48
      <211> 78
      <212> ADN
50     <213> Secuencia artificial

      <220>
      <223> cebador oligonucleotídico ZC44566

55     <400> 48

      tcttccagag cgtcacgagc ttttttgaaa gaagccagtt cctgaggaga cagagatttg 60
      aaacgaccga tgtggcaa 78

60     <210> 49
      <211> 84

```

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador oligonucleotídico ZC44565

 <400> 49

 tcgtgacgct ctggaagaat ctctgaaact gaaaaactgg tcttgctctt ctccggtttt 60
 cccgggtaac tgggatctgc gtct 84

 10
 <210> 50
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico ZC44564

 <400> 50

 20
 aacagaagct tccaggcaac cagcagattc ttttttcgga gcttcctgca gacgatgcag 60
 ccagtgggtgc a 71

 <210> 51
 <211> 73
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico ZC44563

 30
 <400> 51

 aactggctct gaccctgaaa gttctggaag ctgctgcagg tctgctctg gaagatgttc 60
 tggatcagcc gct 73

 35
 <210> 52
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico ZC44562

 <400> 52

 45
 tcagggtcag agccagttca gcttcagag caaccggacg ttcacgaacc tgcagcagac 60
 gcagatccca gtta 74

 <210> 53
 <211> 76
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico ZC44561

 55
 <400> 53

tcagctgcag gcttgcattc aaccgcaacc gaccgctggt ccgcgtccgc gtggtcgtct 60
gcaccactgg ctgcat 76

<210> 54
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico ZC44560

<400> 54
atgaagcct gcagctgaga caggatgtgg tgcagagtgt gcagcggctg atccagaaca 60

<210> 55
<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico ZC44559

<400> 55

atgggtccgg ttccgacctc taaaccaacc accactggta aagggttgcca catcggctcgt 60
tt 62

<210> 56
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico ZC44558

<400> 56

ttaggtagat tccggatggg tagaggtaag caggcacagg ttaccatcag caacgtattt 60
cagat 65

<210> 57
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico ZC44557

<400> 57

tgcctggaag cttctgttac cttcaacctg ttccgtctgc tgaccctga tctgaaatac 60
gttgctgat 69

<210> 58
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico ZC44340

<400> 58

cgttgctgat ggtaacctgt ctctgcgtac ctctacccat c 41

<210> 59
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico ZC44341

<400> 59
gatgggtaga ggtacgcaga gacaggttac catcagcaac g 41

<210> 60
<211> 68
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico ZC41212

<400> 60

ctagaaataa ttttgtttta ctttaagaag gagatatata tatggggcct gtcccccactt 60
ccaagccc 68

<210> 61
<211> 67
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico ZC41041

<400> 61

tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcacc cgccaaaaca ttaggtggac tcaggggtggg 60
ttgacgt 67

<210> 62
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico ZC43431

<400> 62

ctagaaataa ttttgtttta ctttaagaag gagatatata tatgggttcct gtcgccaggc 60
tccac 65

<210> 63
<211> 67
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico ZC43437

<400> 63

```

    taatctgtat caggctgaaa atcttatctc atccgcaaaa acatcagaca cacagggtccc 60
    cactggc                                         67

5    <210> 64
    <211> 39
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> cebador oligonucleotídico ZC44327

10   <400> 64
    gtggccgatg ggaacctgtc cctgagaacg tcaaccac 39

    <210> 65
    <211> 39
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

15   <220>
    <223> cebador oligonucleotídico ZC44328

    <400> 65
    gtgggtgac gttctcagg acagggtccc atcgccac 39

20   <210> 66
    <211> 83
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

25   <220>
    <223> cebador oligonucleotídico ZC45399

    <400> 66

    tcagggtccca ggtcctgggg aagaggcggg agtggcacct ggagtccttc agcagaagcg 60
    actcttctaa ggcattcttg gcc                                         83

35   <210> 67
    <211> 531
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> zcyto20 madura comienza a partir de pYEL7b

45   <221> CDS
    <222> (1)...(531)

