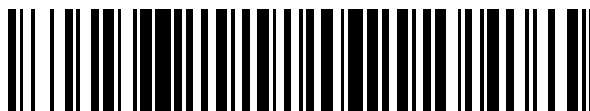


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 126**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2001** **E 01273862 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013** **EP 1379647**

54 Título: **Anticuerpos antagonistas de una citocina de mamífero o su receptor para el tratamiento de alergia**

30 Prioridad:

10.11.2000 US 247218 P
14.06.2001 US 298268 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2013

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065-0907, US

72 Inventor/es:

RECHE-GALLARDO, PEDRO A.;
DE WAAL MALEFYT, RENE;
BAZAN, J. FERNANDO;
KASTELEIN, ROBERT A. y
LIU, YONG-JUN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 424 126 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

Anticuerpos antagonistas de una citocina de mamífero o su receptor para el tratamiento de alergia

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 La presente divulgación se refiere a composiciones y procedimientos para afectar la fisiología de mamíferos, que incluyen proliferación celular hematopoyética o función del sistema inmunitario. En particular, proporciona procedimientos de uso de ácidos nucleicos, proteínas y anticuerpos que regulan el desarrollo y/o el sistema inmunitario; y proporciona detalles funcionales del emparejamiento ligando-receptor. También se desvelan usos diagnósticos y terapéuticos de estos materiales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 La tecnología de ADN recombinante se refiere generalmente a técnicas de integración de información genética de una fuente de donante en vectores para el posterior procesamiento, tal como mediante introducción en un huésped, por lo que la información genética transferida se copia y/o expresa en el nuevo entorno. Comúnmente, la información genética existe en forma de ADN complementario (ADNc) derivado de ARN mensajero (ARNm) que codifica un producto de proteína deseado. El vehículo es frecuentemente un plásmido que tiene la capacidad para incorporar ADNc para la posterior replicación en un huésped y, en algunos casos, en realidad para controlar la expresión del ADNc y así dirigir la síntesis del producto codificado en el huésped.

- 20 Durante algún tiempo se ha sabido que la respuesta inmunitaria de mamíferos se basa en una serie de complejas interacciones celulares, llamadas la "red inmunitaria". Una investigación reciente ha proporcionado nuevos conocimientos de los trabajos internos de esta red. Aunque queda claro que una buena parte de la respuesta inmunitaria gira, en realidad, en torno a interacciones similares a red de linfocitos, macrófagos, granulocitos y otras células, los inmunólogos mantienen ahora generalmente la opinión de que las proteínas solubles, conocidas como linfocinas, citocinas o monocinas, desempeñan funciones críticas en controlar estas interacciones celulares. Así, hay considerable interés en el aislamiento, caracterización y mecanismos de acción de factores moduladores de células, un entendimiento del cual que conducirá a avances significativos en el diagnóstico y terapia de numerosas anomalías médicas, por ejemplo, trastornos del sistema inmunitario.

- 25 Las linfocinas aparentemente median en actividades celulares de diversas formas. Se ha mostrado que soportan la proliferación, crecimiento y/o diferenciación de citoblastos hematopoyéticos pluripotentes en amplios números de progenitores que comprenden diversos linajes celulares que constituyen un sistema inmunitario complejo. Las interacciones apropiadas y equilibradas entre los componentes celulares son necesarias para una respuesta inmunitaria sana. Los diferentes linajes celulares frecuentemente responden de un modo diferente cuando las linfocinas se administran conjuntamente con otros agentes.

- 35 Linajes celulares especialmente importantes para la respuesta inmunitaria incluyen dos clases de linfocitos: linfocitos B, que pueden producir y secretar inmunoglobulinas (proteínas con la capacidad de reconocer y unirse a materia extraña para efectuar su eliminación) y linfocitos T de diversos subconjuntos que secretan linfocinas e inducen o suprimen los linfocitos B y diversas otras células (incluyendo otros linfocitos T) que constituyen la red inmunitaria. Estos linfocitos interactúan con muchos otros tipos de células. Los monocitos son precursores de macrófagos que, con células dendríticas, son funcionalmente importantes en sus funciones como procesadores y presentadores de antígeno, una etapa importante en la iniciación de una respuesta inmunitaria.

- 40 IL-7 es un factor modulador de células que afecta el crecimiento y/o diferenciación de células hematopoyéticas. Véanse, por ejemplo, Mire-Sluis y Thorpe (1998) Cytokines Academic Press, San Diego; Thomson (ed. 1998) The Cytokine Handbook (3ª ed.) Academic Press, San Diego; Metcalf y Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; y Aggarwal y Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell.

- 45 Pandey y col. (Nature Immunol. 1 (2000), 59-64)) describen la clonación de una subunidad murina del receptor de TSLP (en el presente documento también "IL-B50") y su caracterización funcional como complejo de receptor heterólogo junto con la segunda subunidad, IL-7R alfa. El documento WO 00/17362 describe la novedosa citocina hematopoyética humana IL-B50 como un homólogo estructural y funcional de IL-7.

- 50 La investigación para entender y tratar mejor diversos trastornos inmunitarios ha sido dificultada por la incapacidad general para mantener células del sistema inmunitario *in vitro*. Los inmunólogos han descubierto que el cultivo de muchas de estas células puede llevarse a cabo mediante el uso de sobrenadantes de linfocitos T y de otras células que contienen diversos factores de crecimiento, que incluyen muchas de las linfocinas.

De lo anterior es evidente que el entendimiento de las rutas de transducción de señales e identificación de componentes en tales rutas debe contribuir a nuevas terapias para una amplia gama de afecciones degenerativas o anormales que

implican directamente o indirectamente desarrollo, diferenciación o función, por ejemplo, del sistema inmunitario y/o células hematopoyéticas. Además, moléculas reguladoras solubles, que incluye citocinas, son conocidas algunas veces por actuar fuera del sistema inmunitario con efectos sobre la fisiología (leptina), morfogénesis y remodelación tisular y esquelética (RANKL). Así, sería altamente ventajoso el descubrimiento y el entendimiento de novedosas moléculas similares a citocina y sus receptores que intensifican o potencian las beneficiosas actividades de otras linfocinas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de un antagonista de IL-B50 (Figura 3A), que es un anticuerpo neutralizante para IL-7R α (SEC ID N°: 2) o la subunidad R δ 2 (SEC ID N°: 4) o un complejo que comprende dichas subunidades o un anticuerpo que neutraliza IL-B50, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades alérgicas bloqueando el funcionamiento de células dendríticas humanas. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un antagonista de IL-B50 (Figura 3A), que es un anticuerpo neutralizante para IL-7R α (SEC ID N°: 2) o la subunidad R δ 2 (SEC ID N°: 4) o un complejo que comprende dichas subunidades o un anticuerpo que neutraliza IL-B50, para el tratamiento de enfermedades alérgicas bloqueando el funcionamiento de células dendríticas humanas. Preferentemente, dichas células dendríticas humanas incluyen el subconjunto CD11c+.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento del complejo de receptor para el ligando de citocina IL-B50. Además, la identificación de los componentes permite la identificación de tipos de células y etapas que expresan los componentes necesarios para ser sensibles al ligando. Esto proporciona el conocimiento y la capacidad de predecir el funcionamiento fisiológico e inmunológico de la citocina.

La presente divulgación proporciona, por ejemplo, procedimientos de producción de un complejo de ligando:receptor que comprende poner en contacto: una IL-B50 de mamífero sustancialmente pura o recombinante con un receptor que comprende IL-7R α o la subunidad R δ 2; una IL-B50 de mamífero con un receptor que comprende una subunidad IL-7R α sustancialmente pura o recombinante; o una IL-B50 de mamífero con un receptor que comprende una subunidad R δ 2 sustancialmente pura o recombinante; cuya puesta en contacto permite así que se forme el complejo. En realizaciones preferidas, la IL-B50 de mamífero es IL-B50 de primate, tal como IL-B50 humana; la formación de complejos produce transducción de señales, activación de STAT o expresión de TARC; el receptor está sobre una célula; el receptor comprende tanto IL-7R α como la subunidad R δ 2; la formación de complejos produce un cambio fisiológico en la célula que expresa el receptor; la puesta en contacto es en combinación con un agente proliferativo, citocina o quimiocina; la puesta en contacto permite la detección cuantitativa del ligando; o el receptor está sobre una célula hematopoyética, que incluye una célula de linaje linfóide, una célula mieloide tal como un monocito, o célula dendrítica.

Se proporciona otro procedimiento para modular la fisiología o el desarrollo de una célula que expresa IL-7R α o R δ 2 que comprende poner en contacto la célula con un agonista o antagonista exógeno de una IL-B50 de mamífero. Diversas realizaciones incluyen aquellas en las que: el antagonista es un anticuerpo que neutraliza la IL-B50 de mamífero, una muteína de IL-B50; o un anticuerpo que se une a IL-7R α o R δ 2 o un complejo de ambos; o la fisiología está seleccionada de proliferación, desarrollo de células de linaje linfóide, presentación de antígeno o producción de mediadores inflamatorios, que incluyen citocinas, quimiocinas o moléculas de adhesión; o la célula es una célula hematopoyética. Otras realizaciones incluyen aquellas en las que: el antagonista es un anticuerpo y la fisiología es proliferación de células hematopoyéticas; el agonista es IL-B50 y la fisiología es diferenciación de células hematopoyéticas; la fisiología es presentación de antígeno; o la modulación es el bloqueo, y la fisiología es proliferación de células de linaje linfóide.

Otras divulgaciones proporcionan procedimientos de modulación de una señal para una célula mediada por IL-B50 que comprenden poner en contacto la célula con un agonista o antagonista administrado de IL-B50. Éstos incluyen aquellos en los que la modulación es inhibir, y la señal es una señal de proliferación; el antagonista es un anticuerpo neutralizante para IL-7R α o la subunidad R δ 2 o un complejo que comprende las subunidades; el agonista o antagonista se administra en combinación con otro antagonista o agonista de IL-B50; el agonista o antagonista se administra en combinación con un factor de crecimiento, citocina, quimiocina o adyuvante inmunitario; o la puesta en contacto es con otro agente o tratamiento antiproliferativo.

Otros procedimientos incluyen aquellos de marcar selectivamente una población de células, comprendiendo el procedimiento poner en contacto las células con un anticuerpo que une: IL-7R α ; R δ 2; o un complejo que comprende una de las subunidades; produciendo así la identificación de células que expresan la subunidad o complejo. Ciertas realizaciones incluyen aquellas en las que: la puesta en contacto produce modulación de la activación de STAT; el marcado permite la purificación de células que expresan IL-7R α o la subunidad R δ 2; o el marcado permite el agotamiento de células que expresan IL-7R α o la subunidad R δ 2. También se proporcionan poblaciones de células preparadas por los procedimientos, que incluyen aquellas que se preparan por citometría de flujo activada por fluorescencia.

La divulgación proporciona además procedimientos de prueba de un compuesto para la capacidad para afectar la interacción receptor-ligando, comprendiendo el procedimiento comparar la interacción de un complejo de receptor que comprende IL-7R α y/o la subunidad R δ 2 con IL-B50 en presencia y ausencia del compuesto. En ciertas realizaciones, el

compuesto es un anticuerpo que se une a uno de: subunidad IL-7R α ; R δ 2; un receptor que comprende IL-7R y/o R δ 2; o IL-B50.

Se desvelan ciertas composiciones, por ejemplo, un complejo de proteína aislado o recombinante que comprende: al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 2 y al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 4; al menos dos segmentos distintos de al menos 8 residuos de aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 2 y al menos dos segmentos distintos de al menos 8 residuos de aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 4; o al menos un segmento de al menos 21 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 1 y al menos un segmento de al menos 21 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 3. En realizaciones preferidas, uno de los segmentos de SEC ID N°: 2 es de la porción extracelular de la secuencia; uno de los segmentos de SEC ID N°: 4 es de la porción extracelular de la secuencia; o el polipéptido comprende las secuencias SEC ID N°: 2 madura y SEC ID N°: 4 madura.

Las divulgaciones de ácidos nucleicos incluyen un polinucleótido aislado o recombinante que codifica componentes descritos del complejo, en los que: el polinucleótido comprende un desoxirribonucleótido; el polinucleótido comprende un ribonucleótido; o al menos uno de los segmentos está operativamente ligado a un promotor.

También se desvelan anticuerpos que reconocen epítopes presentados por el complejo, por ejemplo, un compuesto de unión que comprende una porción de unión a antígeno de un anticuerpo que se une con selectividad a un polipéptido que comprende al menos 12 residuos de aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 2 y al menos 12 residuos de aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 4.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A-1E muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos (véase SEC ID N°: 1 y 2) de una IL-7R α de primate, por ejemplo, humana; indicado el sitio de escisión de la señal predicho.

Las Figuras 2A-2E muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos (véase SEC ID N°: 3 y 4) de una R δ 2 de primate, por ejemplo, humana; indicado el sitio de escisión de la señal predicho.

Las Figuras 3A y 3B muestran las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos, respectivamente, de IL-B50 de primate, por ejemplo, humana; indicada la posición de escisión de la señal predicha.

Las Figuras 4A-4E muestran niveles de expresión de hIL-7R α (Figuras 4A y 4B), R δ 2 (hTSLPR, Figuras 4C y 4D) y IL-B50 (Figura 4E) en diversos tejidos y tipos de células. Los niveles de expresión se normalizaron y se expresaron como femtogramas de ARNm por 50 ng de ADNc total.

La Figura 5 muestra la inducción de TARC por IL-B50. Se cultivaron CD CD11c⁺ humanas en ausencia o presencia de IL-B50 (50 ng/ml) y la producción de TARC se determinó en el sobrenadante de cultivo por ELISA.

La Figura 6A representa un cultivo de CD CD11c⁺ clasificadas después de 24 h en medio solo. Las CD forman agrupaciones pequeñas e irregulares con un centro oscuro, que indica la presencia de células moribundas.

La Figura 6B representa un cultivo de CD CD11c⁺ clasificadas del mismo donante que en la Figura 6A, tratadas con 15 ng/ml de IL-B50. Las CD forman agrupaciones más grandes y redondas con dendritas finas visibles en la periferia, que indica la maduración de las CD.

La Figura 7 muestra el fenotipo superficial de CD CD11c⁺ después de 24 h de cultivo con y sin (medio solo) IL-B50 y muestra la regulación por incremento de HLA-DR, además de las moléculas coestimulantes CD40, CD80 y CD86. Los resultados mostrados son de un experimento representativo de cuatro experimentos independientes.

La Figura 8 muestra el fenotipo superficial de CD después del tratamiento con medio solo, IL-B50, CD40-ligando (CD40L), IL-7 y LPS. IL-B50 es más potente que CD40-ligando y IL-7 en regular por incremento las moléculas coestimulantes CD40 y CD80.

La Figura 9 muestra los resultados de un ensayo de proliferación de linfocitos T usando CD CD11c⁺ maduras durante 24 h en medio o con IL-B50 (15 ng/ml) y co-cultivadas con 5×10^4 linfocitos T sin tratamiento previo CD4⁺CD45RA⁺ alogénicos a relaciones de CD/linfocitos T crecientes. La proliferación se evaluó en el día 6 midiendo la incorporación de [³H]timidina. Cada punto representa la incorporación de [³H]timidina media de co-cultivos por triplicado. Las barras verticales indican la DE. Se usaron CD solas ($\square$) como control y no proliferaron significativamente. Los resultados mostrados son de un experimento representativo de dos experimentos independientes.

La Figura 10 muestra los resultados de un experimento similar como se describe para la Figura 9, usando CD maduras en medio, IL-B50, CD40-ligando (CD40L), IL-7 y LPS.

Las Figuras 11A-11E muestran la producción de diversas citocinas (se expresaron como pg/ml) por linfocitos T CD4 sin tratamiento previo co-cultivados con CD maduras en medio solo, IL-B50, CD40-ligando (CD40L), IL-7 y LPS. La Figura 11A muestra el efecto sobre la producción de IL-4; la Figura 11B muestra el efecto sobre la producción de IL-13; la Figura 11C muestra el efecto sobre la producción de IFN- γ , la Figura 11D muestra el efecto sobre la producción de IL-10 y la Figura 11E muestra el efecto sobre la producción de TNF- α .

La Figura 12 muestra el efecto de CD tratadas con medio solo, IL-B50, IL-7 y CD40-ligando sobre la expansión de linfocitos T CD8.