    <400> 67

```

atg gtt cct gtc gcc agg ctc cac ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc	48
Met Val Pro Val Ala Arg Leu His Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly	
1 5 10 15	
tgc cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc	96
Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala	
20 25 30	
ttt aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tcg ctt ctg ctg aag gac	144
Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp	
35 40 45	
tgc agg tgc cac tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag	192
Cys Arg Cys His Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln	
50 55 60	
ctg cag gtg agg gag cgc ccc atg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg	240
Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Met Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu	
65 70 75 80	
acg ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac act gac cca gcc ctg gtg	288
Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Val	
85 90 95	
gac gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag	336
Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln	
100 105 110	
ttc cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg	384
Phe Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg	
115 120 125	
ggc cgc ctc cac cat tgg ctg tac cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag	432
Gly Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys	
130 135 140	
gag tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc	480
Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg	
145 150 155 160	
ctc ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agt ggg gac ctg tgt gtc	528
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val	
165 170 175	
tga	531
*	

<210> 68

<211> 83

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico ZC45398

<400> 68

ggccaaagat gccttagaag agtcgcttct gctgaaggac tccaggtgcc actcccgctt	60
cttccccagg acctgggacc tga	83

<210> 69

ES 2 405 209 T3

<211> 83
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico ZC45397

<400> 69

gctgcctcag gtcccaggtc ctggggaaga ggcgggagtg ggacctgcag tccttcagca 60
 gaagcgactc ttctaaggca tct 83

10

<210> 70
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico ZC45396

20

<400> 70

agatgcctta gaagagtcgc ttctgctgaa ggactgcagg tccactccc gcctcttccc 60
 caggacctgg gacctgaggc agc 83

25

<210> 71
 <211> 1013
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <221> CDS
 <222> (14)...(991)

<400> 71

ccagcgtccg tcc atg gcg tgg agc ctt ggg agc tgg ctg ggt ggc tgc 49
 Met Ala Trp Ser Leu Gly Ser Trp Leu Gly Gly Cys
 1 5 10

ctg ctg gtg tca gca ttg gga atg gta cca cct ccc gaa aat gtc aga 97
 Leu Leu Val Ser Ala Leu Gly Met Val Pro Pro Pro Glu Asn Val Arg
 15 20 25

atg aat tct gtt aat ttc aag aac att cta cag tgg gag tca cct gct 145
 Met Asn Ser Val Asn Phe Lys Asn Ile Leu Gln Trp Glu Ser Pro Ala
 30 35 40

35

ttt gcc aaa ggg aac ctg act ttc aca gct cag tac cta agt tat agg	193
Phe Ala Lys Gly Asn Leu Thr Phe Thr Ala Gln Tyr Leu Ser Tyr Arg	
45 50 55 60	
ata ttc caa gat aaa tgc atg aat act acc ttg acg gaa tgt gat ttc	241
Ile Phe Gln Asp Lys Cys Met Asn Thr Thr Leu Thr Glu Cys Asp Phe	
65 70 75	
tca agt ctt tcc aag tat ggt gac cac acc ttg aga gtc agg gct gaa	289
Ser Ser Leu Ser Lys Tyr Gly Asp His Thr Leu Arg Val Arg Ala Glu	
80 85 90	
ttt gca gat gag cat tca gac tgg gta aac atc acc ttc tgt cct gtg	337
Phe Ala Asp Glu His Ser Asp Trp Val Asn Ile Thr Phe Cys Pro Val	
95 100 105	
gat gac acc att att gga ccc cct gga atg caa gta gaa gta ctt gct	385
Asp Asp Thr Ile Ile Gly Pro Pro Gly Met Gln Val Glu Val Leu Ala	
110 115 120	
gat tct tta cat atg cgt ttc tta gcc cct aaa att gag aat gaa tac	433
Asp Ser Leu His Met Arg Phe Leu Ala Pro Lys Ile Glu Asn Glu Tyr	
125 130 135 140	
gaa act tgg act atg aag aat gtg tat aac tca tgg act tat aat gtg	481
Glu Thr Trp Thr Met Lys Asn Val Tyr Asn Ser Trp Thr Tyr Asn Val	
145 150 155	
caa tac tgg aaa aac ggt act gat gaa aag ttt caa att act ccc cag	529
Gln Tyr Trp Lys Asn Gly Thr Asp Glu Lys Phe Gln Ile Thr Pro Gln	
160 165 170	
tat gac ttt gag gtc ctc aga aac ctg gag cca tgg aca act tat tgt	577
Tyr Asp Phe Glu Val Leu Arg Asn Leu Glu Pro Trp Thr Thr Tyr Cys	
175 180 185	
gtt caa gtt cga ggg ttt ctt cct gat cgg aac aaa gct ggg gaa tgg	625
Val Gln Val Arg Gly Phe Leu Pro Asp Arg Asn Lys Ala Gly Glu Trp	
190 195 200	
agt gag cct gtc tgt gag caa aca acc cat gac gaa acg gtc ccc tcc	673
Ser Glu Pro Val Cys Glu Gln Thr Thr His Asp Glu Thr Val Pro Ser	
205 210 215 220	
tgg atg gtg gcc gtc atc ctc atg gcc tgc gtc ttc atg gtc tgc ctg	721
Trp Met Val Ala Val Ile Leu Met Ala Ser Val Phe Met Val Cys Leu	
225 230 235	
gca ctc ctc ggc tgc ttc tcc ttg ctg tgg tgc gtt tac aag aag aca	769
Ala Leu Leu Gly Cys Phe Ser Leu Leu Trp Cys Val Tyr Lys Lys Thr	
240 245 250	
aag tac gcc ttc tcc cct agg aat tct ctt cca cag cac ctg aaa gag	817
Lys Tyr Ala Phe Ser Pro Arg Asn Ser Leu Pro Gln His Leu Lys Glu	
255 260 265	

ttt ttg ggc cat cct cat cat aac aca ctt ctg ttt ttc tcc ttt cca	865
Phe Leu Gly His Pro His His Asn Thr Leu Leu Phe Phe Ser Phe Pro	
270 275 280	
ttg tcg gat gag aat gat gtt ttt gac aag cta agt gtc att gca gaa	913
Leu Ser Asp Glu Asn Asp Val Phe Asp Lys Leu Ser Val Ile Ala Glu	
285 290 295 300	
gac tct gag agc ggc aag cag aat cct ggt gac agc tgc agc ctc ggg	961
Asp Ser Glu Ser Gly Lys Gln Asn Pro Gly Asp Ser Cys Ser Leu Gly	
305 310 315	
acc ccg cct ggg cag ggg ccc caa agc tag gctctgagaa ggaaacacac	1011
Thr Pro Pro Gly Gln Gly Pro Gln Ser *	
320 325	
tc	1013

<210> 72
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico ZC40922

<400> 72
 tccagggaaat tcataataggc cggccacat ggctgcagct tggaccgtg 49

<210> 73
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico ZC43153

<400> 73

gggggtgggta caaccccaga gctgttttaa ggcgcgcctc tagactatct ttaggtggac	60
tcaggggtggg t	71

<210> 74
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL29 mutante C15X, Asn169

<221> CDS
 <222> (1)...(546)

<221> variación
 <222> (44)...(45)
 <223> n = A, G, T o C

<400> 74

ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc dnn cac	48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Xaa His	
1 5 10 15	
att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag	96
Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys	
20 25 30	
aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt	144
Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser	
35 40 45	
tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag	192
Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln	
50 55 60	
gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg	240
Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu	
65 70 75 80	
aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac	288
Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp	
85 90 95	
cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt	336
Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys	
100 105 110	
atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac	384
Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His	
115 120 125	
cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc	432
His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly	
130 135 140	
tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga	480
Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg	
145 150 155 160	
gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aay ctg tgt ctg aga acg tca acc	528
Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr	
165 170 175	
cac cct gag tcc acc tga	546
His Pro Glu Ser Thr *	
180	

<210> 75

<211> 181

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> VARIANTE

<222> (15)...(15)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<223> IL29 mutante C15X, Asn169

<400> 75

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

<210> 76

<211> 549

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Met IL29 mutante C16X, Asn170

<221> CDS

<222> (1)...(549)

<221> variación

15 <222> (47)...(48)

<223> n = A, T, G o C

<400> 76

atg	ggc	cct	gtc	ccc	act	tcc	aag	ccc	acc	aca	act	ggg	aag	ggc	dnn	48
Met	Gly	Pro	Val	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Gly	Xaa	
1				5					10					15		

cac	att	ggc	agg	ttc	aaa	tct	ctg	tca	cca	cag	gag	cta	gcg	agc	ttc	96
His	Ile	Gly	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Ala	Ser	Phe	
			20					25					30			

aag	aag	gcc	agg	gac	gcc	ttg	gaa	gag	tca	ctc	aag	ctg	aaa	aac	tgg	144
Lys	Lys	Ala	Arg	Asp	Ala	Leu	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Leu	Lys	Asn	Trp	

20

35	40	45	
agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc			192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe	Pro Gly Asn Trp	Asp Leu Arg Leu Leu	
50	55	60	
cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg			240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr			
65	70	75	80
ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta			288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu			
85	90	95	
gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc			336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala			
100	105	110	
tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc			384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu			
115	120	125	
cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct			432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala			
130	135	140	
ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg			480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr			
145	150	155	160
cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aay ctg tgt ctg aga acg tca			528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser			
165	170	175	
acc cac cct gag tcc acc tga			549
Thr His Pro Glu Ser Thr *			
180			

<210> 77
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<223> Met IL29 mutante C16X, Asn170

<400> 77

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

```

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

```

<210> 78
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL29 mutante C15X, Asp169

<221> CDS
 <222> (1)...(546)

<221> variación
 <222> (44)...(45)
 <223> n = A, T, G o C

<400> 78

```

ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc dnn cac 48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Xaa His
 1          5          10          15

att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag 96
Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys
          20          25          30

aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt 144
Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser
          35          40          45

tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag 192
Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln
          50          55          60

gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg 240
Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu
65          70          75          80

```

```

aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac 288
Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp
                        85                        90                        95

cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt 336
Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys
                        100                        105                        110

atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac 384
Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His
                        115                        120                        125

cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc 432
His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly
                        130                        135                        140

tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga 480
Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg
145                        150                        155                        160

gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gay ctg tgt ctg aga acg tca acc 528
Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr
                        165                        170                        175

cac cct gag tcc acc tga
His Pro Glu Ser Thr *
                        180

```

<210> 79
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL29 mutante C15X, Asp169

<221> VARIANTE
 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 79

```

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

```

```

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

```

<210> 80
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante C16X, Asp170

<221> CDS
 <222> (1)...(549)

<221> variación
 <222> (47)...(48)
 <223> n = A, T, G o C

<400> 80

```

atg ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc dnn 48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Xaa
 1          5          10          15

cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc 96
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe
          20          25          30

aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg 144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp
          35          40          45

agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc 192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu
          50          55          60

cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg 240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr
          65          70          75          80

ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta 288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu
          85          90          95

gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc 336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala
          100          105          110

tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc 384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu

```

115	120	125	
cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct			432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala			
130	135	140	
ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg			480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr			
145	150	155	160
cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gag ctg tgt ctg aga acg tca			528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Cys Leu Arg Thr Ser			
165	170	175	
acc cac cct gag tcc acc tga			549
Thr His Pro Glu Ser Thr *			
180			

<210> 81
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante C16X, Asp170

<221> VARIANTE
 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o As

<400> 81

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

<210> 82
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL29 mutante Asp169, C171X
 <221> CDS
 <222> (1)...(546)

5

<221> variación
 <222> (512)...(513)
 <223> n = A, T, G o C

10

<400> 82

ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac	48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His	
1 5 10 15	
att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag	96
Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys	
20 25 30	
aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt	144
Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser	
35 40 45	
tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag	192
Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln	
50 55 60	
gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg	240
Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu	
65 70 75 80	
aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac	288
Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp	
85 90 95	
cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt	336
Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys	
100 105 110	
atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac	384
Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His	
115 120 125	
cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc	432
His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly	
130 135 140	
tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga	480
Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg	
145 150 155 160	
gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gay ctg dnn ctg aga acg tca acc	528
Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr	
165 170 175	
cac cct gag tcc acc tga	546
His Pro Glu Ser Thr *	
180	

15

<210> 83
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> IL29 mutante Asp169, C171X

5 <221> VARIANTE
<222> (171)...(171)
<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 83

```

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

```

10

<210> 84
<211> 549
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Met IL29 mutante Asp170, C172X

20 <221> CDS
<222> (1)...(549)

25 <221> variación
<222> (515)...(516)
<223> n = A, T, G o C

<400> 84

atg ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc	48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys	
1 5 10 15	
cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc	96
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe	
20 25 30	
aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg	144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp	
35 40 45	
agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc	192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu	
50 55 60	
cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg	240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta	288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu	
85 90 95	
gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc	336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala	
100 105 110	
tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc	384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu	
115 120 125	
cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct	432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala	
130 135 140	
ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg	480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr	
145 150 155 160	
cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gay ctg dnn ctg aga acg tca	528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Xaa Leu Arg Thr Ser	
165 170 175	
acc cac cct gag tcc acc tga	549
Thr His Pro Glu Ser Thr *	
180	

<210> 85

<211> 182

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Met IL29 mutante Asp170, C172X

<221> VARIANTE

<222> (172)...(172)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 85