La Figura 13 compara la expresión de perforina por linfocitos T CD8 sin tratamiento previo humanos inducidos por CD tratadas con medio solo, IL-B50 o CD40-ligando.

Las Figuras 14A-14C muestran los resultados de una comparación de IL-B50 con GM-CSF, IL-7, CD40-ligando (CD40L) y medio solo como control, para estimular CD humanas para producir ARNm para diversas citocinas y quimiocinas. La Figura 14A muestra los efectos sobre IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40 y TNF- α . La Figura 14B muestra los efectos sobre TARC, MDC y MIP3- β . La Figura 14C muestra los efectos sobre MCP-1, MCP-4, Rantes y MIG.

La Figura 15 muestra el efecto de IL-B50 sobre la inducción de proteína IL12p75.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

RESUMEN

I. General

II. Actividades

III. Ácidos nucleicos

A. fragmentos codificantes, secuencia, sondas

B. mutaciones, quimeras, fusiones

C. preparación de ácidos nucleicos

D. vectores, células que comprenden

IV. Proteínas, péptidos

A. fragmentos, secuencia, inmunógenos, antígenos

B. muteínas

C. agonistas/antagonistas, equivalentes funcionales

D. preparación de proteínas

V. Preparación de ácidos nucleicos, proteínas

VI. Anticuerpos

A. policlonales

B. monoclonales, Kd

C. anticuerpos antiidiotípicos

D. líneas celulares de hibridoma

VII. Kits y procedimientos para cuantificar ligando/receptor

A. ELISA

B. ensayo ARNm codificante

C. cualitativos/cuantitativos

D. kits

VIII. Composiciones terapéuticas, procedimientos

A. composiciones de combinación

B. dosis unitarias

C. administración

5 IX. Receptores

I. General

Como se usa en el presente documento, que incluye las reivindicaciones adjuntas, formas en singular de palabras tales como “un”, “una”, “el” y “la” incluyen sus correspondientes referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a “un organismo” incluye uno o más organismos diferentes, referencia a “una célula” incluye una o más de tales células, y referencia a “un procedimiento” incluye referencia a etapas y procedimientos equivalentes conocidos para un experto habitual en la materia, etc.

A menos que se defina de otro modo, términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque procedimientos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento puedan usarse en la práctica o prueba de la presente invención, procedimientos adecuados y materiales se describen más adelante. Las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias tratadas anteriormente se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tenga derecho a anteceder cualquier divulgación tal en virtud de su invención anterior.

La presente invención se basa en el descubrimiento de las subunidades de receptor para la citocina IL-B50. Esto permite la ventajosa coproducción de las subunidades en vectores, producción de proteínas de fusión y preparaciones de anticuerpo que reconocen epítopes que resultan de la interacción de los componentes de subunidad en una unidad funcional.

La biología de IL-7 está razonablemente bien descrita. Véanse, por ejemplo, Stoddart y col. (2000) Immunol. Rev. 175:47-58; Puel y Leonard (2000) Curr. Opin. Immunol. 12:468-473; Akashi y col. (2000) Curr. Opin. Immunol. 12:144-150; Watanabe y col. (1999) Immunol. Res. 20:251-259; Waldmann (2000) Ann. Oncol. 11 Suppl 1:101-106; Beverley y Grubeck-Loebenstein (2000) Vaccine 18:1721-1724; Aspinall y Andrew (2000) Vaccine 18:1629-1637; Appasamy (1999) Cytokines Cell Mol. Ther. 5:25-39; Hofmeister y col. (1999) Cytokine Growth Factor Rev. 10:41-60; Or y col. (1998) Cytokines Cell Mol. Ther. 4:287-294; Akashi y col. (1998) Immunol. Rev. 165:13-28; y Offner y Plum (1998) Leuk. Lymphoma 30:87-99. Además, como el receptor de IL-7 y el receptor de IL-B50 comparten una subunidad, las rutas de señalización y la biología deberían solaparse significativamente. Esto es similar a la familia de GM/IL-3/IL-5, que es uno de los primeros grupos cuyas biologías de solapamiento se explicaron por compartir subunidades de receptor.

Adicionalmente, el reconocimiento de las subunidades de receptor proporciona la oportunidad de determinar tipos de células y etapas de desarrollo en las que los componentes de receptores funcionales se expresan coordinadamente. Esto proporciona la oportunidad de determinar qué tipos de células es probable que respondan a ligando, y las funciones biológicas resultantes mediadas por aquellas células proporcionan sugerencias en cuanto a los efectos fisiológicos mediados por el ligando. Esto conduce a un mejor entendimiento de usos terapéuticos del ligando o bloqueo de la interacción y señalización ligando:receptor.

Algunos de los procedimientos convencionales aplicables se describen o citan, por ejemplo, en Maniatis y col. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2ª ed.), vol. 1-3, CSH Press, NY; Ausubel y col., Biology, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; o Ausubel y col. (1987 y suplementos periódicos) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, Nueva York; cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Véase también el documento USSN 09/130.972, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Un nucleótido completo (SEC ID N°: 1) y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N°: 2) de un segmento que codifica IL-7R α de primate, por ejemplo, humana, se muestra en la Figura 1; de manera similar para R β 2 en la Figura 2. La Figura 3 proporciona la secuencia de IL-B50 de primate, por ejemplo, humana. Véase el documento USSN 09/399.492.

Para la subunidad IL-7R α , características predichas notables incluyen, por ejemplo, sitios de fosforilación de CK2 en, por ejemplo, S24-E27, T47-E50, S187-D190, S214-E217, S255-D258, S282-D285, S355-D358 y S423-E426; motivo peroxisómico en, por ejemplo, S133-L135; sitios de fosforilación de PKC en, por ejemplo, T76-K78, T97-K99, S165-K167, S315-K317, S364-R366 y S373-K375; motivo de cyt2 de receptor en, por ejemplo, G195-5201; motivo de cAMP cinasa

en, por ejemplo, f342-S346; motivo de cAMP cinasa en, por ejemplo, R343-S346 o R343-L367; motivos de GSK3 en, por ejemplo, T129-S133, S201-Y205, T208-n212, S324-p330, T337-f341, S363-S367 y T413-S417; sitios de N-glucosilación en, por ejemplo, N29-S31, N45-T47, N131-S133, N162-S164, N212-5214, N213-S215, N275-S277, N353-5355 y N392-T394; motivo de tirosina cinasa en, por ejemplo, E14-Y18; sitios de cAMP PK en, por ejemplo, K94-T97, K84-S87, R343-S346, sitios de fosf de Cas en, por ejemplo, T208-K210, S215-E217, T262-E264, S331-D333, T337-E339 y S367-D369; sitios de me de cyt C en, por ejemplo, T76-F79, C98-I101, Q136-Y139, W244-R247, H259-T261 y C267-P270; sitios de metilación de histona en, por ejemplo, F85-L88, Q172-L175 y P270-N273; sitios de miristoílo en, por ejemplo, G322-S326, G352-A256 y G389-5392; sitios de Phos2 en, por ejemplo, K184/S187, R343/S345, R343/S346 y R371/5373; y sitios de fosf de PKC en, por ejemplo, T76-K78, T97-K99, S165-K167, S315-K317, S364-R366 y S373-K375.

Regiones de interés particular de la secuencia de Rδ2 incluyen predicciones de, por ejemplo, sitios de fosforilación de CK2 en, por ejemplo, T115-D118, S120-D123, S132-D135, S140-E143, S242-D245, S284-E287 y T297-E300; motivos de localización peroxisómica en, por ejemplo, S218-F220 y A272-L274; sitios de fosforilación de PKC en, por ejemplo, S76-R78, S99-K101 y S300-R302; sitios de fosforilación de tyr en, por ejemplo, R39/D43/Y46 y K166/E169/Y172; sitios de cAMP cinasa en, por ejemplo, i77-T81 y R78-T82; sitio de Ca++ cinasa en, por ejemplo, R78-h82; sitios de GSK3 en, por ejemplo, T23-S27, S99-v103, T113-S117, S132-t136, T136-S140, T199-p203, T201-p205, T297-S301 y S301-1305; sitios de SigPase en, por ejemplo, A195-A197 y A278-A280; sitio de Tyr cinasa en, por ejemplo, D70-Y74; sitios de cAMP PK en, por ejemplo, R78-T81, K96-S99, K157-S160 y K312-S315; sitios de Ca++ fosfatasa en, por ejemplo, T149-E151 y T309-E311; sitio de Me de cyt C en, por ejemplo, V235-F238; sitios miristoílo en, por ejemplo, F3-G7 y G329-T333; sitios de N-glucosilación en, por ejemplo, N25-S27, N33-T35, N79-T81 y N147-T149; sitios de phos2 en, por ejemplo, K28/S30, K96/S98, K96/S99, R104/S106, K206/S208 y K312/S315; sitios de fosforilación de PKC en, por ejemplo, S76-R78, S99-K101 y S301-R303; sitios de SPKK en, por ejemplo, S99-h103 y S301-m303; y sitios de Tyr cinasa en, por ejemplo, R39-Y46.

En la secuencia de IL-B50, la región de K97-K103 es conocida por someterse a proteólisis, y las mutaciones pueden elegir como diana esa región para proteger el ligando de la degradación proteolítica. Así, las propiedades farmacocinéticas del ligando pueden modificarse, especialmente para las indicaciones descritas en el presente documento.

Segmentos con límites adyacentes a estas posiciones serán particularmente útiles, ya que serán polinucleótidos que codifican tales segmentos. La mutagénesis en estas regiones se usará para determinar la relación estructura-actividad, particularmente con el receptor, como se proporciona en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "IL-7Rα de primate" debe usarse para describir una proteína que comprende un segmento de proteína o péptido que tiene o comparte la secuencia de aminoácidos mostrada en las Figuras 1A-1E (SEC ID N°: 2), o un fragmento sustancial de la misma; pero distinto de secuencias de roedor. La divulgación también incluye variaciones de proteína del alelo de IL-7Rα cuya secuencia se proporciona, por ejemplo, un agonista o antagonista de muteína. Normalmente, tales agonistas o antagonistas presentarán menos de aproximadamente el 10 % de diferencias de secuencia, y así frecuentemente tendrán entre 1 y 11 veces de sustituciones, por ejemplo, 2, 3, 5, 7 veces, y otros. También engloba variantes alélicas y otras variantes, por ejemplo, variantes polimórficas naturales, de la proteína descrita. "Natural" como se usa en el presente documento significa sin modificar por arteificio, encontrado, por ejemplo, en fuentes naturales. Normalmente, se unirá, cuando es en un complejo de receptor funcional, a un ligando con alta afinidad, por ejemplo, al menos aproximadamente 100 nM, normalmente mejor que aproximadamente 30 nM, preferentemente mejor que aproximadamente 10 nM, y más preferentemente mejor que aproximadamente 3 nM. El término también debe usarse en el presente documento para referirse a formas que se producen de modo natural relacionadas, por ejemplo, alelos, variantes polimórficas y variantes metabólicas de la proteína de primate. Significados correspondientes se aplican a usos de términos relacionados con las secuencias de Rδ2.

Esta divulgación también engloba proteínas o péptidos que tienen homología de secuencias de aminoácidos con combinaciones de secuencias de aminoácidos presentadas en las Figuras 1 y 2. En particular, incluirá construcciones o proteínas de fusión que comprenden segmentos de ambas secuencias proporcionadas.

Un "fragmento" o "segmento" de polipéptido sustancial es un estiramiento de residuos de aminoácidos de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, generalmente al menos 10 aminoácidos, más generalmente al menos 12 aminoácidos, frecuentemente al menos 14 aminoácidos, más frecuentemente al menos 16 aminoácidos, normalmente al menos 18 aminoácidos, más normalmente al menos 20 aminoácidos, normalmente al menos 22 aminoácidos, más normalmente al menos 24 aminoácidos, preferentemente al menos 26 aminoácidos, más preferentemente al menos 28 aminoácidos y, en particularmente realizaciones preferidas, al menos aproximadamente 30 o más aminoácidos. Secuencias de segmentos de diferentes proteínas pueden compararse entre sí con respecto a estiramientos de longitud apropiada.

La homología de secuencias de aminoácidos, o identidad de secuencias, se determina optimizando coincidencias de residuos, si fuera necesario, introduciendo huecos según se requiera. Véanse, por ejemplo, Needleham y col., (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453; Sankoff y col., (1983) capítulo uno en Time Warps, String Edits, y Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison, Addison-Wesley, Reading, MA; y paquetes de software de IntelliGenetics, Mountain

View, CA; y Grupo informático de genética (GCG) de la Universidad de Wisconsin, Madison, WI; cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Esto cambia cuando se consideran sustituciones conservativas como coincidencias. Las sustituciones conservativas normalmente incluyen sustituciones con los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. Está previsto que secuencias de aminoácidos homólogas incluyan variaciones alélicas naturales y entre especies en la secuencia de citocinas. Proteínas o péptidos homólogos típicos tendrán del 50-100 % de homología (si pueden introducirse huecos) al 60-100 % de homología (si están incluidas sustituciones conservativas) con un segmento de secuencia de aminoácidos de las Figuras 1 ó 2. La medición de la homología será al menos aproximadamente el 70 %, generalmente al menos el 76 %, más generalmente al menos el 81 %, frecuentemente al menos el 85 %, más frecuentemente al menos el 88 %, normalmente al menos el 90 %, más normalmente al menos el 92 %, normalmente al menos el 94 %, más normalmente al menos el 95 %, preferentemente al menos el 96 % y más preferentemente al menos el 97 %, y en realizaciones particularmente preferidas al menos el 98 % o más. El grado de homología variará con la longitud de los segmentos comparados. Proteínas o péptidos homólogos, tales como las variantes alélicas, compartirán la mayoría de las actividades biológicas con las realizaciones mostradas en las Figuras 1 y 2. Como se usa en el presente documento, el término "actividad biológica" se usa para describir, sin limitación, efectos sobre la proliferación de células inmunitarias u otras, diferenciación, inducción de citocinas o quimiocinas (por ejemplo, TARC, PARC, MDC, MIP3-b, etc.), efectos sobre la transducción de señales mediada por STAT3 y/o STAT5, efectos de presentación de antígeno, cambios en la expresión de moléculas de la superficie celular y actividades específicas para Th2.

Los términos ligando, agonista, antagonista y análogo de estos receptores, particularmente el complejo funcional, incluyen moléculas que modulan las respuestas celulares características a la IL-B50, además de moléculas que poseen las características de competencia de unión estructural más convencionales de interacciones ligando-receptor, por ejemplo, cuando el receptor es un receptor natural o un anticuerpo. Las respuestas celulares probablemente están mediadas por la unión de IL-B50 a receptores celulares, como se ha descrito. Por tanto, un ligando es una molécula que sirve tanto de ligando natural al que dicho receptor, o un análogo del mismo, se une, como de una molécula que es un análogo funcional del ligando natural. El análogo funcional puede ser un ligando con modificaciones estructurales, o puede ser una molécula completamente sin relacionar que tiene una forma molecular que interacciona con los determinantes de unión a ligando apropiados. Los ligandos pueden servir de agonistas o antagonistas, véase, por ejemplo, Goodman y col. (eds.) (1990) Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, Pergamon Press, Nueva York.

El diseño racional de fármacos también puede basarse en estudios estructurales de las formas moleculares de un receptor o anticuerpo y otros efectores o ligandos. Los efectores pueden ser otras proteínas que median en otras funciones en respuesta a unión a ligando, u otras proteínas que normalmente interaccionan con el receptor. Un medio para determinar qué sitios interaccionan con otras proteínas específicas es una determinación de estructura física, por ejemplo, técnicas de cristalografía por rayos X o RMN bidimensional. Éstas proporcionarán orientación en cuanto a qué residuos de aminoácidos forman regiones de contacto molecular. Para una descripción detallada de la determinación estructural de proteínas véase, por ejemplo, Blundell y Johnson (1976) Protein Crystallography, Academic Press, Nueva York.

II. Actividades

Las proteínas IL-B50 tienen varias actividades biológicas diferentes basadas en la coexpresión de IL-7R α y R δ 2, por ejemplo, en el sistema inmunitario, e incluyen funciones proliferativas, de desarrollo o fisiológicas, en particular de células de linaje linfóide, por ejemplo, macrófagos o células dendríticas. Las proteínas IL-B50 son homólogas a otras proteínas de la familia del ligando IL-7, pero cada una tiene diferencias estructurales. Por ejemplo, IL-B50 humana muestra el 43 % de identidad de secuencias de aminoácidos con TSLP de ratón. Adicionalmente, la subunidad de receptor humano R δ 2 muestra el 39 % de identidad de secuencias de aminoácidos con TSLPR de ratón.