```

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

```

<210> 86
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL29 mutante T10P, Asn169, C171X

<221> CDS
 <222> (1)...(546)

<221> variación
 <222> (512)...(513)
 <223> n = A, T, G o C

<400> 86

```

ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc ccn act ggg aag ggc tgc cac 48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Pro Thr Gly Lys Gly Cys His
 1           5           10           15

```

```

att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag 96
Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys
                20                      25                      30

aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt 144
Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser
                35                      40                      45

tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag 192
Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln
                50                      55                      60

gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg 240
Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu
                65                      70                      75                      80

aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac 288
Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp
                85                      90                      95

cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt 336
Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys
                100                      105                      110

atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac 384
Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His
                115                      120                      125

cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc 432
His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly
                130                      135                      140

tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga 480
Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg
                145                      150                      155                      160

gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg tca acc 528
Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr
                165                      170                      175

cac cct gag tcc acc tga 546
His Pro Glu Ser Thr *
                180

```

<210> 87

<211> 181

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL29 mutante T10P, Asn169, C171X

<221> VARIANTE

<222> (171)...(171)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 87

```

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

```

<210> 88
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante T11P, Asn170, C172X

<221> CDS
 <222> (1)...(549)

<221> variación
 <222> (515)...(516)
 <223> n = A, T, G o C

<400> 88

```

atg ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc ccn act ggg aag ggc tgc 48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Pro Thr Gly Lys Gly Cys
1      5      10      15

cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc 96
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe
20      25      30

aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg 144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp
35      40      45

agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc 192

```

Ser	Cys	Ser	Ser	Pro	Val	Phe	Pro	Gly	Asn	Trp	Asp	Leu	Arg	Leu	Leu		
	50					55					60						
cag	gtg	agg	gag	cgc	cct	gtg	gcc	ttg	gag	gct	gag	ctg	gcc	ctg	acg	240	
Gln	Val	Arg	Glu	Arg	Pro	Val	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Leu	Thr	80	
	65				70				75								
ctg	aag	gtc	ctg	gag	gcc	gct	gct	ggc	cca	gcc	ctg	gag	gac	gtc	cta	288	
Leu	Lys	Val	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Val	Leu	95	
				85					90								
gac	cag	ccc	ctt	cac	acc	ctg	cac	cac	atc	ctc	tcc	cag	ctc	cag	gcc	336	
Asp	Gln	Pro	Leu	His	Thr	Leu	His	His	Ile	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Ala	110	
			100					105									
tgt	atc	cag	cct	cag	ccc	aca	gca	ggg	ccc	agg	ccc	cgg	ggc	cgc	ctc	384	
Cys	Ile	Gln	Pro	Gln	Pro	Thr	Ala	Gly	Pro	Arg	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	125	
		115					120										
cac	cac	tgg	ctg	cac	cgg	ctc	cag	gag	gcc	ccc	aaa	aag	gag	tcc	gct	432	
His	His	Trp	Leu	His	Arg	Leu	Gln	Glu	Ala	Pro	Lys	Lys	Glu	Ser	Ala	140	
		130				135											
ggc	tgc	ctg	gag	gca	tct	gtc	acc	ttc	aac	ctc	ttc	cgc	ctc	ctc	acg	480	
Gly	Cys	Leu	Glu	Ala	Ser	Val	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Arg	Leu	Leu	Thr	160	
					150					155							
cga	gac	ctc	aaa	tat	gtg	gcc	gat	ggg	aac	ctg	dnn	ctg	aga	acg	tca	528	
Arg	Asp	Leu	Lys	Tyr	Val	Ala	Asp	Gly	Asn	Leu	Xaa	Leu	Arg	Thr	Ser	175	
				165					170								
acc	cac	cct	gag	tcc	acc	tga										549	
Thr	His	Pro	Glu	Ser	Thr	*											
					180												

<210> 89
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante T11P, Asn170, C172X

<221> VARIANTE
 <222> (172)...(172)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 89

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

Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr
65 70 75 80
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu
85 90 95
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala
100 105 110
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu
115 120 125
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala
130 135 140
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
145 150 155 160
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser
165 170 175
Thr His Pro Glu Ser Thr
180

<210> 90
<211> 546
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IL29 mutante T10P, C15X, Asn169

<221> CDS
<222> (1)...(546)

<221> variación
<222> 30, 44, 45
<223> n = A, T, G o C

<400> 90

ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc ccn act ggg aag ggc dnn cac 48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Pro Thr Gly Lys Gly Xaa His
1 5 10 15
att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag 96
Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys
20 25 30
aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt 144
Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser
35 40 45
tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag 192
Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln
50 55 60
gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg 240
Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu
65 70 75 80
aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac 288
Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp
85 90 95

```

cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt 336
Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys
      100                      105                      110

atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac 384
Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His
      115                      120                      125

cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc 432
His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly
      130                      135                      140

tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga 480
Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg
      145                      150                      155                      160

gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aay ctg tgt ctg aga acg tca acc 528
Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr
      165                      170                      175

cac cct gag tcc acc tga 546
His Pro Glu Ser Thr *
      180

```

<210> 91
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL29 mutante T10P, C15X, Asn169

<221> VARIANTE
 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 91

```

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

```

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

<210> 92
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante T11P, C16X, Asn170

<221> CDS
 <222> (1)...(549)

<221> variación
 <222> 33, 47, 48
 <223> n = A, T, G o C

<400> 92

atg ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc ccn act ggg aag ggc dnn	48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Pro Thr Gly Lys Gly Xaa	
1 5 10 15	
cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc	96
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe	
20 25 30	
aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg	144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp	
35 40 45	
agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc	192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu	
50 55 60	
cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg	240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta	288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu	
85 90 95	
gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc	336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala	
100 105 110	
tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc	384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu	
115 120 125	
cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct	432

```

His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala
 130                      135                      140

ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg 480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
145                      150                      155                      160

cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aay ctg tgt ctg aga acg tca 528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser
                      165                      170                      175

acc cac cct gag tcc acc tga 549
Thr His Pro Glu Ser Thr *
          180

```

<210> 93
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante T11P, C16X, Asn170

<221> VARIANTE
 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 93

```

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

Thr His Pro Glu Ser Thr
      180

```

<210> 94
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL29 mutante T10P, Asp169, C171X

<221> CDS

<222> (1)...(546)

<221> variación

<222> 30, 512, 513

<223> n = A, T, G o C

<400> 94

ggc oct gtc ccc act tcc aag ccc acc ccn act ggg aag ggc tgc cac	48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Pro Thr Gly Lys Gly Cys His	
1 5 10 15	
att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag	96
Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys	
20 25 30	
aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt	144
Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser	
35 40 45	
tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag	192
Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln	
50 55 60	
gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg	240
Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu	
65 70 75 80	
aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac	288
Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp	
85 90 95	
cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt	336
Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys	
100 105 110	
atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac	384
Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His	
115 120 125	
cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc	432
His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly	
130 135 140	
tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga	480
Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg	
145 150 155 160	
gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gay ctg dnn ctg aga acg tca acc	528
Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr	
165 170 175	
cac cct gag tcc acc tga	546
His Pro Glu Ser Thr *	
180	

<210> 95

<211> 181

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL29 mutante T10P, Asp169, C171X

<221> VARIANTE

<222> (171)...(171)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 95

```

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

<210> 96

<211> 549

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Met IL29 mutante T11P, Asp170, C172X

<221> CDS

<222> (1)...(549)

<221> variación

<222> 33, 515, 516

<223> n = A, T, G o C

<400> 96

atg ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc ccn act ggg aag ggc tgc	48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Pro Thr Gly Lys Gly Cys	
1 5 10 15	
cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc	96
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe	
20 25 30	
aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg	144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp	
35 40 45	
agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc	192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu	
50 55 60	
cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg	240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta	288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu	
85 90 95	
gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc	336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala	
100 105 110	
tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc	384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu	
115 120 125	
cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct	432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala	
130 135 140	
ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg	480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr	
145 150 155 160	
cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gay ctg dnn ctg aga acg tca	528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Xaa Leu Arg Thr Ser	
165 170 175	
acc cac cct gag tcc acc tga	549
Thr His Pro Glu Ser Thr *	
180	

<210> 97
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante T11P, Asp170, C172X

<221> VARIANTE
 <222> (172)...(172)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 97

```

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

```

<210> 98
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL29 mutante T10P, C15X, Asp169

<221> CDS
 <222> (1)...(546)

<221> variación
 <222> 30, 44, 45
 <223> n = A, T, G o C

<400> 98

```

ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc ccn act ggg aag ggc dnn cac 48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Pro Thr Gly Lys Gly Xaa His
 1          5          10          15

att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag 96
Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys

```

ES 2 405 209 T3

	20	25	30	
	aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt			144
	Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser			
	35	40	45	
	tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag			192
	Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln			
	50	55	60	
	gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg			240
	Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu			
	65	70	75	80
	aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac			288
	Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp			
	85	90	95	
	cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt			336
	Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys			
	100	105	110	
	atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac			384
	Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His			
	115	120	125	
	cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc			432
	His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly			
	130	135	140	
	tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga			480
	Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg			
	145	150	155	160
	gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gay ctg tgt ctg aga acg tca acc			528
	Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr			
	165	170	175	
	cac cct gag tcc acc tga			546
	His Pro Glu Ser Thr *			
	180			

<210> 99

<211> 181

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL29 mutante T10P, C15X, Asp169

<221> VARIANTE

<222> (15)...(15)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 99

Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Pro Thr Gly Lys Gly Xaa His

```

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

```

<210> 100
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante T11P, C16X, Asp170

<221> CDS
 <222> (1)...(549)

<221> variación
 <222> 33, 47, 48
 <223> n = A, T, G o C

<400> 100

```

atg ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc ccn act ggg aag ggc dnn 48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Pro Thr Gly Lys Gly Xaa
  1           5           10           15

cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc 96
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe
      20           25           30

aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg 144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp
      35           40           45

agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc 192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu
      50           55           60

```

```

cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag got gag ctg gcc ctg acg 240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr
65 70 75 80

ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta 288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu
85 90 95

gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc 336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala
100 105 110

tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc 384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu
115 120 125

cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct 432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala
130 135 140

ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg 480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
145 150 155 160

cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gay ctg tgt ctg aga acg tca 528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Cys Leu Arg Thr Ser
165 170 175

acc cac cct gag tcc acc tga 549
Thr His Pro Glu Ser Thr *
180

```

<210> 101
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante T11P, C16X, Asp170

<221> VARIANTE
 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 101

```

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

```

```

      85      90      95
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala
      100      105      110
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu
      115      120      125
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala
      130      135      140
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
      145      150      155      160
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Cys Leu Arg Thr Ser
      165      170      175
Thr His Pro Glu Ser Thr
      180

```

<210> 102
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL29 mutante G18D, Asn169, C171X

<221> CDS
 <222> (1)...(546)

<221> variación
 <222> (512)...(513)
 <223> n = A, T, G o C

<400> 102

```

ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac 48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His
  1      5      10      15

att gay agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag 96
Ile Asp Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys
      20      25      30

aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt 144
Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser
      35      40      45

tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag 192
Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln
      50      55      60

gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg 240
Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu
      65      70      75      80

aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac 288
Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp
      85      90      95

cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt 336
Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys

```

100	105	110	
atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac			384
Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His			
115	120	125	
cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc			432
His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly			
130	135	140	
tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga			480
Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg			
145	150	155	160
gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg tca acc			528
Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr			
165	170	175	
cac cct gag tcc acc tga			546
His Pro Glu Ser Thr *			
180			

<210> 103

<211> 181

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL29 mutante G18D, Asn169, C171X

<221> VARIANTE

<222> (171)...(171)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 103

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

<210> 104
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante G19D, Asn170, C172X

<221> CDS
 <222> (1)...(549)

<221> variación
 <222> (515)...(516)
 <223> n = A, T, G o C

<400> 104

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

```

ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg 480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
145 150 155 160

cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg tca 528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser
165 170 175

acc cac cct gag tcc acc tga 549
Thr His Pro Glu Ser Thr *
180

```

<210> 105
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante G19D, Asn170, C172X

<221> VARIANTE
 <222> (172)...(172)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 105

```

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

```

<210> 106
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL29 mutante C15X, G18D, Asn169

<221> CDS
 <222> (1)...(546)

<221> variación

<222> (44)...(45)
<223> n = A, T, G o C

<400> 106

5

```

ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc dnn cac 48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Gly Lys Gly Xaa His
1 5 10 15

att gay agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag 96
Ile Asp Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys
20 25 30

aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt 144
Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser
35 40 45

tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag 192
Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln
50 55 60

gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg 240
Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu
65 70 75 80

aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac 288
Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp
85 90 95

cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt 336
Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys
100 105 110

atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac 384
Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His
115 120 125

cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc 432
His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly
130 135 140

tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga 480
Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg
145 150 155 160

gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aay ctg tgt ctg aga acg tca acc 528
Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr
165 170 175

cac cct gag tcc acc tga 546
His Pro Glu Ser Thr *
```

180

<210> 107
<211> 181
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IL29 mutante C15X, G18D, Asn169

10

15

<221> VARIANTE
 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

5 <400> 107

```

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

```

10 <210> 108
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Met IL29 mutante C16X, G19D, Asn170

20 <221> CDS
 <222> (1)...(549)
 <221> variación
 <222> (47)...(48)
 <223> n = A, T, G o C

25 <400> 108

atg ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc dnn	48
Met Gly Pro Val Thr Ser Lys Pro Thr Thr Gly Lys Gly Xaa	
1 5 10 15	
cac att gay agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc	96
His Ile Asp Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe	
20 25 30	
aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg	144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp	
35 40 45	
agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc	192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu	
50 55 60	
cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg	240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta	288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu	
85 90 95	
gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc	336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala	
100 105 110	
tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc	384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu	
115 120 125	
cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct	432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala	
130 135 140	
ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg	480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr	
145 150 155 160	
cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aay ctg tgt ctg aga acg tca	528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser	
165 170 175	
acc cac cct gag tcc acc tga	549
Thr His Pro Glu Ser Thr *	
180	

<210> 109

<211> 182

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Met IL29 mutante C16X, G19D, Asn170

<221> VARIANTE

<222> (16)...(16)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 109

```

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

```

<210> 110

<211> 546

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL29 mutante G18D, Asp169, C171X

<221> CDS

<222> (1)...(546)

<221> variación

<222> (512)...(513)

<223> n = A, T, G o C

<400> 110

```

ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac 48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His
 1      5      10      15

```

```

att gay agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag 96
Ile Asp Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys
      20      25      30

```

```

aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt 144

```

Lys	Ala	Arg	Asp	Ala	Leu	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Leu	Lys	Asn	Trp	Ser		
		35					40					45					
tgc	agc	tct	cct	gtc	ttc	ccc	ggg	aat	tgg	gac	ctg	agg	ctt	ctc	cag	192	
Cys	Ser	Ser	Pro	Val	Phe	Pro	Gly	Asn	Trp	Asp	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln		
	50					55					60						
gtg	agg	gag	cgc	cct	gtg	gcc	ttg	gag	gct	gag	ctg	gcc	ctg	acg	ctg	240	
Val	Arg	Glu	Arg	Pro	Val	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu		
	65				70					75					80		
aag	gtc	ctg	gag	gcc	gct	gct	ggc	cca	gcc	ctg	gag	gac	gtc	cta	gac	288	
Lys	Val	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Val	Leu	Asp		
				85				90						95			
cag	ccc	ctt	cac	acc	ctg	cac	cac	atc	ctc	tcc	cag	ctc	cag	gcc	tgt	336	
Gln	Pro	Leu	His	Thr	Leu	His	His	Ile	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Ala	Cys		
			100					105					110				
atc	cag	cct	cag	ccc	aca	gca	ggg	ccc	agg	ccc	cgg	ggc	cgc	ctc	cac	384	
Ile	Gln	Pro	Gln	Pro	Thr	Ala	Gly	Pro	Arg	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	His		
		115					120					125					
cac	tgg	ctg	cac	cgg	ctc	cag	gag	gcc	ccc	aaa	aag	gag	tcc	gct	ggc	432	
His	Trp	Leu	His	Arg	Leu	Gln	Glu	Ala	Pro	Lys	Lys	Glu	Ser	Ala	Gly		
	130					135					140						
tgc	ctg	gag	gca	tct	gtc	acc	ttc	aac	ctc	ttc	cgc	ctc	ctc	acg	cga	480	
Cys	Leu	Glu	Ala	Ser	Val	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Arg	Leu	Leu	Thr	Arg		
	145				150					155					160		
gac	ctc	aaa	tat	gtg	gcc	gat	ggg	gay	ctg	dnn	ctg	aga	acg	tca	acc	528	
Asp	Leu	Lys	Tyr	Val	Ala	Asp	Gly	Asp	Leu	Xaa	Leu	Arg	Thr	Ser	Thr		
				165					170					175			
cac	cct	gag	tcc	acc	tga											546	
His	Pro	Glu	Ser	Thr	*												
				180													

<210> 111

<211> 181

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL29 mutante G18D, Asp169, C171X

<221> VARIANTE

<222> (171)...(171)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 111

Gly	Pro	Val	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Gly	Cys	His
1				5				10					15		
Ile	Asp	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Ala	Ser	Phe	Lys
			20					25				30			