La molécula IL-B50 de ratón tiene la capacidad para estimular la producción de TARC y diversas citocinas específicas para Th2. La ruta de señalización parece usar STAT3 y/o STAT5, y envía señales de proliferación o diferenciación. La diferenciación tiende a producir limitación de la proliferación, y viceversa. La diferenciación normalmente produce cambios en la expresión de marcadores de la superficie celular.

Como se muestra en el presente documento, IL-B50 humana mejora la supervivencia de células dendríticas en cultivos, regula por incremento la expresión de moléculas coestimulantes y moléculas de adhesión, que incluyen HLA-DR, CD40, CD80, CD86, CD11a, CD18 y CD83, induce células dendríticas a que produzcan las quimiocinas TARC, PARC y MDC, y promueve fuertemente la capacidad de células dendríticas para inducir linfocitos T sin tratamiento previo a que proliferen y produzcan citocinas IL-4, IL-13 y TNF-alfa. Adicionalmente, IL-B50 tiene un efecto sinérgico con CD40-ligando y LPS en células dendríticas activadas para regular por crecimiento las moléculas coestimulantes CD40, CD80 y CD86. IL-B50 también potencia fuertemente la producción de IL-12 inducida por CD40-ligando por células dendríticas.

TARC, PARC y MDC son todos en particular ligandos para CCR4, un receptor de quimiocina predominantemente

encontrado en linfocitos de tipo Th2. Así, IL-B50 puede activar células mieloides tales como monocitos para liberar quimiocinas que pueden atraer células efectoras con un fenotipo Th2. Como se muestra en los ejemplos más adelante, la expresión de TARC inducida por IL-B50 fue muy fuerte en el subconjunto CD11c+ de CD. Este subconjunto, que representa menos del 1 % de células mononucleares en la sangre, normalmente se diferencia en CD maduras en respuesta a estímulos inflamatorios. La expresión de TARC en estas células estuvo acompañada de una espectacular potenciación de su maduración como se demuestra por la fuerte inducción de las moléculas coestimulantes CD40 y CD80. Estos resultados indican que este subconjunto de CD estimulado con IL-B50 podría ser un potente inductor de respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T primarios. De hecho, CD CD11+ cultivadas en presencia de IL-B50 son mucho más potentes en su capacidad para provocar la proliferación de linfocitos T sin tratamiento previo con respecto a CD cultivadas en medio.

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno profesionales que pueden inducir respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T específicos para antígeno primarios. Las células dendríticas desempeñan una función crítica en iniciar respuestas inmunitarias contra tumores y microorganismos infecciosos. Las células dendríticas también participan en enfermedades autoinmunitarias, enfermedades alérgicas, enfermedad de injerto frente a huésped y rechazo de trasplantes de órganos sólidos. Por tanto, el potenciamiento del funcionamiento de células dendríticas permite el tratamiento de tumores y enfermedades infecciosas. De manera similar, el bloqueo del funcionamiento de células dendríticas proporciona terapias para enfermedades autoinmunitarias, enfermedades alérgicas, enfermedades de injerto frente a huésped y rechazo asociado a trasplante.

Así, IL-B50 puede usarse en potenciar el funcionamiento de células dendríticas en el tratamiento de cánceres y enfermedades infecciosas y pueden usarse antagonistas de IL-B50 en el bloqueo del funcionamiento de células dendríticas en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, enfermedades alérgicas, enfermedades de injerto frente a huésped y rechazo asociado a trasplante. Por tanto, la elucidación de subunidades del receptor de IL-B50 permite la identificación de agonistas y antagonistas de ILB-50 para su uso en el tratamiento de las enfermedades anteriormente mencionadas.

La presente divulgación también describe nuevos ensayos para actividades descritas para estas moléculas. Actividades correspondientes deben encontrarse en otros sistemas de mamífero, que incluyen primates. Las nuevas moléculas similares a IL-7 producidas por medios recombinantes presentan una actividad biológica de modular células de linaje linfóide. Además, hay probabilidad sustancial de sinergia con otros agonistas o antagonistas relacionados con IL-7. Es probable que los receptores, que se espera que incluyan múltiples cadenas de polipéptidos diferentes, presenten especificidad por especie por sus ligandos correspondientes.

III. Ácidos nucleicos

Esta divulgación contempla el uso de ácido nucleico aislado o fragmentos, por ejemplo, que codifican estas proteínas o proteínas estrechamente relacionadas, o fragmentos de las mismas, por ejemplo, proteínas de fusión o construcciones de expresión coordinadamente expresadas o de combinación.

El término "ácido nucleico aislado o fragmentos" como se usa en el presente documento significa un ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN, que no es inmediatamente contigua a secuencias presentes en el genoma que se producen de modo natural del organismo del que se deriva. Así, el término describe, por ejemplo, un ácido nucleico que se incorpora en un vector, tal como un plásmido o vector viral; un ácido nucleico que se incorpora en el genoma de una célula heteróloga (o el genoma de célula homóloga, pero en un sitio diferente de en el que normalmente se produce); y un ácido nucleico que existe como una molécula separada, por ejemplo, un fragmento de ADN producido por amplificación por PCR o digestión con enzima de restricción, o una molécula de ARN producida por transcripción *in vitro*. El término también describe un ácido nucleico recombinante (por ejemplo, genéticamente manipulado) que forma parte de un gen híbrido que codifica secuencias de polipéptidos adicionales que pueden usarse, por ejemplo, en la producción de una proteína de fusión. Además, esta divulgación expresa cualquier molécula de ácido nucleico manipulada o creada por arteificio que codifique una proteína o polipéptido biológicamente activo que tiene actividad de receptor de IL-B50 característica. Normalmente, el ácido nucleico puede hibridarse bajo condiciones apropiadas con los segmentos de secuencias de ácidos nucleicos mostrados en las Figuras 1 y 2. Además, esta divulgación cubre el uso de ácido nucleico aislado o recombinante, o fragmentos del mismo, que codifica proteínas que tienen fragmentos que son homólogos a las proteínas del complejo de receptor recientemente desvelado. Los ácidos nucleicos aislados pueden tener las secuencias reguladoras respectivas en los flancos 5' y 3', por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de adición de poli-A, y otras del gen natural.

Un ácido nucleico "aislado" es un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, ADN o un polímero mixto, que es sustancialmente puro, por ejemplo, está separado de otros componentes que de modo natural acompañan a una secuencia nativa, tal como ribosomas, polimerasas y secuencias genómicas flanqueantes de las especies originarias. El término engloba una secuencia de ácidos nucleicos que ha sido eliminado de su entorno que se produce de modo natural, e incluye cepas aisladas de ADN recombinante o clonado que así son distinguibles de composiciones que se producen de modo natural, y

análogos químicamente sintetizados o análogos biológicamente sintetizados por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula, tanto completa como sustancialmente puras.

Un ácido nucleico aislado será generalmente una composición homogénea de moléculas, pero, en algunas realizaciones, contendrá heterogeneidad, preferentemente menor. Esta heterogeneidad se encuentra normalmente en los extremos o porciones del polímero no críticos para una función o actividad biológica deseada.

Un ácido nucleico "recombinante" se define tanto por su procedimiento de producción como su estructura. En referencia a su procedimiento de producción, por ejemplo, un producto preparado mediante un procedimiento, el procedimiento es el uso de técnicas de ácido nucleico recombinante, por ejemplo, que implican intervención humana en la secuencia de nucleótidos. Normalmente, esta intervención implica manipulación *in vitro*, aunque en ciertas circunstancias puede implicar técnicas de cría de animales más clásicas. Alternativamente, puede ser un ácido nucleico preparado generando una secuencia que comprende la fusión de dos fragmentos que de modo natural no son contiguos entre sí, pero se indica que excluye productos de la naturaleza, por ejemplo, mutantes que se producen de modo natural como se encuentran en su estado natural. Así, por ejemplo, se engloban productos hechos transformando células con cualquier vector que se produce no de modo natural, ya que son ácidos nucleicos que comprenden secuencia derivada usando cualquier procedimiento de oligonucleótidos sintético. Un procedimiento tal se hace frecuentemente para sustituir un codón con un codón redundante que codifica el mismo aminoácido o un aminoácido conservativo, mientras que normalmente se introduce o elimina un sitio de reconocimiento de secuencias de enzimas de restricción. Alternativamente, el procedimiento se realiza para unir juntos segmentos de ácidos nucleicos de funciones deseadas para generar una única entidad genética que comprende una combinación deseada de funciones no encontradas en las formas naturales comúnmente disponibles, por ejemplo, que codifica una proteína de fusión. Los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción son frecuentemente la diana de tales manipulaciones artificiales, pero otras dianas específicas para sitio, por ejemplo, promotores, sitios de replicación de ADN, secuencias de regulación, secuencias de control, u otras características útiles, pueden incorporarse por diseño. Está previsto un concepto similar para un polipéptido recombinante, por ejemplo, de fusión. Esto incluirá una repetición dimérica. Específicamente se incluyen ácidos nucleicos sintéticos que, por redundancia del código genético, codifican polipéptidos de combinación similares a fragmentos de las subunidades de receptor y fusiones de secuencias de diversos receptores diferentes o moléculas relacionadas, por ejemplo, factores de crecimiento.

Un "fragmento" en un contexto de ácidos nucleicos es un segmento contiguo de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente al menos 21 nucleótidos, más generalmente al menos 25 nucleótidos, generalmente al menos 30 nucleótidos, más generalmente al menos 35 nucleótidos, frecuentemente al menos 39 nucleótidos, más frecuentemente al menos 45 nucleótidos, normalmente al menos 50 nucleótidos, más normalmente al menos 55 nucleótidos, normalmente al menos 60 nucleótidos, más normalmente al menos 66 nucleótidos, preferentemente al menos 72 nucleótidos, más preferentemente al menos 79 nucleótidos, y en realizaciones particularmente preferidas tendrán al menos 85 o más nucleótidos que incluyen, por ejemplo, 100, 150, 200, 250, etc. Normalmente, fragmentos de diferentes secuencias genéticas pueden compararse entre sí con respecto a alargamientos de longitud apropiada, particularmente segmentos definidos tales como los dominios descritos más adelante.

Un ácido nucleico que codifica un complejo de receptor de IL-B50 será particularmente útil para identificar genes, especies de ARNm y ADNc que se codifican a sí mismas o proteínas estrechamente relacionadas, además de ADN que codifican variantes polimórficas, alélicas u otras genéticas, por ejemplo, de diferentes individuos o especies relacionadas. Sondas preferidas para tales cribados son aquellas regiones de la interleucina que están conservadas entre diferentes variantes polimórficas o que contienen nucleótidos que carecen de especificidad, y preferentemente serán de longitud completa o casi. En otras situaciones, secuencias específicas de variantes polimórficas serán más útiles.

Esta divulgación cubre adicionalmente moléculas de ácido nucleico recombinantes y fragmentos que tienen una secuencia de ácidos nucleicos idéntica a o altamente homóloga al ADN aislado expuesto en el presente documento. En particular, las secuencias estarán frecuentemente operativamente ligadas a segmentos de ADN que controlan la transcripción, traducción y replicación de ADN. Estos segmentos adicionales normalmente ayudan en la expresión del segmento de ácido nucleico deseado.

Secuencias de ácidos nucleicos homólogas, cuando se comparan entre sí o con las secuencias mostradas en las Figuras 1 ó 2, presentan similitud significativa. Los patrones de homología en ácidos nucleicos son cualquier medida de homología generalmente usada en la materia por comparación de secuencias o basada en condiciones de hibridación. Condiciones de hibridación comparativas se describen en mayor detalle más adelante.

Identidad sustancial en el contexto de la comparación de secuencias de ácidos nucleicos significa que cualquiera de los segmentos, o sus hebras complementarias, cuando se comparan, son idénticos cuando están óptimamente alineados, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiados, en al menos aproximadamente el 60 % de los nucleótidos, generalmente al menos el 66 %, generalmente al menos el 71 %, frecuentemente al menos el 76 %, más frecuentemente al menos el 80 %, normalmente al menos el 84 %, más normalmente al menos el 88 %, normalmente al menos el 91 %, o más.

más normalmente al menos aproximadamente el 93 %, preferentemente al menos aproximadamente el 95 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 96 al 98 % o más, y en realizaciones particulares, hasta, por ejemplo, el 99 % o más de los nucleótidos, que incluyen, por ejemplo, segmentos que codifican dominios estructurales tales como los segmentos descritos más adelante. Alternativamente, existirá identidad sustancial cuando los segmentos se hibriden bajo condiciones de hibridación selectivas con una hebra o su complemento, normalmente usando una secuencia derivada de las secuencias representadas en las Figuras 1 y 2. Normalmente, se producirá hibridación selectiva cuando haya al menos aproximadamente el 55 % de homología sobre un estiramiento de al menos aproximadamente 14 nucleótidos, más normalmente al menos aproximadamente el 65 %, preferentemente al menos aproximadamente el 75 %, y más preferentemente al menos aproximadamente el 90 %. Véanse, Kanehisa (1984) Nuc. Acids Res. 12:203-213. La longitud de comparación por homología, como se describe, puede ser sobre estiramientos más largos, y en ciertas realizaciones será sobre un estiramiento de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente al menos aproximadamente 20 nucleótidos, generalmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente 32 nucleótidos, más normalmente al menos aproximadamente 40 nucleótidos, preferentemente al menos aproximadamente 50 nucleótidos, y más preferentemente al menos aproximadamente 75 a 100 o más nucleótidos.

Condiciones rigurosas, con referencia a la homología en el contexto de hibridación, serán condiciones combinadas rigurosas de sal, temperatura, disolventes orgánicos y otros parámetros normalmente controlados en reacciones de hibridación. Condiciones de temperatura rigurosas incluirán normalmente temperaturas superiores a aproximadamente 30 °C, más normalmente superiores a aproximadamente 37 °C, normalmente superiores a aproximadamente 45 °C, más normalmente superiores a aproximadamente 55 °C, preferentemente superiores a aproximadamente 65 °C, y más preferentemente superiores a aproximadamente 70 °C. Condiciones de sal rigurosas serán generalmente inferiores a aproximadamente 500 mM, normalmente inferiores a aproximadamente 400 mM, más normalmente inferiores a aproximadamente 300 mM, normalmente inferiores a aproximadamente 200 mM, preferentemente inferiores a aproximadamente 100 mM, y más preferentemente inferiores a aproximadamente 80 mM, incluso hasta inferiores a aproximadamente 20 mM. Pueden añadirse ciertos detergentes o reactivos desestabilizantes, por ejemplo, formamida al 50 %, etc. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medida de cualquier parámetro individual. Véase, por ejemplo, Wetmur y Davidson (1968) J. Mol. Biol. 31:349-370.

El ADN aislado puede modificarse fácilmente por sustituciones de nucleótidos, deleciones de nucleótidos, inserciones de nucleótidos e inversiones de estiramientos de nucleótidos. Estas modificaciones producen secuencias de ADN novedosas que codifican esta proteína o sus derivados. Estas secuencias modificadas pueden usarse para producir proteínas mutantes (muteínas) o para potenciar la expresión de especies de variante. La expresión potenciada puede implicar amplificación génica, elevada transcripción, elevada traducción, y otros mecanismos. Tales derivados similares a receptores mutantes incluyen mutaciones predeterminadas o específicas para sitio de la proteína o sus fragmentos, que incluyen mutaciones silenciosas usando degeneración del código genético. "Receptor de IL-B50 mutante" como se usa en el presente documento engloba un polipéptido que de otro modo se encuentra dentro de la definición de homología del receptor como se expone anteriormente, pero que tiene una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la de otras proteínas similares a receptor de IL-7 como se encuentra en la naturaleza, tanto si es a modo de deleción, sustitución como de inserción. En particular, "receptor de IL-B50 mutante específico para sitio" engloba una proteína que tiene homología sustancial con una proteína mostrada en las Figuras 1 y 2, y normalmente comparte la mayoría de las actividades biológicas de la forma desvelada en el presente documento.

Aunque los sitios de mutación específicos para sitio están predeterminados, los mutantes no necesitan ser específicos para sitio. La mutagénesis de receptores IL-B50 de mamífero puede lograrse haciendo inserciones o deleciones de aminoácidos en el gen, acoplado con expresión. Pueden generarse sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación para llevar a una construcción final. Las inserciones incluyen fusiones del extremo amino o carboxi. La mutagénesis al azar puede realizarse en un codón diana y los mutantes de receptores de IL-B50 de mamífero expresado pueden entonces cribarse para la actividad deseada. Los procedimientos para hacer mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene una secuencia conocida son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por mutagénesis del cebador M13. Véase también Sambrook y col. (1989) y Ausubel y col. (1987 y suplementos periódicos).