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

<210> 112
<211> 549
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Met IL29 mutante G19D, Asp170, C172X

<221> CDS
<222> (1)...(549)

<221> variación
<222> (515)...(516)
<223> n = A, T, G o C

<400> 112

atg ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc 48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys
1 5 10 15
cac att gay agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc 96
His Ile Asp Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe
20 25 30
aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg 144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp
35 40 45
agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc 192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu
50 55 60
cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg 240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr
65 70 75 80

```

ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta 288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu
      85                      90                      95

gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc 336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala
      100                      105                      110

tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc 384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu
      115                      120                      125

cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct 432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala
      130                      135                      140

ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg 480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
      145                      150                      155                      160

cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gay ctg dnn ctg aga acg tca 528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Xaa Leu Arg Thr Ser
      165                      170                      175

acc cac cct gag tcc acc tga 549
Thr His Pro Glu Ser Thr *
      180

```

<210> 113
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL29 mutante G19D, Asp170, C172X

<221> VARIANTE
 <222> (172)...(172)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 113

```

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

```

```

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

```

<210> 114
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL29 mutante C15X, G18D, Asp169

<221> CDS
 <222> (1)...(546)

<221> variación
 <222> (44)...(45)
 <223> n = A, T, G o C

<400> 114

```

ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc dnn cac 48
Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Xaa His
  1                    5                    10                    15

att gay agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag 96
Ile Asp Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys
                    20                    25                    30

aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt 144
Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser
                    35                    40                    45

tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag 192
Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln
                    50                    55                    60

gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg 240
Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu
    65                    70                    75                    80

aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac 288
Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp
                    85                    90                    95

cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt 336
Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys
                    100                    105                    110

atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac 384

```

```

Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His
    115                      120                      125

cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc 432
His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly
    130                      135                      140

tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga 480
Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg
    145                      150                      155                      160

gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gay ctg tgt ctg aga acg tca acc 528
Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr
    165                      170                      175

cac cct gag tcc acc tga 546
His Pro Glu Ser Thr *
    180

```

<210> 115
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> IL29 mutante C15X, G18D, Asp169

 <221> VARIANTE
 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

 <400> 115

```

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

```

<210> 116
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Met IL29 mutante C16X, G19D, Asp170

<221> CDS

<222> (1)...(549)

<221> variación

<222> (47)...(48)

<223> n = A, T, G o C

<400> 116

```

atg ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc dnn 48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Xaa
1 5 10 15

cac att gay agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc 96
His Ile Asp Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe
20 25 30

aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg 144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp
35 40 45

agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc 192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu
50 55 60

cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg 240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr
65 70 75 80

ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta 288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu
85 90 95

gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc 336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala
100 105 110

tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc 384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu
115 120 125

cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct 432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala
130 135 140

ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg 480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
145 150 155 160

cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gay ctg tgt ctg aga acg tca 528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Cys Leu Arg Thr Ser
165 170 175

acc cac cct gag tcc acc tga 549
Thr His Pro Glu Ser Thr *
180

```

<210> 117

<211> 182

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Met IL29 mutante C16X, G19D, Asp170

<221> VARIANTE

<222> (16)...(16)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 117

```

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

```

<210> 118

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia señal

<221> CDS

<222> (1)...(57)

<400> 118

```

atg gct gca gct tgg acc gtg gtg ctg gtg act ttg gtg cta ggc ttg 48
Met Ala Ala Ala Trp Thr Val Val Leu Val Thr Leu Val Leu Gly Leu
 1      5      10      15

gcc gtg gca
Ala Val Ala

```

<210> 119

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia señal

<400> 119

```

      Met Ala Ala Ala Trp Thr Val Val Leu Val Thr Leu Val Leu Gly Leu
      1           5           10           15
      Ala Val Ala

```

5 <210> 120
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia señal

<221> CDS
 <222> (1)...(66)

15 <400> 120

```

      atg gtg ccc acc aca ttg gct tgg acc gtg gtg ctg gtg act ttg gtg 48
      Met Val Pro Thr Thr Leu Ala Trp Thr Val Val Leu Val Thr Leu Val
      1           5           10           15

      cta ggc ttg gcc gtg gca 66
      Leu Gly Leu Ala Val Ala
      20

```

20 <210> 121
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia señal

<400> 121

```

      Met Val Pro Thr Thr Leu Ala Trp Thr Val Val Leu Val Thr Leu Val
      1           5           10           15
      Leu Gly Leu Ala Val Ala
      20

```

30
 <210> 122
 <211> 528
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-28B C48S

40 <221> CDS
 <222> (1)...(528)

<221> variación
 <222> (143)...(144)
 <223> n = A, T, G o C

<400> 122

gtt cct gtc gcc agg ctc cgc ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc tgc	48
Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys	
1 5 10 15	
cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc ttt	96
His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala Phe	
20 25 30	
aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tgc ctt ctg ctg aag gac dnn	144
Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp Xaa	
35 40 45	
aag tgc cgc tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag ctg	192
Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln Leu	
50 55 60	
cag gtg agg gag cgc ccc gtg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg	240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac act gac cca gcc ctg ggg gat	288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp	
85 90 95	
gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag ctc	336
Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu	
100 105 110	
cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg ggc	384
Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly	
115 120 125	
cgc ctc cac cat tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag gag	432
Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu	
130 135 140	
tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc	480
Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu	
145 150 155 160	
ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agc ggg gac ctg tgt gtc tga	528
Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val *	
165 170 175	

<210> 123

<211> 175

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> VARIANTE

<222> (48)...(48)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<223> IL-28B C48S

<400> 123

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

<210> 124
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL-28B C49S

<221> CDS
 <222> (1)...(531)

<221> variación
 <222> (146)...(147)
 <223> n = A, T, G o C

<400> 124

atg gtt cct gtc gcc agg ctc cgc ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc	48
Met Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly	
1 5 10 15	
tgc cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc	96
Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala	
20 25 30	
ttt aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tcg ctt ctg ctg aag gac	144
Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp	
35 40 45	
dnn aag tgc cgc tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag	192
Xaa Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln	
50 55 60	
ctg cag gtg agg gag cgc ccc gtg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg	240
Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu	
65 70 75 80	
acg ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac act gac cca gcc ctg ggg	288
Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly	
85 90 95	
gat gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag	336
Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln	
100 105 110	
ctc cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg	384
Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg	
115 120 125	
ggc cgc ctc cac cat tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag	432
Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys	
130 135 140	
gag tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc	480
Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg	
145 150 155 160	
ctc ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agc ggg gac ctg tgt gtc	528
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val	
165 170 175	
tga	531
*	

<210> 125
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (49)...(49)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<223> Met IL-28B C49S

<400> 125

```

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

```

<210> 126
 <211> 528
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-28B C50S
 <221> CDS
 <222> (1)...(528)

<221> variación
 <222> (149)...(150)
 <223> n = A, T, G o C

<400> 126

```

gtt cct gtc gcc agg ctc cgc ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc tgc 48
Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys
1      5      10      15

```

cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc ttt	96
His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala Phe	
20 25 30	
aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tgc ctt ctg ctg aag gac tgc	144
Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp Cys	
35 40 45	
aag dnn cgc tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag ctg	192
Lys Xaa Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln Leu	
50 55 60	
cag gtg agg gag cgc ccc gtg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg	240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac act gac cca gcc ctg ggg gat	288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp	
85 90 95	
gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag ctc	336
Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu	
100 105 110	
cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg ggc	384
Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly	
115 120 125	
cgc ctc cac cat tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag gag	432
Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu	
130 135 140	
tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc	480
Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu	
145 150 155 160	
ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agc ggg gac ctg tgt gtc tga	528
Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val *	
165 170 175	

<210> 127
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (50)...(50)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<223> IL-28B C50S

<400> 127

Val	Pro	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Pro	Asp	Ala	Arg	Gly	Cys
1				5				10					15		

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

<210> 128
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL-28B C51S

<221> CDS
 <222> (1)...(531)

<221> variación
 <222> (152)...(153)
 <223> n = A, T, G o C

<400> 128

atg gtt cct gtc gcc agg ctc cgc ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc	48
Met Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly	
1 5 10 15	
tgc cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc	96
Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala	
20 25 30	
ttt aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tcg ctt ctg ctg aag gac	144
Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp	
35 40 45	
tgc aag dnn cgc tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag	192
Cys Lys Xaa Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln	
50 55 60	
ctg cag gtg agg gag cgc ccc gtg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg	240
Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu	
65 70 75 80	

```

acg ctg aag gtt ctg gag gcc acc gct gac act gac cca gcc ctg ggg 288
Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly
      85              90              95

gat gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag 336
Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln
      100              105              110

ctc cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg 384
Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg
      115              120              125

ggc cgc ctc cac cat tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag 432
Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys
      130              135              140

gag tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc 480
Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg
      145              150              155              160

ctc ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agc ggg gac ctg tgt gtc 528
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val
      165              170              175

tga 531
*
```