Las mutaciones en el ADN normalmente no deben sacar secuencias codificantes fuera de marcos de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que pudieran hibridarse para producir estructura de ARNm secundaria tal como bucles u horquillas.

El procedimiento de fosforamido descrito por Beaucage y Carruthers (1981) Tetra. Letts. 22:1859-1862, producirá fragmentos de ADN sintéticos adecuados. Un fragmento bicatenario se obtendrá frecuentemente tanto sintetizando la hebra complementaria como hibridando las hebras juntas bajo condiciones apropiadas o añadiendo la hebra complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia de cebador apropiada.

Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden aplicarse frecuentemente en mutagénesis. Alternativamente, los cebadores de mutagénesis son procedimientos comúnmente usados para generar mutaciones

definidas en sitios predeterminados. Véase, por ejemplo, Innis y col. (eds. 1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego, CA; y Dieffenbach y Dveksler (eds. 1995) PCR Primer: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, CSH, NY.

IV. Proteínas, péptidos

- 5 Como se ha descrito anteriormente, la presente divulgación engloba receptor de IL-B50 de primate, por ejemplo, cuyas secuencias se desvelan en las Figuras 1 y 2, y se ha descrito anteriormente. También se contemplan variantes alélicas y otras variantes que incluyen, por ejemplo, porciones que combinan proteínas de fusión de tales secuencias con otras, que incluyen marcas de epítopes y dominios funcionales.

- 10 La presente divulgación también proporciona proteínas recombinantes, por ejemplo, proteínas de fusión heterólogas usando segmentos de estas proteínas de primate. Una proteína de fusión heteróloga es una fusión de proteínas o segmentos que de modo natural no están normalmente fusionados del mismo modo. Así, el producto de fusión de un receptor de factor de crecimiento con un receptor de citocina es una molécula de proteína continua que tiene secuencias fusionadas en un enlace peptídico típico, normalmente hechas como un único producto de traducción y que presentan propiedades, por ejemplo, antigenicidad, derivadas de cada péptido fuente. Un concepto similar se aplica a secuencias de
15 ácidos nucleicos heterólogos.

- Además, pueden prepararse nuevas construcciones a partir de la combinación de dominios funcionales o estructurales similares de otras proteínas relacionadas, por ejemplo, factores de crecimiento u otras citocinas. Por ejemplo, pueden "permutarse" segmentos de unión a receptor u otros segmentos entre diferentes polipéptidos o fragmentos de fusión nuevos. Véanse, por ejemplo, Cunningham y col. (1989) Science 243:1330-1336; y O'Dowd y col. (1988) J. Biol. Chem.
20 263:15985-15992. Así, nuevos polipéptidos quiméricos que presentan nuevas combinaciones de especificidades resultarán del enlace funcional de especificidades de unión a receptor. Por ejemplo, los dominios de unión a ligando de otras moléculas de receptor relacionadas pueden añadirse o sustituirse con otros dominios de estas proteínas o proteínas relacionadas. La proteína resultante tendrá frecuentemente función y propiedades híbridas. Por ejemplo, una proteína de fusión puede incluir un epítipo de marca que puede servir para proporcionar localización diagnóstica de la proteína de
25 fusión para histología u otros procedimientos.

Componentes y secuencias de fusión candidatos pueden seleccionarse de diversas bases de datos de secuencias, por ejemplo, GenBank, a cargo de IntelliGenetics, Mountain View, CA; y BCG, Grupo informático de biotecnología de la Universidad de Wisconsin, Madison, WI.

- 30 "Derivados" del receptor de IL-B50 de mamífero incluyen mutantes de secuencias de aminoácidos, variantes de glucosilación, derivados metabólicos y conjugados covalentes o de agregación con otros restos químicos. Los derivados covalentes pueden prepararse por enlace de funcionalidades con grupos que se encuentran en las cadenas laterales de aminoácidos de receptores de IL-B50 o en los extremos N o C, por ejemplo, por medios que son muy conocidos en la técnica. Estos derivados pueden incluir, sin limitación, ésteres o amidas alifáticos del extremo carboxilo, o de residuos que contienen cadenas laterales de carboxilo, derivados de O-acilo de residuos que contienen grupos hidroxilo, y derivados de
35 N-acilo de los residuos que contienen aminoácidos o grupos amino del extremo, por ejemplo, lisina o arginina. Los grupos acilo se seleccionan del grupo de restos alquilo que incluyen alquilo C₃ a C₁₈ normal, formando así especies de alcanoilarioilo.

- En particular, están incluidas alteraciones de la glucosilación, por ejemplo, hechas modificando los patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento, o en etapas de procesamiento adicionales. Medios
40 particularmente preferidos para llevar a cabo esto son exponiendo el polipéptido a enzimas glucosilantes derivadas de células que normalmente proporcionan tal procesamiento, por ejemplo, enzimas de glucosilación de mamífero. También se contemplan enzimas de desglucosilación. También están englobadas versiones de la misma secuencia de aminoácidos primaria que tienen otras modificaciones menores, que incluyen residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

- 45 Un grupo principal de derivados son conjugados covalentes de la interleucina o fragmentos de los mismos con otras proteínas de polipéptidos. Estos derivados pueden sintetizarse en cultivo recombinante tal como fusiones del extremo N o C o por el uso de agentes conocidos en la técnica por su utilidad en proteínas de reticulación mediante grupos laterales reactivos. Sitios de derivatización preferidos con agentes de reticulación están en grupos amino libres, restos de hidrato de carbono y residuos de cisteína.

- 50 También se proporcionan polipéptidos de fusión entre los receptores y otras proteínas homólogas o heterólogas. Los polipéptidos homólogos pueden ser fusiones entre diferentes receptores, produciendo, por ejemplo, una proteína híbrida que presenta especificidad de unión por múltiples ligandos diferentes, o un receptor que puede tener especificidad ampliada o debilitada de unión a su ligando. Asimismo, pueden construirse fusiones heterólogas que presentarían una combinación de propiedades o actividades de las proteínas derivadas. Ejemplos típicos son fusiones de un polipéptido
55 indicador, por ejemplo, luciferasa, con un segmento o dominio de un receptor, por ejemplo, un segmento de unión a

ligando, de manera que la presencia o localización de un receptor deseado pudiera determinarse fácilmente. Véanse, por ejemplo, Dull y col., patente de EE.UU. nº 4.859.609. Otros componentes de fusión de genes incluyen glutatión-S-transferasa (GST), β -galactosidasa bacteriana, trpE, proteína A, β -lactamasa, alfa-amilasa, alcohol deshidrogenasa, factor de apareamiento de levadura alfa, u otros receptores de citocina. Véanse, por ejemplo, Godowski y col. (1988) Science 241:812-816.

El procedimiento de fosforamido descrito por Beaucage y Carruthers (1981) Tetra. Letts. 22:1859-1862, producirá fragmentos de ADN sintético adecuados. Frecuentemente se obtendrá un fragmento bicatenario tanto sintetizando la hebra complementaria como hibridando las hebras juntas bajo condiciones apropiadas como añadiendo la hebra complementaria usando ADN polimerasa con un secuencia de cebador apropiada.

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

Las proteínas de fusión se prepararán normalmente por tanto procedimientos de ácidos nucleicos recombinantes como por procedimientos de polipéptido sintéticos. Las técnicas para la manipulación y expresión de ácidos nucleicos se describen generalmente, por ejemplo, en Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, y Ausubel y col. (eds. 1987 y suplementos periódicos) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, Nueva York. Técnicas para la síntesis de polipéptidos se describen, por ejemplo, en Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2156; Merrifield (1986) Science 232: 341-347; y Atherton y col. (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford. Véase también Dawson y col. (1994) Science 266:776-779 para procedimientos para preparar polipéptidos más largos.

El término "sustancialmente purificado" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula, tal como un péptido, que está sustancialmente libre de otras proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos u otros materiales biológicos con los que está asociado de modo natural. Por ejemplo, una molécula sustancialmente pura, tal como un polipéptido, puede tener al menos el 60 %, en peso seco, de la molécula de interés. Un experto en la materia puede purificar complejos que comprenden las secuencias descritas usando procedimientos de purificación de proteínas convencionales y la pureza de los polipéptidos puede determinarse usando procedimientos convencionales que incluyen, por ejemplo, electroforesis en gel de poliácridamida (por ejemplo, SDS-PAGE), cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)) y análisis de secuencias de aminoácidos del extremo amino.

Los cambios en la secuencia de aminoácidos de los componentes de receptor del complejo se contemplan en la presente divulgación. IL-7R α o R δ 2 pueden alterarse cambiando la secuencia de ácidos nucleicos que codifica las proteínas. Preferentemente, solo se realizan alteraciones de aminoácidos conservativas usando aminoácidos que tienen las mismas propiedades o similares. Sustituciones de aminoácidos ilustrativas incluyen los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina, glutamina, o glutamato; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; valina a isoleucina o leucina.

Adicionalmente pueden usarse otras variantes y fragmentos de complejos de receptor. Las variantes incluyen análogos, homólogos, derivados, muteínas y miméticos de los complejos de receptor o fragmentos que retienen o potencian la capacidad para bloquear la unión entre IL-B50 y un receptor diana. Las variantes y fragmentos pueden generarse directamente a partir de secuencias proporcionadas por modificación química, por digestión proteolítica de enzimas, o por combinaciones de las mismas. Adicionalmente pueden emplearse técnicas de ingeniería genética, además de procedimientos de síntesis de polipéptidos directamente a partir de residuos de aminoácidos.

Los compuestos de no péptido que imitan la unión y función de IL-B50 ("miméticos") pueden producirse por el enfoque explicado resumidamente en Saragovi y col. (1991) Science 253:792-95. Los miméticos son moléculas que imitan elementos de la estructura secundaria de la proteína. Véanse, por ejemplo, Johnson y col., "Peptide Turn Mimetics", en Pezzuto y col. (eds. 1993) Biotechnology and Pharmacy, Chapman y Hall, Nueva York. El fundamento subyacente detrás del uso de miméticos de péptido es que el esqueleto peptídico de las proteínas existe principalmente para orientar cadenas laterales de aminoácidos de tal forma que se faciliten las interacciones moleculares. Miméticos apropiados pueden considerarse que son los propios equivalentes de IL-B50.

También pueden crearse variantes y fragmentos por técnicas recombinantes empleando procedimientos de clonación de ADN o ADNc. Pueden emplearse técnicas de mutagénesis específica para sitio y dirigida a región. Véanse, por ejemplo, vol. 1, Cap. 8 en Ausubel y col. (eds. 1989 y actualizaciones periódicas) Current Protocols in Molecular Biology Wiley and Sons; y Oxender and Fox (eds.) Protein Engineering Liss, Inc. Además, pueden emplearse técnicas de barrido de ligadores y mediadas por PCR para mutagénesis. Véanse, por ejemplo, Erlich (ed. 1989) PCR Technology Stockton

Press. Los enfoques de secuenciación, estructura y modelado de proteínas para su uso con cualquiera de las técnicas anteriores se desvelan, por ejemplo, en Oxender and Fox (eds.) Protein Engineering Liss, Inc; y Ausubel y col. (eds. 1989 y actualizaciones periódicas) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons.

La presente invención también contempla el uso de derivados de receptor de IL-B50 distintos de variaciones en la secuencia de aminoácidos o glucosilación. Tales derivados pueden implicar asociación covalente o agregativa con restos químicos. Estos derivados generalmente se clasifican en tres clases: (1) sales, (2) modificaciones covalentes de residuos de la cadena lateral y extremos, y (3) complejos de adsorción, por ejemplo, con membranas celulares. Tales derivados covalentes o agregativos son útiles como inmunógenos, como reactivos en inmunoensayos, en potenciar propiedades farmacocinéticas de la proteína, o en procedimientos de purificación tales como para purificación por afinidad de un receptor u otra molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo. Por ejemplo, un receptor de IL-B50 puede inmovilizarse por enlace covalente a un soporte sólido tal como SEPHAROSE activada por bromuro de cianógeno mediante procedimientos que son muy conocidos en la técnica, o adsorberse sobre superficies de poliolefina, con o sin reticulación de glutaraldehído, para su uso en el ensayo o purificación de receptor de IL-B50, anticuerpos u otras moléculas similares. La IL-B50 también puede marcarse con un grupo detectable, por ejemplo, radio-yodado por el procedimiento de cloramina T, covalentemente unido a quelatos de tierras raras o conjugado con otro resto fluorescente para su uso en ensayos diagnósticos.

Un complejo de receptor de esta divulgación puede usarse como inmunógeno para la producción de antisueros o anticuerpos específicos, por ejemplo, para el complejo que comprende ambos componentes de proteína. La interleucina purificada puede usarse para cribar anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno preparados por inmunización con diversas formas de preparaciones impuras que contienen la proteína. En particular, el término "anticuerpos" también engloba fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos naturales. La interleucina purificada también puede usarse como reactivo para detectar cualquier anticuerpo generado en respuesta a la presencia de niveles elevados de expresión, o trastornos inmunológicos que conducen a la producción de anticuerpos para la citocina endógena. Adicionalmente, los fragmentos de complejo de receptor también pueden servir de inmunógenos para producir anticuerpos para su uso en la presente invención, como se describe inmediatamente más adelante. Por ejemplo, esta divulgación contempla anticuerpos que tienen afinidad de unión por o que son producidos contra un complejo que comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en las Figuras 1 y 2, fragmentos de las mismas o péptidos homólogos. En particular, esta divulgación contempla anticuerpos que tienen afinidad de unión por, o que han sido producidos contra, fragmentos específicos que se predice que están, o en realidad están, expuestos a la superficie de proteína exterior del receptor nativo.

El bloqueo del respuesta fisiológica al ligando puede resultar de la inhibición de la unión del ligando al receptor, probablemente mediante inhibición competitiva. Así, ensayos *in vitro* de la presente divulgación usarán frecuentemente anticuerpos o segmentos de unión a receptor de estos anticuerpos, o fragmentos unidos a sustratos en fase sólida. Estos ensayos también permitirán la determinación del diagnóstico de los efectos de tanto mutaciones o modificaciones de la región de unión como mutaciones y modificaciones de receptores.

Esta divulgación también contempla el uso de ensayos de cribado de fármacos competitivos, por ejemplo, en los que los anticuerpos neutralizantes para el complejo de receptor o fragmentos compiten con un compuesto de prueba para la unión. De este modo, los anticuerpos neutralizantes o fragmentos pueden usarse para detectar la presencia de un polipéptido que comparte uno o más sitios de unión a un receptor y también pueden usarse para ocupar sitios de unión sobre un receptor que de otro modo podría unirse a citocina, por ejemplo, IL-B50.

V. Preparación de ácidos nucleicos y proteína

Puede obtenerse ADN que codifica las proteínas o fragmentos de los mismos por síntesis química, cribando bibliotecas de ADNc o cribando bibliotecas genómicas preparadas a partir de una amplia variedad de líneas celulares o muestras de tejido. Pueden aislarse secuencias naturales usando procedimientos convencionales y las secuencias proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, en las Figuras 1 y 2. Otros homólogos de especies, por ejemplo, primate, pueden identificarse por técnicas de hibridación, o por diversas técnicas de PCR, combinadas con o buscando en bases de datos de secuencias.

Estos ADN pueden expresarse en una amplia variedad de células huésped para la síntesis y formación del complejo de receptor funcional, o fragmentos, que pueden usarse, a su vez, por ejemplo, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales; para estudios de unión; para la construcción y expresión de moléculas de agonista/antagonista modificadas; para estudios de estructura/función; y para estudios de cribado. Una variante o sus fragmentos pueden expresarse en células huésped que se transforman o transfectan con vectores de expresión apropiados. Estas moléculas pueden estar sustancialmente libres de contaminantes de proteína o celulares, distintos de aquellos derivados del huésped recombinante y, por tanto, son particularmente útiles en composiciones farmacéuticas cuando se combinan con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las proteínas, o porciones de las mismas, pueden expresarse como fusiones con otras proteínas o usando motivos de combinación, por ejemplo, cremalleras de leucina, para formar

un complejo de receptor soluble.