<210> 129
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (51)...(51)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<223> Met IL-28B C51S

<400> 129

```

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

Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg
 115 120 125
 Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys
 130 135 140
 Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg
 145 150 155 160
 Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val
 165 170 175

<210> 130
 <211> 528
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-28B C48S T87S H135Y

<221> CDS
 <222> (1)...(528)

<221> variación
 <222> 143, 144, 261
 <223> n = A, T, G o C

<400> 130

gtt cct gtc gcc agg ctc cgc ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc tgc 48
 Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys
 1 5 10 15
 cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc ttt 96
 His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala Phe
 20 25 30
 aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tgc ctt ctg ctg aag gac dnn 144
 Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp Xaa
 35 40 45
 aag tgc cgc tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag ctg 192
 Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln Leu
 50 55 60
 cag gtg agg gag cgc ccc gtg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg 240
 Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr
 65 70 75 80
 ctg aag gtt ctg gag gcc wsn gct gac act gac cca gcc ctg ggg gat 288
 Leu Lys Val Leu Glu Ala Xaa Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp
 85 90 95
 gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag ctc 336
 Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu
 100 105 110
 cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg ggc 384
 Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly
 115 120 125

ES 2 405 209 T3

```

cgc ctc cac cat tgg ctg tay cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag gag 432
Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu
    130                135                140

tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc 480
Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu
    145                150                155                160

ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agc ggg gac ctg tgt gtc tga 528
Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val *
    165                170                175

```

<210> 131
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (48)... 48)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<221> VARIANTE
 <222> (87)...(87)
 <223> Xaa = Ser

<223> IL-28B C48S T87S H135Y

<400> 131

```

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

```

<210> 132
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL-28B C49S T88S H136Y

<221> CDS

<222> (1)...(531)

<221> variación

<222> 146, 147, 264

<223> n = A, T, G o C

<400> 132

atg gtt cct gtc gcc agg ctc cgc ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc	48
Met Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly	
1 5 10 15	
tgc cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc	96
Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala	
20 25 30	
ttt aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tcg ctt ctg ctg aag gac	144
Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Lys Asp	
35 40 45	
dnn aag tgc cgc tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag	192
Xaa Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln	
50 55 60	
ctg cag gtg agg gag cgc ccc gtg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg	240
Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu	
65 70 75 80	
acg ctg aag gtt ctg gag gcc wsn gct gac act gac cca gcc ctg ggg	288
Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Xaa Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly	
85 90 95	
gat gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag	336
Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln	
100 105 110	
ctc cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg	384
Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg	
115 120 125	
ggc cgc ctc cac cat tgg ctg tay cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag	432
Gly Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys	
130 135 140	
gag tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc	480
Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg	
145 150 155 160	
ctc ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agc ggg gac ctg tgt gtc	528
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val	
165 170 175	
tga	531
*	

<210> 133

<211> 176

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> VARIANTE
 <222> (49)...(49)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

5 <221> VARIANTE
 <222> (88)...(88)
 <223> Xaa = Ser

10 <223> Met IL-28B C49S T88S H136Y
 <400> 133

```

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

15 <210> 134
 <211> 528
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> IL-28B C50S T87S H135Y

<221> CDS
 <222> (1)...(528)

25 <221> variación
 <222> 149, 150, 261
 <223> n = A, T, G o C

30 <400> 134

gtt cct gtc gcc agg ctc cgc ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc tgc	48
Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys	
1 5 10 15	
cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc ttt	96
His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala Phe	
20 25 30	
aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tcg ctt ctg ctg aag gac tgc	144
Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp Cys	
35 40 45	
aag dnn cgc tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag ctg	192
Lys Xaa Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln Leu	
50 55 60	
cag gtg agg gag cgc ccc gtg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg	240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ctg aag gtt ctg gag gcc wsn gct gac act gac cca gcc ctg ggg gat	288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Xaa Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp	
85 90 95	
gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag ctc	336
Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu	
100 105 110	
cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg ggc	384
Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly	
115 120 125	
cgc ctc cac cat tgg ctg tay cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag gag	432
Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu	
130 135 140	
tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc	480
Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu	
145 150 155 160	
ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agc ggg gac ctg tgt gtc tga	528
Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val *	
165 170 175	

<210> 135
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (50)...(50)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<221> VARIANTE
 <222> (87)...(87)
 <223> Xaa = Ser

<223> IL-28B C50S T87S H135Y

<400> 135

```

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

```

<210> 136
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Met IL-28B C51S T88S H136Y

<221> CDS
 <222> (1)...(531)

<221> variación
 <222> 152, 153, 264
 <223> n = A, T, G o C

<400> 136

```

atg gtt cct gtc gcc agg ctc cgc ggg gct ctc ccg gat gca agg ggc 48
Met Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly
1      5      10      15

```

tgc cac ata gcc cag ttc aag tcc ctg tct cca cag gag ctg cag gcc	96
Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala	
20 25 30	
ttt aag agg gcc aaa gat gcc tta gaa gag tcg ctt ctg ctg aag gac	144
Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp	
35 40 45	
tgc aag dnn cgc tcc cgc ctc ttc ccc agg acc tgg gac ctg agg cag	192
Cys Lys Xaa Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln	
50 55 60	
ctg cag gtg agg gag cgc ccc gtg gct ttg gag gct gag ctg gcc ctg	240
Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu	
65 70 75 80	
acg ctg aag gtt ctg gag gcc wsn gct gac act gac cca gcc ctg ggg	288
Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Xaa Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly	
85 90 95	
gat gtc ttg gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cat atc ctc tcc cag	336
Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln	
100 105 110	
ctc cgg gcc tgt atc cag cct cag ccc acg gca ggg ccc agg acc cgg	384
Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg	
115 120 125	
ggc cgc ctc cac cat tgg ctg tay cgg ctc cag gag gcc cca aaa aag	432
Gly Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys	
130 135 140	
gag tcc cct ggc tgc ctc gag gcc tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc	480
Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg	
145 150 155 160	
ctc ctc acg cga gac ctg aat tgt gtt gcc agc ggg gac ctg tgt gtc	528
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val	
165 170 175	
tga	531
*	

<210> 137
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (51)...(51)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<221> VARIANTE
 <222> (88)...(88)
 <223> Xaa = Ser

<223> Met IL-28B C51S T88S H136Y

<400> 137

```

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

```

<210> 138

<211> 543

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-29 C170X, truncada después de glicina y metionina N-terminal

<221> variación

<222> (509)...(510)

<223> n = A, T, G o C

<221> CDS

<222> (1)...(543)

<400> 138

```

oct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac att 48
Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile
1          5          10          15

```

```

ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag aag 96
Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys
20          25          30

```

```

gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt tgc 144
Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys
35          40          45

```

```

agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag gtg 192
Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val
    50                55                60

agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag 240
Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys
    65                70                75                80

gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac cag 288
Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln
                85                90                95

ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt atc 336
Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile
                100                105                110

cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac cac 384
Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His
                115                120                125

tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc tgc 432
Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys
    130                135                140

ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac 480
Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp
    145                150                155                160

ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg tca acc cac 528
Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr His
                165                170                175

cct gag tcc acc tga 543
Pro Glu Ser Thr *
                180

```

<210> 139

<211> 180

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> VARIANTE

<222> (170)...(170)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<223> IL-29 C170X, truncada después de glicina y metionina N-terminal

<400> 139

```

Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile
 1          5          10          15
Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys
          20          25          30
Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys

```

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

<210> 140
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 C169X, truncada después de prolina, glicina y metionina N-terminal

<221> variación
 <222> (506)...(507)
 <223> n = A, T, G o C

<221> CDS
 <222> (1)...(540)

<400> 140

gtc	ccc	act	tcc	aag	ccc	acc	aca	act	ggg	aag	ggc	tgc	cac	att	ggc	48
Val	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Gly	Cys	His	Ile	Gly	
1				5					10					15		
agg	ttc	aaa	tct	ctg	tca	cca	cag	gag	cta	gcg	agc	ttc	aag	aag	gcc	96
Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Ala	Ser	Phe	Lys	Lys	Ala	
			20				25					30				
agg	gac	gcc	ttg	gaa	gag	tca	ctc	aag	ctg	aaa	aac	tgg	agt	tgc	agc	144
Arg	Asp	Ala	Leu	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Leu	Lys	Asn	Trp	Ser	Cys	Ser	
	35					40						45				
tct	cct	gtc	ttc	ccc	ggg	aat	tgg	gac	ctg	agg	ctt	ctc	cag	gtg	agg	192
Ser	Pro	Val	Phe	Pro	Gly	Asn	Trp	Asp	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln	Val	Arg	
	50				55						60					
gag	cgc	cct	gtg	gcc	ttg	gag	gct	gag	ctg	gcc	ctg	acg	ctg	aag	gtc	240
Glu	Arg	Pro	Val	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Lys	Val	
65					70					75					80	

```

ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac cag ccc 288
Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro
      85                      90                      95

ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt atc cag 336
Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln
      100                    105                    110

cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac cac tgg 384
Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp
      115                    120                    125

ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc tgc ctg 432
Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu
      130                    135                    140

gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctc 480
Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu
      145                    150                    155

aaa tat gtg gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg tca acc cac cct 528
Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr His Pro
      165                    170                    175

gag tcc acc tga 540
Glu Ser Thr *

```

<210> 141
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (169)...(169)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<223> L-29 C169X, truncada después de prolina, glicina y metionina N-terminal

<400> 141

```

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

```

```

          100          105          110
Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp
          115          120          125
Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu
          130          135          140
Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu
          145          150          155          160
Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr His Pro
          165          170          175
Glu Ser Thr

```

<210> 142
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 C168X, truncada después de valina, prolina, glicina y metionina N-terminal

<221> variación
 <222> (503)...(504)
 <223> n = A, T, G o C

<221> CDS
 <222> (1)...(537)

<400> 142

```

ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac att ggc agg 48
Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg
  1          5          10          15

ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag aag gcc agg 96
Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg
          20          25          30

gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt tgc agc tct 144
Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser
          35          40          45

cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag gtg agg gag 192
Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu
          50          55          60

cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag gtc ctg 240
Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu
          65          70          75          80

gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac cag ccc ctt 288
Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu
          85          90          95

cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt atc cag cct 336
His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro
          100          105          110

```

```

cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac cac tgg ctg 384
Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu
      115                120                125

cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc tgc ctg gag 432
His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu
      130                135                140

gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctc aaa 480
Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys
      145                150                155                160

tat gtg gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg tca acc cac cct gag 528
Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu
      165                170                175

tcc acc tga 537
Ser Thr *
```

<210> 143
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 C168X, troncada después de valina, prolina, glicina y metionina N-terminal

<221> VARIANTE
 <222> (168)...(168)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 143

```

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

165 170 175
 Ser Thr

<210> 144
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-29 C167X, truncada después de valina, prolina, glicina y metionina N-terminal

<221> variación

<222> (500)...(501)

<223> n = A, T, G o C

<221> CDS

<222> (1)...(534)

<400> 144

```

act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac att ggc agg ttc 48
Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe
 1          5          10          15

aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag aag gcc agg gac 96
Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp
          20          25          30

gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt tgc agc tct cct 144
Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro
          35          40          45

gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag gtg agg gag cgc 192
Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg
          50          55          60

cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag gtc ctg gag 240
Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu
          65          70          75          80

gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac cag ccc ctt cac 288
Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His
          85          90          95

acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt atc cag cct cag 336
Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln
          100          105          110

ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac cac tgg ctg cac 384
Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His
          115          120          125

cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc tgc ctg gag gca 432
Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala
          130          135          140

tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctc aaa tat 480
Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr
          145          150          155          160

gtg gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg tca acc cac cct gag tcc 528
Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser
          165          170          175

acc tga 534
Thr *
```

<210> 145

<211> 177

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-29 C167X, truncada después de valina, prolina, glicina y metionina N-terminal

<221> VARIANTE

<222> (167)...(167)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 145

```

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

```

Thr

<210> 146

<211> 531

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-29 C166X, truncada después de treonina, valina, prolina, glicina y metionina N-terminal

<221> variación

<222> (497)...(498)

<223> n = A, T, G o C

<221> CDS

<222> (1)...(531)

<400> 146

tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac att ggc agg ttc aaa	48
Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys	
1 5 10 15	
tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag aag gcc agg gac gcc	96
Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala	
20 25 30	
ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt tgc agc tct cct gtc	144
Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val	
35 40 45	
ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag gtg agg gag cgc cct	192
Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro	
50 55 60	
gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag gtc ctg gag gcc	240
Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala	
65 70 75 80	
gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac cag ccc ctt cac acc	288
Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr	
85 90 95	
ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt atc cag cct cag ccc	336
Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro	
100 105 110	
aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac cac tgg ctg cac cgg	384
Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg	
115 120 125	
ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc tgc ctg gag gca tct	432
Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser	
130 135 140	
gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctc aaa tat gtg	480
Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val	
145 150 155 160	
gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg tca acc cac cct gag tcc acc	528
Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr	
165 170 175	
tga	531
*	

<210> 147

<211> 176

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-29 C166X, truncada después de treonina, prolina, valina, prolina, glicina y metionina N-terminal

<221> VARIANTE

<222> (166)...(166)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 147

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

<210> 148
 <211> 528
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 C165X, truncada después de serina, treonina, prolina, valina, prolina, glicina y metionina N-terminal

<221> variación
 <222> (499)...(495)
 <223> n = A, T, G o C

<221> CDS
 <222> (1)...(528)

<400> 148

```

aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac att ggc agg ttc aaa tct 48
Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser
1 5 10 15

ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag aag gcc agg gac gcc ttg 96
Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu
20 25 30

gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt tgc agc tct cct gtc ttc 144
Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe
35 40 45

ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag gtg agg gag cgc cct gtg 192
Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val
50 55 60

gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag gtc ctg gag gcc gct 240
Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala
65 70 75 80

gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac cag ccc ctt cac acc ctg 288
Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu
85 90 95

cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt atc cag cct cag ccc aca 336
His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr
100 105 110

gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac cac tgg ctg cac cgg ctc 384
Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu
115 120 125

cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc tgc ctg gag gca tct gtc 432
Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val
130 135 140

acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctc aaa tat gtg gcc 480
Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala
145 150 155 160

gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg tca acc cac cct gag tcc acc tga 528
Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr *
165 170 175

```

<210> 149

<211> 175

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-29 C165X, truncada después de serina, treonina, prolina, valina, prolina, glicina y metionina N-terminal

<221> VARIANTE

<222> (165)...(165)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 149

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

<210> 150
 <211> 552
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 con de Leu después de Met N-terminal, C173X

<221> variación
 <222> (518)...(519)
 <223> n = A, T, G o C

<221> CDS
 <222> (1)...(552)

<400> 150

atg	ytn	ggc	cct	gtc	ccc	act	tcc	aag	ccc	acc	aca	act	ggg	aag	ggc	48
Met	Leu	Gly	Pro	Val	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Gly	
1				5				10					15			
tgc	cac	att	ggc	agg	ttc	aaa	tct	ctg	tca	cca	cag	gag	cta	gcg	agc	96
Cys	His	Ile	Gly	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Ala	Ser	

ES 2 405 209 T3

	20	25	30	
	ttc aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac			144
	Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn			
	35	40	45	
	tgg agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt			192
	Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu			
	50	55	60	
	ctc cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg			240
	Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu			
	65	70	75	80
	acg ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc			288
	Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val			
	85	90	95	
	cta gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag			336
	Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln			
	100	105	110	
	gcc tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc			384
	Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg			
	115	120	125	
	ctc cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc			432
	Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser			
	130	135	140	
	gct ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc			480
	Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu			
	145	150	155	160
	acg cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg			528
	Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr			
	165	170	175	
	tca acc cac cct gag tcc acc tga			552
	Ser Thr His Pro Glu Ser Thr *			
	180			

<210> 151

<211> 183

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-29 con inserto de Leu después de Met N-terminal, C173X

<221> VARIANTE

<222> (173)...(173)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 151

Met Leu Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly

```

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

```

<210> 152
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 G2L C172X

<221> variación
 <222> (515)...(516)
 <223> n = A, T, G o C

<221> CDS
 <222> (1)...(549)

<400> 152