Los vectores de expresión son normalmente construcciones de ADN o ARN autorreplicantes que contienen el gen receptor deseado o sus fragmentos, normalmente operativamente ligado a elementos de control genético adecuados que son reconocidos en una célula huésped adecuada. Estos elementos de control pueden efectuar la expresión dentro de un huésped adecuado. El tipo específico de elementos de control necesarios para efectuar la expresión dependerá de la célula huésped eventual usada. Generalmente, los elementos de control genético pueden incluir un sistema de promotor procariota o un sistema de control de la expresión de promotor eucariota, y normalmente incluyen un promotor de la transcripción, un operador opcional para controlar la aparición de transcripción, potenciadores de la transcripción para elevar el nivel de expresión de ARNm, una secuencia que codifica un sitio de unión a ribosoma adecuado y secuencias que terminan la transcripción y traducción. Los vectores de expresión normalmente también contienen un origen de replicación que permite replicar el vector independientemente de la célula huésped.

Los vectores de esta divulgación incluyen aquellos que contienen ADN que codifica estas proteínas, como se ha descrito, o un fragmento que comprende secuencia de ambas subunidades, que normalmente codifica un polipéptido funcionalmente equivalente, por ejemplo, biológicamente activo. El ADN puede estar bajo el control de un promotor viral y puede codificar un marcador de selección. Esta divulgación contempla adicionalmente el uso de tales vectores de expresión que pueden expresar ADNc de eucariota que codifica una proteína o complejo tal en un huésped procariota o eucariota, siendo el vector compatible con el huésped e insertando el ADNc eucariota que codifica el receptor en el vector de forma que el crecimiento del huésped que contiene el vector exprese el ADNc en cuestión. Normalmente, los vectores de expresión se diseñan para replicación estable en sus células huésped o para amplificación para aumentar enormemente el número total de copias del gen deseable por célula. No siempre es necesario requerir que un vector de expresión se replique en una célula huésped, por ejemplo, es posible efectuar la expresión transitoria del receptor o sus fragmentos en diversos huéspedes usando vectores que no contienen un origen de replicación que es reconocido por la célula huésped. También es posible usar vectores que producen integración de la proteína que codifica parte o sus fragmentos en el ADN huésped por recombinación, por ejemplo, en la dirección 3' de promotores heterólogos, o integración de promotores heterólogos en la dirección 5' de genes endógenos.

Vectores, como se usa en el presente documento, comprenden plásmidos, virus, bacteriófago, fragmentos de ADN integrables y otros vehículos, por ejemplo, que pueden permitir la integración de fragmentos de ADN en el genoma del huésped. Los vectores de expresión son vectores especializados que contienen elementos de control genéticos que efectúan la expresión de genes operativamente ligados. Los plásmidos son la forma más comúnmente usada de vector, pero otras formas de vectores que cumplen una función equivalente y que son, o se vuelven, conocidos en la técnica son adecuados para su uso en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Pouwels y col. (1985 y suplementos) Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., y Rodríguez y col. (eds. 1988) Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworth, Boston.

Células transformadas son células, preferentemente de mamífero, que han sido transformadas, transfectadas o infectadas con vectores, por ejemplo, construidas usando técnicas de ADN recombinante. Las células huésped transformadas normalmente expresan la proteína deseada o sus fragmentos, pero para los fines de clonación, amplificación y manipulación de su ADN, no necesitan expresar la proteína objeto. Esta divulgación contempla adicionalmente cultivar células transformadas en un medio nutritivo, permitiendo así que las células expresen la proteína, que incluye producción de complejos de receptor soluble o ligando.

Para los fines de esta divulgación, las secuencias de ácidos nucleicos están operativamente ligadas cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN para una pre-secuencia o conductor secretor está operativamente ligado a un polipéptido si se expresa como una pre-proteína o participa en dirigir el polipéptido a la membrana celular o en secreción del polipéptido. Un promotor está operativamente ligado a una secuencia codificante si promueve la transcripción del polipéptido; un sitio de unión a ribosoma está operativamente ligado a una secuencia codificante si está posicionado para inducir la traducción. Normalmente, operativamente ligado significa contiguo y en marco de lectura, sin embargo, ciertos elementos genéticos tales como genes represores no están contiguamente ligados, pero todavía se unen a secuencias de operador que a su vez controlan la expresión.

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

Sistemas de vector de huéspedes procariotas incluyen una amplia variedad de vectores para muchas especies diferentes. Como se usa en el presente documento, *E. coli* y sus vectores se usarán genéricamente para incluir vectores equivalentes usados en otros procariotas. Un vector común para amplificar ADN es pBR322 o muchos de sus derivados. Vectores que pueden usarse para expresar el receptor o sus fragmentos incluyen, pero no se limitan a, vectores tales como aquellos

que contienen el promotor lac (series pUC); promotor trp (pBR322-trp); promotor lpp (las series pIN); promotores lambda-pP o pR (pOTS); o promotores híbridos tales como ptac (pDR540). Véase Brosius y col. (1988) "Expression Vectors Employing Lambda-, trp-, lac-, and lpp-derived Promoters", en Rodríguez y Denhardt (eds.) Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworth, Boston, Capítulo 10, pág. 205-236.

- 5 Eucariotas inferiores, por ejemplo, levaduras y Dictyostelium, pueden transformarse con vectores que contienen secuencias de receptor de IL-B50. Para los fines de esta divulgación, los huéspedes eucariotas inferiores más comunes es la levadura de panadero, Saccharomyces cerevisiae. Se usará genéricamente para representar eucariotas inferiores, aunque también están disponibles varias otras cepas y especies. Los vectores de levadura normalmente consisten en un origen de replicación (al menos del tipo integrante), un gen de selección, un promotor, ADN que codifica el receptor o sus fragmentos, y secuencias para la terminación de la traducción, poliadenilación y terminación de la transcripción. Vectores de expresión adecuados para levadura incluyen promotores constitutivos tales como 3-fosfoglicerato cinasa y diversos otros promotores de genes de enzimas glicolíticas o promotores inducibles tales como el promotor alcohol deshidrogenasa 2 o promotor metalotionina. Vectores adecuados incluyen derivados de los siguientes tipos: bajo número de copias autorreplicantes (tal como las series YRp), alto número de copias autorreplicantes (tal como las series YE_p); tipos integrantes (tal como las series YIp) o mini-cromosomas (tal como las series YCp).

10 Células de cultivo de tejido eucariotas superiores son normalmente las células huésped preferidas para la expresión de la proteína interleucina funcionalmente activa. En principio, cualquier línea celular de cultivo de tejido eucariota superior es factible, por ejemplo, sistemas de expresión de baculovirus de insecto, tanto de una fuente de invertebrado como de vertebrado. Sin embargo, se prefieren células de mamífero. La transformación o transfección y propagación de tales células se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares útiles incluyen células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), líneas celulares de riñón de rata bebé (BRK), líneas celulares de insecto, líneas celulares de ave y líneas celulares de mono (COS). Vectores de expresión para tales líneas celulares normalmente incluyen un origen de replicación, un promotor, un sitio de iniciación de la traducción, sitios de corte y empalme de ARN (si se usa ADN genómico), un sitio de poliadenilación y un sitio de terminación de la transcripción. Estos vectores también contienen normalmente un gen de selección o gen de amplificación. Vectores de expresión adecuados pueden ser plásmidos, virus o retrovirus que llevan promotores derivados, por ejemplo, de fuentes tales como de adenovirus, SV40, parvovirus, virus de la varicelovacuina o citomegalovirus. Ejemplos representativos de vectores de expresión adecuados incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama y col. (1985) Mol. Cell Biol. 5:1136-1142; PolIA de pMC1neo, véase Thomas y col. (1987) Cell 51:503-512; y un vector de baculovirus tal como pAC 373 o pAC 610.

- 30 Para proteínas secretadas, un marco de lectura abierto normalmente codifica un polipéptido que consiste en un producto maduro o secretado covalentemente ligado en su extremo N a un péptido señal. El péptido señal se escinde normalmente antes de la secreción del polipéptido maduro, o activo. El sitio de escisión puede predecirse con un alto grado de precisión de reglas empíricas, por ejemplo, von-Heijne (1986) Nucleic Acids Research 14:4683-4690, y la composición precisa de aminoácidos del péptido señal no parece ser crítica para su función. Véanse, por ejemplo, Randall y col. (1989) Science 243:1156-1159; y Kaiser y col. (1987) Science 235:312-317.

35 Frecuentemente se deseará expresar estos polipéptidos en un sistema que proporcione un patrón de glucosilación específico o definido. En este caso, el patrón usual será el proporcionado de modo natural por el sistema de expresión. Sin embargo, el patrón será modificable exponiendo el polipéptido, por ejemplo, una forma sin glucosilar, a proteínas glucosilantes apropiadas introducidas en un sistema de expresión heterólogo. Por ejemplo, los genes de receptor pueden co-transformarse con uno o más genes que codifican enzimas de mamífero u otras glucosilantes. Usando este enfoque, ciertos patrones de glucosilación de mamífero serán alcanzables en células procariotas u otras células.

40 La fuente del complejo de receptor puede ser un huésped eucariota o procariota que expresa ADN de subunidad de receptor recombinante, tal como se describe anteriormente. La fuente también puede ser una línea celular tal como fibroblastos 3T3 de ratón Swiss, pero también se contemplan otras líneas celulares de mamífero por esta divulgación, siendo la línea celular preferida de la especie humana.

Ahora que se conoce la secuencia entera y componentes del complejo de receptor funcional, el complejo de receptor humano, fragmentos o derivados del mismo pueden prepararse por procedimientos convencionales para sintetizar péptidos. Éstos incluyen procedimientos tal como se describen en Stewart y Young (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky y Bodanszky (1984) The Practice of Peptide Synthesis,

- 50 Springer-Verlag, Nueva York; y Bodanszky (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Nueva York. Por ejemplo, pueden usarse un procedimiento de azida, un procedimiento de cloruro de ácido, un procedimiento de anhídrido de ácido, un procedimiento de anhídrido mixto, un procedimiento de éster activo (por ejemplo, éster p-nitrofenílico, éster de N-hidroxisuccinimida o éster cianometílico), un procedimiento de carbodiimidazol, un procedimiento de oxidante-

reductor o un procedimiento de diciclohexilcarbodiimida (DCCD)/aditivo. Las síntesis en fase sólida y en fase de disolución son ambas aplicables a los procedimientos anteriores.

Las proteínas de subunidad de receptor, fragmentos o derivados se preparan adecuadamente según los procedimientos anteriores como normalmente se emplean en la síntesis de péptidos, generalmente tanto por un llamado procedimiento escalonado que comprende condensar un aminoácido con el aminoácido terminal, uno a uno en secuencia, como acoplado fragmentos de péptido al aminoácido terminal. Grupos amino que no están siendo usados en la reacción de acoplamiento normalmente deben protegerse para prevenir el acoplamiento en una localización incorrecta.

Si se adopta una síntesis en fase sólida, el aminoácido del extremo C se une a un vehículo o soporte insoluble mediante su grupo carboxilo. El vehículo insoluble no está particularmente limitado, en tanto que tenga una capacidad de unión a un grupo carboxilo reactivo. Ejemplos de tales vehículos insolubles incluyen resinas de halometilo tales como resina de clorometilo o resina de bromometilo, resinas de hidroximetilo, resinas de fenol, resinas terc-alquiloxycarbonil-hidrazidadas, y similares.

Un aminoácido protegido por grupo amino está unido en la secuencia mediante condensación de su grupo carboxilo activado y el grupo amino reactivo del péptido o cadena previamente formado, para sintetizar el péptido etapa por etapa. Después de sintetizar la secuencia completa, el péptido se separa del vehículo insoluble para producir el péptido. Este enfoque en fase sólida se describe generalmente por Merrifield y col. (1963) en J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2156.

Las proteínas preparadas y fragmentos de las mismas pueden aislarse y purificarse a partir de la mezcla de reacción por medio de separación de péptidos, por ejemplo, por extracción, precipitación, electroforesis, diversas formas de cromatografía y similares. Los receptores de la presente invención pueden obtenerse en grados variables de pureza que dependen de su uso deseado. La purificación puede llevarse a cabo usando las técnicas de purificación de proteínas desveladas en el presente documento, véase más adelante, o usando los anticuerpos descritos en el presente documento en procedimientos de cromatografía de afinidad inmunoabsorbente. Esta cromatografía de afinidad inmunoabsorbente se lleva a cabo normalmente ligando primero los anticuerpos con un soporte sólido y luego poniendo en contacto los anticuerpos ligados con lisados solubilizados de células apropiadas, lisados de otras células que expresan los complejos de receptor, o lisados o sobrenadantes de células que producen las proteínas como resultado de técnicas de ADN, véase más adelante.

Generalmente, la proteína purificada será al menos aproximadamente el 40 % de pureza, generalmente al menos aproximadamente el 50 % de pureza, normalmente al menos aproximadamente el 60 % de pureza, normalmente al menos aproximadamente el 70 % de pureza, más normalmente al menos aproximadamente el 80 % de pureza, preferible al menos aproximadamente el 90 % pura y más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % de pureza, y en realizaciones particulares el 97 %-99 % o más. La pureza será normalmente en una base en peso, pero también puede ser en una base molar. Se aplicarán diferentes ensayos según convenga.

VI. Anticuerpos

El término "anticuerpo" o "molécula de anticuerpo" como se usa a propósito de la presente invención incluye moléculas intactas, además de fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv que pueden unirse selectivamente al determinante epitópico. Estos fragmentos de anticuerpos retienen algo de capacidad para unirse selectivamente con su antígeno o receptor y se definen como sigue: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo puede producirse por digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para dar una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo puede obtenerse tratando anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para dar una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando anticuerpo completo con la enzima pepsina sin posterior reducción; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos de Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento genéticamente manipulado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y (5) anticuerpo monocatenario ("SCA"), definido como una molécula genéticamente manipulada que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, ligadas por un ligador de polipéptidos adecuado como una molécula monocatenaria genéticamente fusionada.

Procedimientos de preparación de estos fragmentos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (actual edición) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. Por tanto, el término "molécula de anticuerpo" en sus diversas formas como se usa en el presente documento contempla tanto una molécula de anticuerpo intacto (inmunoglobulina) como una porción inmunológicamente activa de una molécula de anticuerpo (inmunoglobulina). Pueden aplicarse procedimientos recombinantes para preparar estos fragmentos.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de una especie de molécula de anticuerpo de especificidad por antígeno. Un anticuerpo monoclonal contiene solo una especie de sitio de combinación de anticuerpos capaz de inmunorreaccionar con un antígeno particular y así normalmente muestra una única afinidad de unión por ese antígeno.

Por tanto, un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo biespecífico que tiene dos sitios de combinación de anticuerpos, cada uno inmunoespecífico para un antígeno diferente. En una realización, la primera molécula de anticuerpo está fijada a un soporte sólido.

5 Como se usa en la presente invención, el término “epítipo” significa un determinante antigénico sobre un antígeno al que se une el paratope de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos normalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, además de características de carga específicas.

10 La palabra “complejo” como se usa en el presente documento se refiere al producto de una reacción de agente de unión específico-diana. Un complejo a modo de ejemplo es la combinación de dos subunidades para formar un complejo fisiológico de subunidades de proteína, o un producto de inmunorreacción formado por una reacción anticuerpo-antígeno.

El término “antígeno” se refiere a un polipéptido o proteína que puede unirse específicamente a (inmunorreactar con) un anticuerpo y formar un producto de inmunorreacción (inmunocomplejo). El sitio sobre el antígeno con que el anticuerpo se une se denomina un determinante antigénico o epítipo, y la unión debe ser detectable, por ejemplo, 2X, 5X o más por encima del ruido.

15 Un procedimiento de la divulgación para la detección de anticuerpos que se unen a epítopes novedosos en una muestra se realiza *in vitro*, por ejemplo, en inmunoensayos en los que los anticuerpos pueden identificarse en fase líquida o unidos a un vehículo en fase sólida. En diversas realizaciones, el procedimiento se realiza con un anticuerpo de captura unido a un soporte sólido, y/o el anticuerpo de captura es una molécula de anticuerpo monoclonal. En otros casos puede ser útil el uso de tecnología de tetrámeros. Véanse, por ejemplo, Kelleher y Rowland-Jones (2000) Curr. Op. Immunol. 12:370-374; Katz (1999) Biomol. Eng. 16:57-65; y Ogg y McMichael (1998) Curr. Op. Immunol. 10:393-396.