```

atg ytn cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc 48
Met Leu Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys
  1           5           10           15

cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc 96
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe
      20           25           30

aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg 144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp
      35           40           45

agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc 192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu
      50           55           60

```

cag	gtg	agg	gag	cgc	cct	gtg	gcc	ttg	gag	gct	gag	ctg	gcc	ctg	acg	240
Gln	Val	Arg	Glu	Arg	Pro	Val	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Leu	Thr	
65					70					75					80	
ctg	aag	gtc	ctg	gag	gcc	gct	gct	ggc	cca	gcc	ctg	gag	gac	gtc	cta	288
Leu	Lys	Val	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Val	Leu	
				85					90					95		
gac	cag	ccc	ctt	cac	acc	ctg	cac	cac	atc	ctc	tcc	cag	ctc	cag	gcc	336
Asp	Gln	Pro	Leu	His	Thr	Leu	His	His	Ile	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Ala	
			100					105					110			
tgt	atc	cag	cct	cag	ccc	aca	gca	ggg	ccc	agg	ccc	cgg	ggc	cgc	ctc	384
Cys	Ile	Gln	Pro	Gln	Pro	Thr	Ala	Gly	Pro	Arg	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	
		115					120					125				
cac	cac	tgg	ctg	cac	cgg	ctc	cag	gag	gcc	ccc	aaa	aag	gag	tcc	gct	432
His	His	Trp	Leu	His	Arg	Leu	Gln	Glu	Ala	Pro	Lys	Lys	Glu	Ser	Ala	
		130				135					140					
ggc	tgc	ctg	gag	gca	tct	gtc	acc	ttc	aac	ctc	ttc	cgc	ctc	ctc	acg	480
Gly	Cys	Leu	Glu	Ala	Ser	Val	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Arg	Leu	Leu	Thr	
145					150					155					160	
cga	gac	ctc	aaa	tat	gtg	gcc	gat	ggg	aac	ctg	dnn	ctg	aga	acg	tca	528
Arg	Asp	Leu	Lys	Tyr	Val	Ala	Asp	Gly	Asn	Leu	Xaa	Leu	Arg	Thr	Ser	
				165					170					175		
acc	cac	cct	gag	tcc	acc	tga										549
Thr	His	Pro	Glu	Ser	Thr	*										
			180													

<210> 153
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 G2L C172X

<221> VARIANTE
 <222> (172)...(172)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 153

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

```

      85      90      95
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala
      100      105      110
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu
      115      120      125
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala
      130      135      140
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
      145      150      155      160
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser
      165      170      175
Thr His Pro Glu Ser Thr
      180

```

<210> 154
 <211> 552
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 con inserto de Ile después de Met N-terminal, C173X

<221> variación
 <222> (518)...(519)
 <223> n = A, T, G o C

<221> CDS
 <222> (1)...(552)

<400> 154

```

atg ath ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc 48
Met Ile Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly
  1      5      10      15

tgc cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc 96
Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser
      20      25      30

ttc aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac 144
Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn
      35      40      45

tgg agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt 192
Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu
      50      55      60

ctc cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg 240
Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu
      65      70      75      80

acg ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc 288
Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val
      85      90      95

cta gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag 336
Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln

```

100	105	110	
gcc tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc			384
Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg			
115	120	125	
ctc cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc			432
Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser			
130	135	140	
gct ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc			480
Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu			
145	150	155	160
acg cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg			528
Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr			
165	170	175	
tca acc cac cct gag tcc acc tga			552
Ser Thr His Pro Glu Ser Thr *			
180			

<210> 155
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 con inserto de Ile después de Met N-terminal, C173X

<221> VARIANTE
 <222> (173)...(173)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 155

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

<210> 156

<211> 549
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> IL-29 G2I C172X

10 <221> variación
 <222> (515)...(516)
 <223> n = A, T, G o C

<221> CDS
 <222> (1)...(549)

15 <400> 156

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

```

ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg 480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
145          150          155          160

cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg tca 528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser
165          170          175

acc cac cct gag tcc acc tga 549
Thr His Pro Glu Ser Thr *
180

```

<210> 157
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 G2I C172X

<221> VARIANTE
 <222> (172)...(172)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 157

```

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

```

<210> 158
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 después de 2-7 restos de aminoácidos Met N-terminal, C166X

<221> variación
 <222> (497)...(498)
 <223> n = A, T, G o C

<221> CDS

<222> (1)...(531)

<400> 158

5

```

atg aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac att ggc agg ttc aaa 48
Met Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys
 1                    5                      10                15

tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag aag gcc agg gac gcc 96
Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala
                20                      25                30

ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt tgc agc tct cct gtc 144
Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val
                35                      40                45

ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag gtg agg gag cgc cct 192
Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro
                50                      55                60

gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag gtc ctg gag gcc 240
Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala
        65                      70                75                80

gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac cag ccc ctt cac acc 288
Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr
                85                      90                95

ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt atc cag cct cag ccc 336
Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro
                100                     105                110

aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac cac tgg ctg cac cgg 384
Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg
                115                     120                125

ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc tgc ctg gag gca tct 432
Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser
                130                     135                140

gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctc aaa tat gtg 480
Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val
        145                      150                155                160

gcc gat ggg aac ctg dnn ctg aga acg tca acc cac cct gag tcc acc 528
Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr
                165                      170                175

tga
531

```

*

<210> 159

<211> 176

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-29 después de 2-7 restos de aminoácidos Met N-terminal, C166X

10

15

<221> VARIANTE
 <222> (166)...(166)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

5 <400> 159

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

<210> 160
 <211> 558
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-29 Glu, Ala y Glu insertados después de Met N-terminal, C175X

<221> variación
 <222> (524)...(525)
 <223> n = A, T, G o C

<221> CDS
 <222> (1)...(558)

<400> 160

atg gar gcn gar ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg	48
Met Glu Ala Glu Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly	
1 5 10 15	
aag ggc tgc cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta	96
Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu	
20 25 30	
gcg agc ttc aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg	144
Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu	
35 40 45	
aaa aac tgg agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg	192
Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu	
50 55 60	
agg ctt ctc cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg	240
Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu	
65 70 75 80	
gcc ctg acg ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag	288
Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu	
85 90 95	
gac gtc cta gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag	336
Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln	
100 105 110	
ctc cag gcc tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg	384
Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg	
115 120 125	
ggc cgc ctc cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag	432
Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys	
130 135 140	
gag tcc gct ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc	480
Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg	
145 150 155 160	
ctc ctc acg cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aac ctg dnn ctg	528
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Xaa Leu	
165 170 175	
aga acg tca acc cac cct gag tcc acc tga	558
Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr *	
180 185	

<210> 161

<211> 185

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-29 Glu, Ala y Glu insertados después de Met N-terminal, C175X

<221> VARIANTE

<222> (175)...(175)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<400> 161

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con los restos de aminoácidos 1-181 de la SEC ID NO:4; en el que el resto de aminoácido que corresponde a la cisteína en la posición 171 de la SEC ID NO:4, está sustituido por un resto de serina;
- 5 en el que los restos de aminoácidos que corresponden a la cisteína en la posición 15 y en la posición 112 de la SEC ID NO:4 forman un primer enlace disulfuro, y en el que los restos de aminoácidos que corresponden a la cisteína en la posición 49 y en la posición 145 de la SEC ID NO:4 forman un segundo enlace disulfuro, y en el que el polipéptido inhibe la replicación de la hepatitis B o de la hepatitis C.
- 10 2. El polipéptido aislado de la Reivindicación 1, en el que el polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos 95% con los restos de aminoácidos 1-181 de la SEC ID NO:4.
3. El polipéptido aislado de la Reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende adicionalmente una metionina amino-terminal.
4. Un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3.
- 15 5. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente:
 - un promotor de la transcripción
 - un segmento de ADN que codifica el polipéptido de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3; y
 - un terminador de la transcripción.
- 20 6. Una célula cultivada que comprende el vector de expresión de la Reivindicación 5, en el que la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN.
7. Un procedimiento de producción de un polipéptido que comprende:
 - cultivar una célula que comprenda el vector de expresión de la Reivindicación 5, en el que la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN; y
 - recuperar el polipéptido expresado.
- 25 8. Una formulación que comprende el polipéptido según cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Un kit que comprende la formulación de la Reivindicación 8.
10. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con los restos de aminoácidos 1-181 de la SEC ID NO:4, en el que el resto de aminoácido que corresponde a la cisteína en la posición 171 de la SEC ID NO:4 está sustituido por un resto de serina, en el que el polipéptido inhibe la replicación de la hepatitis B o de la hepatitis C; y en el que el polipéptido está pegilado.
- 30 11. Un polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 10, en el que dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con la SEC ID NO:27.
12. Un polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 10, en el que dicho polipéptido comprende adicionalmente una metionina amino-terminal.
- 35 13. Un polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 12, en el que dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con la SEC ID NO:29.
14. Un polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 10-13, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular de 20kD.
- 40 15. Un polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 10-14, en el que el polietilenglicol está unido al extremo N del polipéptido.
16. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con los restos de aminoácidos 1-181 de la SEC ID NO:4, en el en el que el resto de aminoácido que corresponde a la cisteína en la posición 171 de la SEC ID NO:4 está sustituido por un resto de serina, en el que el polipéptido inhibe la replicación de la hepatitis B o de la hepatitis C; y en el que, para su uso en terapia, el polipéptido está conjugado con un resto polímero soluble en agua farmacéuticamente aceptable.
- 45 17. Un polipéptido aislado para su uso de acuerdo con la Reivindicación 16, en el que el resto polímero soluble en agua es polietilenglicol.