20 Ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizarse para detectar anticuerpos novedosos en una muestra incluyen inmunoensayos competitivos y no competitivos en tanto una forma directa como indirecta. Ejemplos de tales inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo de sándwich (inmunométrico). La detección de los anticuerpos puede hacerse utilizando inmunoensayos que se ejecutan en tanto modos directos, inversos como simultáneos, que incluyen inmunoensayos de competición y ensayos inmunohistoquímicos sobre muestras fisiológicas. Preferentemente, el procedimiento utiliza un inmunoensayo directo. Aquellos expertos en la materia conocerán, o podrán distinguir fácilmente, otros formatos de inmunoensayo sin excesiva experimentación.

25 Las moléculas de anticuerpo unidas a fase sólida se unen por adsorción de un medio acuoso, aunque pueden usarse otros modos de fijación, tales como acoplamiento covalente u otros medios muy conocidos de fijación a la matriz sólida. Preferentemente, la primera molécula de anticuerpo se une a un soporte antes de formar un inmunocomplejo con antígeno, sin embargo, el inmunocomplejo puede formarse antes de la unión del complejo al soporte sólido.

30 Preferentemente se bloquean sitios de unión a proteína no específicos sobre la superficie del soporte de fase sólida. Después de la adsorción de anticuerpos unidos a fase sólida, una disolución acuosa de una proteína libre de interferencia con el ensayo tal como albúmina de suero bovino, de caballo u otra albúmina de suero que también está libre de contaminación con el antígeno se mezcla con la fase sólida para adsorber la proteína mezclada sobre la superficie del soporte sólido que contiene anticuerpo en sitios de unión a proteína sobre la superficie que no están ocupados por la molécula de anticuerpo.

35 Una disolución de proteínas acuosa típica contiene aproximadamente 2-10 por ciento en peso de albúmina de suero bovino en PBS a un pH de aproximadamente 7-8. La mezcla de disolución de proteínas acuosa-soporte sólido se mantiene normalmente durante un periodo de tiempo de al menos una hora a una temperatura de aproximadamente 4-37 °C y la fase sólida resultante se aclara después libre de proteína sin unir.

40 El primer anticuerpo preseleccionado puede unirse a muchos vehículos diferentes y usarse para detectar novedosos anticuerpos de unión a epítipo en una muestra. Ejemplos de vehículos muy conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser tanto soluble como insoluble para los fines de la invención. Aquellos expertos en la materia conocerán otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpos, o podrán determinar tales usando experimentación rutinaria.

45 Además, si se desea, un anticuerpo para la detección en estos inmunoensayos puede marcarse detectablemente de diversas formas. Se conocen muchas marcas y procedimientos de marcado diferentes. Ejemplos de los tipos de marcas que pueden usarse en la presente invención incluyen, por ejemplo, enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Existen muchas otras marcas adecuadas para unirse a los anticuerpos monoclonales de la invención

Los anticuerpos que se unen al complejo de receptor de IL-B50 pueden prepararse usando un polipéptido intacto o

fragmentos que contienen péptidos de interés como antígeno inmunizante. El polipéptido o un péptido usado para inmunizar un animal puede derivarse de ADNc traducido o síntesis química que puede conjugarse con una proteína portadora, si se desea. Tales vehículos comúnmente usados que están químicamente acoplados al péptido incluyen hemocianina de lapa californiana (KLH), tiroglobulina, albúmina de suero bovino (BSA) y toxoide tetánico. El péptido acoplado se usa entonces para inmunizar el animal huésped, por ejemplo, un ratón, una rata o un conejo.

Si se desea, adicionalmente pueden purificarse anticuerpos policlonales o monoclonales, por ejemplo, por la unión a y elución de una matriz a la que está unida el antígeno para el que se produjeron los anticuerpos. Están disponibles muchas técnicas para la purificación y/o concentración de anticuerpos policlonales, además de anticuerpos monoclonales. Véanse, por ejemplo, Coligan y col. (ed. actual) Unidad 9, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience.

También es posible usar la tecnología de anticuerpos antiidiotípicos para producir anticuerpos monoclonales que imitan un epítopo. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal antiidiotípico preparado para un primer anticuerpo monoclonal tendrá un dominio de unión en la región hipervariable que es la "imagen" del epítopo unido por el primer anticuerpo monoclonal.

La preparación de anticuerpos policlonales es muy conocida para aquellos expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, Green y col. "Production of Polyclonal Antisera" páginas 1-5 en Manson (ed.) *Immunochemical Protocols Humana*

Press; *Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters*. Sección 2.4.1 en Coligan y col. *Current Protocols in Immunology*.

La preparación de anticuerpos monoclonales es asimismo normalmente convencional. Véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497; Coligan y col. *Current Protocols*. Secciones 2.5.1-2.6.7; y Harlow y Lane (1989). Brevemente, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales inyectando ratones con una composición que comprende un antígeno, verificando la presencia de la producción de anticuerpos tomando una muestra de suero, extirpando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que producen anticuerpos para el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridomas. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y purificarse de cultivos de hibridomas mediante diversas técnicas bien establecidas. Tales técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico. Véanse, por ejemplo, Coligan y col. *Current Protocols*. Secciones 2.7.1-2.7.12 y 2.9.1-2.9.3; Barnes y col. en *Methods in Molecular Biology*, Humana Press.

Para las aplicaciones terapéuticas de la presente invención, los anticuerpos como se definen en las reivindicaciones también pueden derivarse de anticuerpo de primate subhumano. Técnicas generales para producir anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos pueden encontrarse, por ejemplo, en Goldenberg y col. (1991), documento WO 91/11465; y Losman y col. (1990) *Int. J. Cancer* 46:310-314.

Alternativamente, un anticuerpo anti-receptor funcional de IL-B50 terapéuticamente útil puede derivarse de un anticuerpo monoclonal "humanizado". Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo regiones determinantes de la complementariedad de ratón de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano, y luego sustituyendo residuos humanos en las regiones estructurales de los homólogos murinos. El uso de componentes de anticuerpo derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los posibles problemas asociados a la inmunogenicidad de regiones constantes murinas. Técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulinas murinas se describen, por ejemplo, por Orlandi y col. (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:3833-3837. Técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados se describen, por ejemplo, por Jones y col. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen y col. (1988) *Science* 239:1534-1536; Carter y col. (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285-4289; Sandhu (1992) *Crit. Rev. Biotech.* 12:437-462; y Singer y col. (1993) *J. Immunol.* 150:2844-2857.

Los anticuerpos para su uso en la invención también pueden derivarse de fragmentos de anticuerpos humanos aislados de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria. Véanse, por ejemplo, Barbas y col. (1991) *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, vol. 2, página 119; y Winter y col. (1994) *Ann. Rev. Immunol.* 12:433-465. Vectores de clonación y de expresión que son útiles para producir una biblioteca de fagos de inmunoglobulina humana pueden obtenerse, por ejemplo, de STRATAGENE Cloning Systems (La Jolla, CA).

Además, los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden derivarse de un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos se obtienen de ratones transgénicos que han sido "manipulados" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a exposición antigénica. En esta técnica, elementos de los sitios de la cadena pesada y ligera humana se introducen en cepas de ratones derivadas de líneas de citoblastos embrionarios que contienen alteraciones elegidas como diana de los sitios de la cadena pesada y ligera endógenos. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas que secretan anticuerpos humanos. Los procedimientos para obtener anticuerpos humanos de ratones transgénicos se

describen por Green y col. (1994) *Nature Genet.* 7:13-21; Lonberg y col. (1994) *Nature* 368:856-859; y Taylor y col. (1994) *Int. Immunol.* 6:579-591.

Pueden prepararse fragmentos de anticuerpos por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpos por escisión enzimática de un anticuerpo con pepsina para proporcionar un fragmento indicado $F(ab')_2$. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de enlaces disulfuro para producir fragmentos monovalentes Fab' . Alternativamente, una escisión enzimática usando papaína produce dos fragmentos monovalentes Fab y un fragmento Fc directamente. Estos procedimientos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, patentes de EE.UU. nº 4.036.945 y nº 4.331.647, y referencias contenidas en su interior. Véanse también Nisonhoff y col. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230-244; Porter (1959) *Biochem. J.* 73:119-127; Edelman y col. (1967) *Methods in Enzymology*, vol. 1, Academic Press; y Coligan y col. *Current Protocols*, en las secciones 2.8.1-2.8.10 y 2.10.1-2.10.4.

También pueden usarse otros procedimientos de escisión de anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, posterior escisión de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, mientras que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Por ejemplo, fragmentos F_v comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L . Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar y col. (1972) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:2659-2662. Alternativamente, las cadenas variables pueden ligarse por un enlace disulfuro intermolecular o reticularse por productos químicos tales como glutaraldehído. Véase, por ejemplo, Sandhu (1992) *Crit. Rev. Biotech.* 12:437-462. Preferentemente, los fragmentos de F_v comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un péptido ligador. Estas proteínas de unión a antígeno monocatenarias (sF_v) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una única cadena de polipéptidos con un ligador péptido que une mediante puentes los dos dominios V . Procedimientos para producir sF_v se describen, por ejemplo, por Whitlow y col. (1991) *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, vol. 2, página 97; Bird y col. (1988) *Science* 242:423-426; Ladner y col., patente de EE.UU. nº 4.946.778; Pack y col. (1993) *Bio/Technology* 11:1271-77; y Sandhu (1992) *Crit. Rev. Biotech.* 12:437-462.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR). Los péptidos de CDR ("unidades de reconocimiento mínimo") pueden obtenerse construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable de ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y col. (1991) *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, vol. 2, página 106.

Pueden producirse anticuerpos para los diversos complejos de receptor de mamífero, por ejemplo, de IL-B50 y fragmentos de los mismos, ambos en formas nativas que se producen de modo natural y en sus formas recombinantes, siendo la diferencia que es más probable que los anticuerpos para el ligando activo reconozcan epítopes que están solo presentes en las conformaciones nativas. La detección de antígenos desnaturalizados también puede ser útil en, por ejemplo, análisis de transferencia Western. También se contemplan anticuerpos antiidiotípicos, que serían útiles como agonistas o antagonistas de un receptor natural o un anticuerpo.

Pueden usarse varios inmunógenos para producir anticuerpos específicamente reactivos con proteínas del complejo de receptor. La proteína recombinante es el inmunógeno preferido para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. La proteína que se produce de modo natural también puede usarse tanto en forma pura como impura. Los péptidos sintéticos preparados usando las secuencias de proteína de receptor de IL-B50 humana descritas en el presente documento también pueden usarse como inmunógeno para la producción de anticuerpos para complejos de receptor. La proteína recombinante puede expresarse en células eucariotas o procariotas como se describe en el presente documento, y purificarse como se describe. El producto se inyecta entonces en un animal que puede producir anticuerpos. Pueden generarse tanto anticuerpos monoclonales como policlonales para el uso posterior en inmunoensayos para medir la proteína.

Los procedimientos de producir anticuerpos policlonales son conocidos para aquellos expertos en la materia. En resumen, un inmunógeno, preferentemente una proteína purificada, se mezcla con un adyuvante y los animales se inmunizan con la mezcla. La respuesta inmunitaria del animal a la preparación de inmunógeno se monitoriza tomando sangrados de prueba y determinando el título de reactividad para el antígeno de interés. Cuando sea apropiado se obtienen títulos de anticuerpo para el inmunógeno, se recoge sangre del animal y se preparan antisueros. Si se desea puede hacerse un fraccionamiento posterior de los antisueros para enriquecer en anticuerpos reactivos para la proteína. Véase Harlow y Lane.

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante diversas técnicas familiares para aquellos expertos en la materia. Brevemente, se immortalizan células del bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, comúnmente por fusión con una célula de mieloma. Procedimientos alternativos de immortalización incluyen transformación con virus de Epstein-Barr, oncogenes o retrovirus, u otros procedimientos muy conocidos en la técnica. Las colonias que se producen de células immortalizadas individuales se criban para la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseada por el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por tales células puede potenciarse por diversas técnicas, que incluyen inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado. Los genes que codifican los anticuerpos derivados pueden someterse a mutagénesis para potenciar la afinidad de unión o propiedades farmacocinéticas. Alternativamente, pueden aislarse secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo cribando una biblioteca de ADN de linfocitos B humanos según el protocolo general explicado resumidamente por Huse y col. (1989) *Science* 246:1275-1281.

Los anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión y versiones monocatenarias, contra fragmentos predeterminados de la proteína, pueden producirse por inmunización de animales con conjugados de los fragmentos con proteínas inmunogénicas. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de células que secretan el anticuerpo deseado. Estos anticuerpos pueden cribarse para unirse a proteína normal o defectuosa, o se criban para actividad agonista o antagonista. Estos anticuerpos monoclonales se unirán normalmente con al menos una K_D de aproximadamente 1 mM, más normalmente al menos aproximadamente 300 μ M, normalmente al menos aproximadamente 100 μ M, más normalmente al menos aproximadamente 30 μ M, preferentemente al menos aproximadamente 10 μ M, y más preferentemente al menos aproximadamente 3 μ M o mejor; que incluye 1 μ M, 300 nM, 100 nM, 30 nM, etc.

Los anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión a antígeno de esta divulgación, pueden tener valor diagnóstico o terapéutico significativo. Pueden ser potentes antagonistas que se unen al complejo de receptor e inhiben la unión al ligando o inhiben la capacidad del ligando para provocar una respuesta biológica. También pueden ser útiles como anticuerpos no neutralizantes y pueden acoplarse a toxinas o radionúclidos para unirse a células productoras. Además, estos anticuerpos pueden conjugarse con fármacos u otros agentes terapéuticos, tanto directamente como indirectamente por medio de un ligador.

Los anticuerpos de esta divulgación también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, pueden unirse a la interleucina sin inhibir la unión a receptor. Como anticuerpos neutralizantes pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva. También serán útiles en detectar o cuantificar complejo de receptor funcional. Pueden usarse como reactivos para análisis de transferencia Western, o para inmunoprecipitación o inmunopurificación de la proteína respectiva.

Los fragmentos de proteína pueden unirse a otros materiales, particularmente polipéptidos, como polipéptidos fusionados o covalentemente unidos que van a usarse como inmunógenos. El complejo de receptor de primate y sus fragmentos pueden fusionarse o ligarse covalentemente a diversos inmunógenos tales como hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero bovino, toxoide tetánico, etc. Véanse *MicroBiology*, Hoeber Medical Division, Harper y Row, 1969;

Landsteiner (1962) *Specificity of Serological Reactions*, Dover Publications, Nueva York; y Williams y col. (1967) *Methods in Immunology and Immunochemistry*, vol. 1, Academic Press, Nueva York; para descripciones de procedimientos de preparación de antisueros policlonales. Un procedimiento típico implica hiperinmunización de un animal con un antígeno. La sangre del animal se recoge entonces brevemente después de las inmunizaciones repetidas y se aísla la globulina gamma.

En algunos casos se desea preparar anticuerpos monoclonales de diversos huéspedes de mamífero, tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc. La descripción de técnicas para preparar tales anticuerpos monoclonales puede encontrarse en, por ejemplo, Stites y col. (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4ª ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y referencias citadas en su interior; Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.) Academic Press, Nueva York; y particularmente en Kohler y Milstein (1975) en *Nature* 256:495-497, que trata de un procedimiento de generación de anticuerpos monoclonales. Brevemente resumido, este procedimiento implica inyectar un animal con un inmunógeno. El animal se sacrifica luego y se toman las células de su bazo, que luego se fusionan con células de mieloma. El resultado es una célula híbrida o "hibridoma" que puede reproducirse *in vitro*. La población de hibridomas se criba entonces para aislar clones individuales, cada uno de los cuales secreta una única especie de anticuerpo para el inmunógeno. De este modo, las especies de anticuerpos individuales obtenidas son los productos de linfocitos B individuales immortalizados y clonados del animal inmune generado en respuesta a un sitio específico reconocido en la sustancia inmunogénica.

Otras técnicas adecuadas implican exposición *in vitro* de linfocitos a los polipéptidos antigénicos o alternativamente para la selección de bibliotecas de anticuerpos en fago o vectores similares. Véanse, Huse y col. (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda" *Science* 246:1275-1281; y Ward y col. (1989) *Nature* 341:544-546. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden usarse con o sin modificación, que

incluyen anticuerpos quiméricos o humanizados. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos se marcarán uniendo, tanto covalentemente como no covalentemente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conocen una amplia variedad de marcas y técnicas de conjugación y se informan ampliamente en tanto la bibliografía científica como de patentes. Marcas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de tales marcas incluyen las patentes de EE.UU. n° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Por tanto, pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes o quiméricas, véase Cabilly, patente de EE.UU. n° 4.816.567; o producirse en ratones transgénicos, véase Mendez y col. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse para cromatografía de afinidad en el aislamiento de receptor de primate o células que expresan tal. Pueden prepararse columnas ligando anticuerpos a un soporte sólido, por ejemplo, partículas tales como agarosa, SEPHADEX o similares, en la que un lisado celular puede pasarse por la columna, lavarse la columna, seguido de concentraciones crecientes de un desnaturizante suave, por lo que la proteína purificada se liberará. En cambio, puede usarse proteína para purificar el anticuerpo.

También pueden usarse anticuerpos para cribar bibliotecas de expresión para productos de expresión particulares. Normalmente, anticuerpos usados en un procedimiento tal se marcarán con un resto que permita la fácil detección de la presencia de antígeno por unión a anticuerpo.

Los anticuerpos producidos contra un receptor de IL-B50 también se usarán para producir anticuerpos antiidiotípicos. Estos serán útiles en detectar o diagnosticar diversas afecciones inmunológicas relacionadas con la expresión de la proteína o células que expresan receptores para la proteína. También serán útiles como agonistas o antagonistas de IL-B50, que pueden ser inhibidores competitivos o sustitutos para ligandos que se producen de modo natural.

Complejo de composición de unión:proteína de receptor

Un receptor de IL-B50 que se une específicamente a o que es específicamente inmunorreactivo con un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal generado contra un inmunogén definido, por ejemplo, un inmunogén que consiste en un complejo que comprende tanto IL-7R α como R82, se determina normalmente en un inmunoensayo. Dentro de la presente divulgación están incluidas aquellas secuencias de ácidos nucleicos descritas en el presente documento, que incluyen variantes funcionales, que codifican polipéptidos que se combinan para unirse a anticuerpos policlonales generados contra el receptor de IL-B50 de primate prototípico, pero no a los anteriores componentes individuales conocidos. El inmunoensayo normalmente usa un antisuero policlonal que se produjo, por ejemplo, para un complejo que comprende las proteínas de SEC ID N°: 2 y 4. Este antisuero se selecciona por tener baja reactividad cruzada contra otros miembros de la familia del receptor de IL-7, preferentemente de la misma especie, y para otros receptores evolutivamente alejados de roedor o similares, de manera que cualquiera de tal reactividad cruzada se elimine por inmunoabsorción antes de uso en el inmunoensayo.

Con el fin de producir antisueros para su uso en un inmunoensayo, el complejo funcional se aísla como se describe en el presente documento. Por ejemplo, puede producirse proteína recombinante en una línea celular de mamífero. Un huésped apropiado, por ejemplo, una cepa endogámica de ratones tales como Balb/c, se inmuniza con el complejo usando un adyuvante convencional tal como adyuvante de Freund y un protocolo de inmunización de ratones convencional (véase Harlow y Lane). Alternativamente, como inmunogén puede usarse un péptido sintético derivado de las secuencias desveladas en el presente documento y conjugado con una proteína portadora. Se recogen sueros policlonales, quizás inmunoagotados, y se valoran contra la proteína de inmunogén en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo en fase sólida con el inmunogén inmovilizado sobre un soporte sólido. Se seleccionan antisueros policlonales con un título de 10^4 o superior y se prueban para su reactividad cruzada contra otros miembros de la familia de receptores de IL-7, por ejemplo, usando un inmunoensayo de unión competitiva tal como el descrito en Harlow y Lane, arriba, en las páginas 570-573. Preferentemente, al menos dos miembros de la familia de receptores de IL-7 se usan en esta determinación. Estos miembros de la familia de receptores de IL-7 pueden producirse como proteínas recombinantes y aislarse usando técnicas de biología molecular y química de proteínas convencionales como se describen en el presente documento.

Los inmunoensayos en el formato de unión competitiva pueden usarse para las determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, el complejo de receptor, soluble o asociado a membrana, puede inmovilizarse en un soporte sólido. Las proteínas añadidas al ensayo compiten con la unión de los antisueros al antígeno inmovilizado. La capacidad de las proteínas anteriores para competir con la unión de los antisueros al complejo inmovilizado se compara con otros miembros de la familia. El porcentaje de reactividad cruzada para las proteínas anteriores se calcula usando cálculos convencionales. Aquellos antisueros con menos del 10 % de reactividad cruzada con cada una de las proteínas enumeradas anteriormente se seleccionan y se reúnen. Los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada se eliminan entonces de los antisueros reunidos por inmunoabsorción con las proteínas anteriormente enumeradas.

Los antisueros inmunoabsorbidos y reunidos se usan entonces en un inmunoensayo de unión competitiva como se ha

descrito anteriormente para comparar un segundo complejo de proteína con el complejo de proteína de inmunogén. Con el fin de hacer esta comparación, las dos proteínas se ensayan cada una en un amplio intervalo de concentraciones y se determina la cantidad de cada proteína requerida para inhibir el 50 % de la unión de los antisueros para la proteína inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína requerida es inferior a dos veces la cantidad que se requiere del complejo de receptor de antígeno, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a un anticuerpo generado para el inmunogén.

VII. Kits y cuantificación

Tanto las formas que se producen de modo natural como las recombinantes del complejo de receptor de esta divulgación son particularmente útiles en kits y procedimientos de ensayo. Por ejemplo, estos procedimientos también se aplicarían al cribado para la actividad de unión, por ejemplo, ligandos o antagonistas para estos receptores. En los últimos años se han desarrollado varios procedimientos de automatización de ensayos de forma que se permita cribar decenas de miles de compuestos por año. Véanse, por ejemplo, una estación de trabajo automatizada de BIOMEK, Beckman Instruments, Palo Alto, California, y Fodor y col. (1991) *Science* 251:767-773. Este último describe medios para probar la unión por una pluralidad de polímeros definidos sintetizados sobre un sustrato sólido. El desarrollo de ensayos adecuados para cribar un agonista/antagonista o proteínas similares a ligando puede facilitarse enormemente por la disponibilidad de grandes cantidades de complejos de receptor solubles purificados en un estado activo tal como se proporciona por esta divulgación.

Los complejos de receptor purificados pueden unirse a sustratos para su uso en las técnicas de cribado anteriormente mencionadas. Sin embargo, anticuerpos no neutralizantes para estos receptores pueden usarse como anticuerpos de captura para inmovilizar los complejos de receptor respectivos sobre la fase sólida, útiles, por ejemplo, en usos de diagnóstico.

Esta divulgación también contempla el uso de complejos de receptor, fragmentos de los mismos, péptidos y sus productos de fusión en diversos kits de diagnóstico y procedimientos para detectar la presencia del receptor. Alternativamente, o adicionalmente, los anticuerpos contra las moléculas pueden incorporarse en los kits y procedimientos. Normalmente, el kit tendrá un compartimento que contiene tanto un péptido definido o segmento génico como un reactivo que reconoce uno o el otro. Normalmente, los reactivos de reconocimiento, en el caso de péptido, serían un ligando o anticuerpo, o en el caso de un segmento génico serían normalmente una sonda de hibridación.

Un kit preferido para determinar la concentración de, por ejemplo, complejo de receptor, una muestra normalmente comprendería un compuesto marcado, por ejemplo, IL-B50 o anticuerpo, que tiene afinidad de unión conocida por receptor, una fuente de receptor (que se produce de modo natural o recombinante) como control positivo y un medio para separar el compuesto marcado unido del libre, por ejemplo, una fase sólida para inmovilizar el receptor en la muestra de prueba. Normalmente se proporcionarán compartimentos que contienen reactivos e instrucciones.

Los anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión a antígeno, específicos para complejo de receptor de mamífero o un fragmento de péptido, o ligando son útiles en aplicaciones de diagnóstico para detectar la presencia de niveles elevados de receptor y/o sus fragmentos. Los ensayos de diagnóstico pueden ser homogéneos (sin una etapa de separación entre el reactivo libre y el complejo anticuerpo-antígeno) o heterogéneos (con una etapa de separación). Existen diversos ensayos comerciales, tales como radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), técnica de inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT), inmunoensayo fluorescente marcado con sustrato (SLFIA) y similares. Por ejemplo, pueden emplearse anticuerpos no marcados usando un segundo anticuerpo que está marcado y que reconoce el anticuerpo para el complejo de receptor o para un fragmento particular del mismo. Estos ensayos también se han tratado ampliamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH., y Coligan (ed. 1991 y suplementos periódicos) *Current Protocols in Immunology* Greene/Wiley, Nueva York.

Los anticuerpos antiidiotípicos pueden tener uso similar para servir de agonistas o antagonistas de receptor. Estos deben ser útiles como reactivos terapéuticos bajo circunstancias apropiadas.

Frecuentemente, los reactivos para ensayos de diagnóstico se suministran en kits, de manera que se optimice la sensibilidad del ensayo. Para la invención objeto, dependiendo de la naturaleza del ensayo, el protocolo y la marca, se proporciona tanto anticuerpo marcado como sin marcar, o ligando marcado. Esto es normalmente conjuntamente con otros aditivos, tales como tampones, estabilizadores, materiales necesarios para la producción de señales tales como sustratos para enzimas, y similares. Preferentemente, el kit también contendrá instrucciones para el uso apropiado y eliminación del contenido después de uso. Normalmente, el kit tiene compartimentos para cada reactivo útil, y contendrá instrucciones para el uso apropiado y eliminación de reactivos. Deseablemente, los reactivos se proporcionan como un polvo liofilizado seco, pudiendo los reactivos reconstituirse en un medio acuoso que tiene concentraciones apropiadas para realizar el ensayo.

Muchos de los constituyentes anteriormente mencionados de los ensayos de diagnóstico pueden usarse sin modificación

o pueden modificarse en diversas formas. Por ejemplo, el marcado puede lograrse uniendo covalentemente o no covalentemente un resto que proporciona directamente o indirectamente una señal detectable. En cualquiera de estos ensayos, un compuesto de prueba, complejo de receptor o anticuerpos para el mismo pueden marcarse tanto directamente como indirectamente. Las posibilidades de marcado directo incluyen grupos de marca: radiomarcas tales como ^{125}I , enzimas (patente de EE.UU. n° 3.645.090) tales como peroxidasa y fosfatasa alcalina, y marcas fluorescentes (patente de EE.UU. n° 3.940.475) que pueden monitorizar el cambio en intensidad de fluorescencia, desplazamiento de la longitud de onda o polarización de la fluorescencia. Las posibilidades de marcado indirecto incluyen biotinilación de un constituyente, seguido de la unión a avidina acoplada a uno de los anteriores grupos de marca.

También hay numerosos procedimientos de separación del ligando unido del libre, o alternativamente el compuesto de prueba unido del libre. El complejo de receptor puede inmovilizarse sobre diversas matrices, seguido de lavado. Matrices adecuadas incluyen plástico tal como una placa de ELISA, filtros y perlas. Los procedimientos de inmovilización del receptor a una matriz incluyen, sin limitación, adhesión directa a plástico, uso de un anticuerpo de captura, acoplamiento químico y biotina-avidina. La última etapa en este enfoque implica la precipitación del complejo anticuerpo/antígeno por cualquiera de varios procedimientos que incluyen aquellos que utilizan, por ejemplo, un disolvente orgánico tal como polietilenglicol o una sal tal como sulfato de amonio. Otras técnicas de separación adecuadas incluyen, sin limitación, el procedimiento de anticuerpo para fluoresceína-partículas magnetizables descrito en Rattle y col. (1984) Clin. Chem. 30(9):1457-1461, y la separación de doble anticuerpo-partículas magnéticas como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.659.678.

Sobre los procedimientos para enlazar proteína o fragmentos a diversas marcas se ha informado ampliamente en la bibliografía y no requieren discusión detallada aquí. Muchas de las técnicas implican el uso de grupos carboxilo activados tanto mediante el uso de carbodiimida como de ésteres activos para formar enlaces peptídicos, formación de tioéteres haciendo reaccionar un grupo mercapto con un halógeno activado tal como cloroacetilo, o una olefina activada tal como maleimida, para enlace o similares. Las proteínas de fusión también se usarán en estas aplicaciones.

Otro aspecto de diagnóstico de la presente invención implica el uso de secuencias de oligonucleótidos o de polinucleótidos tomadas de las secuencias de estas subunidades de receptor de primate. Estas secuencias pueden usarse como sondas para detectar niveles de los receptores en pacientes que se sospecha que tienen un trastorno inmunológico, o para evaluar variación polimórfica. La preparación de tanto secuencias de nucleótidos de ARN como de ADN, el marcado de las secuencias y el tamaño preferido de las secuencias ha recibido una amplia descripción y discusión en la bibliografía. Normalmente, una sonda de oligonucleótidos debe tener al menos aproximadamente 14 nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, y las sondas de polinucleótidos pueden tener hasta varias kilobases. Pueden emplearse diversas marcas, lo más comúnmente radionúclidos, particularmente ^{32}P . Sin embargo, también pueden emplearse otras técnicas, tales como usar nucleótidos modificados con biotina para la introducción en un polinucleótido. La biotina sirve entonces de sitio para unirse a avidina o anticuerpos, que pueden marcarse con una amplia variedad de marcas, tales como radionúclidos, agentes fluorescentes, enzimas o similares. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, que incluyen dúplex de ADN, dúplex de ARN, dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos pueden marcarse a su vez y llevarse a cabo el ensayo cuando el dúplex está unido a una superficie, de manera que tras la formación del dúplex sobre la superficie, pueda detectarse la presencia del anticuerpo unido al dúplex. El uso de sondas para el ARN antisentido novedoso puede llevarse a cabo en cualquier técnica convencional tal como hibridación de ácidos nucleicos, cribado más y menos, sondaje recombinante, traducción liberada híbrida (HRT) y traducción detenida híbrida (HART). Esto también incluye técnicas de amplificación tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

También se contemplan kits de diagnóstico que también prueban la presencia cualitativa o cuantitativa de otros marcadores. El diagnóstico o pronóstico puede depender de la combinación de múltiples indicaciones usadas como marcadores. Así, los kits pueden probar combinaciones de marcadores. Véanse, por ejemplo, Viallet y col. (1989)

Progress in Growth Factor Res. 1:89-97.

VIII. Utilidad terapéutica

Esta divulgación proporciona reactivos con valor terapéutico significativo. El receptor (que se produce de modo natural o recombinante), fragmentos del mismo, construcciones solubles y anticuerpos, junto con compuestos identificados como que tienen afinidad de unión por el receptor, son útiles en el tratamiento de afecciones que presentan expresión anormal de la citocina o receptor. Tal anomalía se manifestará normalmente por trastornos inmunológicos o de otro modo, como se ha descrito. Adicionalmente, esta divulgación proporciona valor terapéutico en diversas enfermedades o trastornos asociados a expresión anormal o desencadenamiento anormal de respuesta a la interleucina.

Además, los perfiles de expresión de subunidades de receptor funcionales sugieren que las células deben ser sensibles al ligando, por ejemplo, IL-B50. En particular, células del linaje linfóide, por ejemplo, macrófagos y células dendríticas, expresan ambas subunidades en cantidades estequiométricas suficientes para formar complejos funcionales. En

particular, como la IL-7R α es compartida con el ligando IL-7, se esperaría que gran parte de la ruta de señalización fuera muy similar a IL-7. Así, gran parte de la biología de las mismas células estará estrechamente relacionada. A diferencia, la expresión de las subunidades del receptor de IL-B50 en diferentes tipos de células sugiere que se produce la señalización para aquellos tipos de células, y tendrá efectos sobre la fisiología efectuada por tales tipos de células. Un antagonista, muteína o anticuerpo podría demostrar ser muy útil en aquellas situaciones. Véase Rich (ed.) Clinical Immunology: Principles and Practice, Mosby.

Los linfocitos T auxiliares median en funciones efectoras en enfermedades infecciosas, alérgicas o autoinmunitarias mediante la producción de citocinas. Los linfocitos T CD4+ pueden dividirse en subconjuntos Th1 y Th2 basándose en su perfil de citocinas tras la estimulación de antígeno. Recientemente se han obtenido pruebas de que las células Th1 y Th2 se diferencian en la sensibilidad y expresión del receptor. El enlace mediante la expresión de TARC en respuesta a IL-B50, y producción de citocinas tipo Th2, sugiere el efecto sobre respuestas Th2. El perfil de expresión de las proteínas aquí descritas indica que IL-B50 es el ligando para el complejo de receptor funcional y, como tal, podría ser importante para funciones efectoras de Th2.

El receptor soluble recombinante puede ser útil como antagonista, anticuerpos contra las subunidades de receptor o complejo, o los anticuerpos para IL-B50 o citocina muteínas pueden purificarse y luego administrarse a un paciente. Estos reactivos pueden combinarse para su uso terapéutico con principios activos adicionales, por ejemplo, en vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales, junto con estabilizadores y excipientes fisiológicamente inocuos. Estas combinaciones pueden ser estériles, por ejemplo, filtrarse y disponerse en formas de dosificación como por liofilización en viales de dosificación o almacenamiento en preparaciones acuosas estabilizadas. La presente invención también contempla el uso de anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que no se unen al complemento.

Pueden realizarse otros análisis para identificar moléculas adicionales implicadas en el receptor para la citocina, por ejemplo, subunidades de receptor adicionales. Luego pueden utilizarse ensayos biológicos posteriores para determinar si aquellos componentes de receptor adicionales pueden afectar la transducción de señales, que pueden bloquear proporcionar medios para tratar adicionalmente mecanismos o estructuras en las rutas de señalización. Los fragmentos de receptor, por ejemplo, construcciones de receptor soluble, o muteínas de ligando, pueden usarse como bloqueante o antagonista que bloquea la actividad de IL-B50. En cambio, un compuesto que tiene actividad estimulante intrínseca puede activar el receptor y es así un agonista porque simula la actividad de IL-B50.

Las cantidades de reactivos necesarias para la terapia eficaz dependerán de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados. Así, las dosificaciones de tratamiento deben valorarse para optimizar la seguridad y eficacia. Normalmente, las dosificaciones usadas *in vitro* pueden proporcionar orientación útil en las cantidades útiles para administración *in situ* de estos reactivos. Las pruebas en animales de dosis eficaces para el tratamiento de trastornos particulares proporcionarán adicionalmente indicación predictiva de dosificación humana. Se describen diversas consideraciones, por ejemplo, en Gilman y col. (eds.

1990) Goodman y Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª ed., Pergamon Press; y Remington's Pharmaceutical Sciences, (ed. actual), Mack Publishing Co., Easton, Penn. Los procedimientos para administración se tratan en ese documento y más adelante, por ejemplo, para administración oral, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular, difusión transdérmica, y otras. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluirán agua, solución salina, tampones y otros compuestos descritos, por ejemplo, en Merck Index, Merck & Co., Rahway, Nueva Jersey. Generalmente se esperaría que los intervalos de dosificación estuvieran en cantidades inferiores a concentraciones de 1 mM, normalmente inferiores a concentraciones de aproximadamente 10 μ M, normalmente inferiores a aproximadamente 100 nM, preferentemente inferiores a aproximadamente 10 pM (picomolar), y lo más preferentemente inferiores a aproximadamente 1 fM (femtomolar), con un vehículo apropiado. Frecuentemente se utilizarán formulaciones de liberación lenta, o aparato de liberación lenta, para administración continua.

Las subunidades de receptor, complejos de subunidades, fragmentos de los mismos y anticuerpos o sus fragmentos, antagonistas y agonistas, o vectores que codifican cualquiera de las entidades mencionadas, pueden administrarse directamente al huésped que va a tratarse o, dependiendo del tamaño de los compuestos, puede desearse conjugarlos con proteínas portadoras tales como albúmina de huevo o albúmina de suero antes de su administración. Las formulaciones terapéuticas pueden administrarse en muchas formulaciones de dosificación convencionales. Aunque es posible administrar el principio activo solo, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica. Las formulaciones comprenden al menos un principio activo, como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables del mismo. Cada vehículo debe ser tanto farmacéuticamente como fisiológicamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros componentes y no perjudicial para el paciente. Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, nasal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier procedimiento muy conocido en la técnica de la farmacia. Véanse, por ejemplo, Gilman y col. (eds. 1990) Goodman y Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª ed., Pergamon Press; y

Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avis y col. (eds. 1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, NY; Lieberman y col. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, NY; y Lieberman y col. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, NY.

- 5 Otro enfoque terapéutico incluido dentro de la invención implica la administración directa de reactivos o composiciones por cualquier técnica de administración convencional (por ejemplo, pero no limitado a, inyección local, inhalación o administrado sistémicamente) al sujeto con un trastorno médico apropiado. El reactivo, formulación o composición también puede elegir como diana células específicas o receptores mediante procedimientos descritos en el presente documento. La presente dosificación de reactivo, formulación o composición que modula un trastorno inflamatorio depende de muchos factores, que incluyen el tamaño y salud de un organismo. Véanse, por ejemplo, Spilker (1984) Guide to Clinical Studies and Developing Protocols, Raven Press, Nueva York, particularmente las páginas 7-13, 54-60; Spilker (1991) Guide to Clinical Trials, Raven Press, Nueva York, especialmente las páginas 93-101; Craig y Stitzel (eds. 1986) Modern Pharmacology 2ª ed., Little, Brown, Boston, especialmente las páginas 127-33; Speight (ed. 1987) Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3ª ed., Williams y Wilkins, Baltimore, páginas 50-56; y Tallarida y col. (1988) Principles in General Pharmacology, Springer-Verlag, Nueva York, páginas 18-20; que describen cómo determinar la dosificación apropiada. Generalmente se administran dosis en el intervalo de entre aproximadamente 0,5 ng/ml y 500 µg/ml, incluida la concentración final, por día a un adulto en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La terapia de la presente invención puede combinarse con o usarse en asociación con otros agentes terapéuticos dirigidos a las afecciones indicadas, particularmente antagonistas de otros miembros de la familia de IL-7.

EL complejo de receptor de IL-B50 forma la base para el desarrollo de fármacos antagonistas (por ejemplo, anticuerpos humanizados anti-receptor humano). IL-B50 puede formar una parte integral de la defensa del linaje inmune linfoide. IL-B50 parece señalizar mediante las rutas de moléculas de STAT3 y STAT5.

EJEMPLOS

25 I. Procedimientos generales

- Algunos de los procedimientos convencionales se describen o citan, por ejemplo, en Maniatis y col. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.), vols 1-3, CSH Press, NY; Ausubel y col., Biology, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; o Ausubel y col. (1987 y suplementos) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, Nueva York. Los procedimientos para la purificación de proteínas incluyen procedimientos tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna, electroforesis, centrifugación, cristalización y otros. Véanse, por ejemplo, Ausubel y col. (1987 y suplementos periódicos); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification" en Meth. Enzymol., vol. 182, y otros volúmenes en esta serie; y bibliografía del fabricante sobre el uso de productos de purificación de proteínas, por ejemplo, Pharmacia, Piscataway, N.J., o Bio-Rad, Richmond, CA. La combinación con técnicas recombinantes permite la fusión con segmentos apropiados, por ejemplo, con una secuencia de FLAG o un equivalente que puede fusionarse mediante una secuencia eliminable por proteasa. Véanse, por ejemplo, Hochuli (1989) Chemische Industrie 12:69-70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" en Setlow (ed.) Genetic Engineering, Principle and Methods 12:87-98, Plenum Press, N.Y.; y Crowe y col. (1992) QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA.
- 40 El análisis de secuencias por ordenador se realiza, por ejemplo, usando programas de software disponibles que incluyen aquellos de GCG (U. Wisconsin) y fuentes de GenBank. También se usaron bases de datos de secuencias públicas, por ejemplo, de GenBank y otros.

Muchas técnicas aplicables al receptor de IL-10 pueden aplicarse a IL-7Rα y/o Rδ2, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.985.828, que se incorpora en el presente documento por referencia para todos los fines.

45 II. Amplificación de fragmentos de receptor por PCR

- La clonación de receptores humanos se realiza mediante procedimientos convencionales. También pueden usarse diversos procedimientos de amplificación de secuencias diana, tales como la reacción en cadena de la polimerasa, para preparar ADN que codifica estas proteínas o polipéptidos de receptor. La tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usa para amplificar tales secuencias de ácidos nucleicos directamente a partir de ARNm, de ADNc y de bibliotecas genómicas o bibliotecas de ADNc. Esto permite procedimientos de diagnóstico que permiten la

determinación de la variedad polimórfica o poblacional, muchos de los cuales podrían afectar la fisiología o función del producto génico resultante. Tal puede permitir recoger información predictiva para diagnosticar la enfermedad o predecir respuesta terapéutica.

5 En técnicas de PCR se sintetizan cebadores de oligonucleótidos complementarios a dos regiones de 5' en la región de ADN que va a amplificarse. La reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo entonces usando los dos cebadores.

Véase Innis y col. (ed. actuales) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego, CA. Los cebadores pueden seleccionarse para amplificar las regiones enteras que codifican proteínas de receptor de longitud completa o para amplificar segmentos de ADN más pequeños según se desee. Una vez se amplifican por PCR tales regiones, pueden secuenciarse y pueden prepararse sondas de oligonucleótidos a partir de la secuencia obtenida
10 usando técnicas convencionales.

Los oligonucleótidos para su uso como sondas se sintetizan químicamente según el procedimiento de triéster de fosforamido en fase sólida descrito por Beaucage y Carruthers (1983) Tetrahedron Lett. 22(20): 1859-1862, o usando un sintetizador automatizado, como se describe en Needham-VanDevanter y col. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 6159-6168. La purificación de oligonucleótidos se realiza, por ejemplo, por electroforesis en gel de acrilamida nativa o por HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson y Regnier (1983) J. Chrom. 255: 137-149. La secuencia del oligonucleótido sintético puede verificarse usando el procedimiento de degradación química de Maxam y Gilbert en Grossman y Moldave (eds. 1980) Methods in Enzymology 65:499-560 Academic Press, Nueva York.
15

Los segmentos de péptido, junto con la comparación con genes homólogos, también pueden usarse para producir oligonucleótidos apropiados para cribar una biblioteca. El código genético puede usarse para seleccionar oligonucleótidos apropiados útiles como sondas para el cribado. En combinación con las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los oligonucleótidos sintéticos serán útiles en seleccionar clones deseados de una biblioteca.
20

También se usarán secuencias complementarias como sondas o cebadores. Basándose en la identificación del probable extremo amino, otros péptidos deben ser particularmente útiles, por ejemplo, acoplados con vector anclado o técnicas de PCR complementaria a poli-A o con ADN complementario de otros péptidos.

25 Para identificar una proteína de receptor homóloga se diseñan oligonucleótidos degenerados. Los cebadores se usan para reacción en cadena de la polimerasas en, por ejemplo, ADN genómico seguido de subclonación de los productos de PCR usando sitios de restricción situados en los extremos 5' de los cebadores, recogiendo colonias de *E. coli* individuales que llevan estos insertos subclonados y usando una combinación de análisis de secuenciación e hibridación al azar para eliminar otros miembros de la familia conocidos.

30 Posteriormente, los productos de PCR se purifican en gel, se digieren con enzimas de restricción apropiadas, se purifican en gel de nuevo y se subclonan en el vector Bluescript (Stratagene, San Diego, CA). Colonias bacterianas que llevan subclones individuales se recogen en placas de microtitulación de 96 pocillos y se preparan múltiples réplicas sembrando las células sobre nitrocelulosa. Los filtros replicados se hibridan con sondas que representan miembros conocidos de la familia de receptores de IL-7, y se prepara ADN a partir de colonias de no hibridación para el análisis de secuencias.

35 Se seleccionan dos cebadores directos e inversos apropiados usando las secuencias suministradas en el presente documento (véanse las Figuras 1 y 2) y conocimiento común. Véanse, por ejemplo, Innis y col. (ed. actuales) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego, CA; y Dieffenbach y Dveksler (ed. actuales) PCR Primer: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, CSH, NY. Se usa RT-PCR en una muestra de ARNm apropiada seleccionada para la presencia de mensajero para producir un ADNc, por ejemplo, una muestra de células de monocito o macrófago.
40

Pueden aislarse clones de longitud completa por hibridación de bibliotecas de ADNc de tejidos apropiados previamente seleccionados por señal de PCR.

Como se sabe comúnmente, los cebadores de PCR se diseñan normalmente para contener al menos 15 nucleótidos, por ejemplo, 15-30 nucleótidos. El diseño de cebadores específicos que contienen 21 nucleótidos, por ejemplo, que codifican los polipéptidos apropiados que contienen al menos 4 aminoácidos de las secuencias de IL7R α o R δ 2, se describe del siguiente modo. Otros cebadores de PCR diseñados para amplificar otros fragmentos de receptor de polipéptidos se diseñarán de un modo similar, por ejemplo, cebadores de mutagénesis. Preferentemente, la mayoría o todos los nucleótidos en un cebador tal codifican aminoácidos conservados, por ejemplo, residuos de aminoácidos de SEC ID N°: 2 ó 4. Por ejemplo, pueden usarse cebadores que contienen al menos el 40 % de aminoácidos conservados de IL-7R α o R δ 2. Una vez se han seleccionado aminoácidos apropiados como moldes contra los que van a diseñarse secuencias de cebadores, los cebadores pueden sintetizarse usando, por ejemplo, procedimientos químicos convencionales. Debido a la degeneración del código genético y el sesgo de variantes de especie preferidas, tales cebadores deben diseñarse para incluir secuencias degeneradas apropiadas, como puede determinarse fácilmente usando conocimiento común.
45
50

III. Distribución en tejido de IL-7R α o R δ

El mensajero para el gen que codifica IL-7R α se ha detectado en una biblioteca de ADNc humana, en células dendríticas y monocitos. El mensajero para R δ se ha detectado en células dendríticas, monocitos, NK y algunos linfocitos T. Ambos se encuentran en ciertas CD y ciertas muestras de monocitos, que indica que los componentes de receptores funcionales están en aquellas células.

Análisis Southern: ADN (5 μ g) de una biblioteca de ADNc amplificado primario se digiere con enzimas de restricción apropiadas para liberar los insertos, se ejecuta sobre un 1 % de gel de agarosa y se transfiere a una membrana de nailon (Schleicher y Schuell, Keene, NH).

Las muestras para el aislamiento de ARNm humano podrían incluir: células mononucleares de sangre periférica (monocitos, linfocitos T, células NK, granulocitos, linfocitos B), en reposo (T100); células mononucleares de sangre periférica, activadas con anti-CD3 reunidas durante 2, 6, 12 h (T101); linfocito T, clon de TH0 Mot 72, en reposo (T102); linfocito T, clon de TH0 Mot 72, activado con anti-CD28 y anti-CD3 durante 3, 6, 12 h reunido (T103); linfocito T, clon de TH0 Mot 72, anérgico tratado con péptido específico durante 2, 7, 12 h reunido (T104); linfocito T, clon de TH1 HY06, en reposo (T107); linfocito T, clon de TH1 HY06, activado con anti-CD28 y anti-CD3 durante 3, 6, 12 h reunido (T108); linfocito T, clon de TH1 HY06, anérgico tratado con péptido específico durante 2, 6, 12 h reunido (T109); linfocito T, clon de TH2 HY935, en reposo (T110); linfocito T, clon de TH2 HY935, activado con anti-CD28 y anti-CD3 durante 2, 7, 12 h reunido (T111); linfocitos T linfocitos T CD4+CD45RO polarizados 27 días en anti-CD28, IL-4, y anti-IFN- γ , TH2 polarizado, activado con anti-CD3 y anti-CD28 4 h (T116); líneas tumorales de linfocitos T Jurkat y Hut78, en reposo (T117); clones de linfocitos T, AD130.2, Tc783.12, Tc783.13, Tc783.58, Tc782.69 reunidos, en reposo (T118); linfocito T al azar clones de linfocitos T de $\gamma\delta$, en reposo (T119); esplenocitos, en reposo (B100); esplenocitos, activados con anti-CD40 y IL-4 (B101); líneas de BEV de linfocitos B reunidas WT49, RSB, JY, CVIR, 721,221, RM3, HSY, en reposo (B102); línea de linfocitos B JY, activada con PMA e ionomicina durante 1, 6 h reunida (B103); clones de NK 20 reunidos, en reposo (K100); clones de NK 20 reunidos, activados con PMA e ionomicina durante 6 h (K101); clon de NK, derivado de sangre periférica de paciente con leucemia LGL, tratado con IL-2 (K106); clon de NK citotóxico 640-A30-1, en reposo (K107); línea precursora hematopoyética TF1, activada con PMA e ionomicina durante 1, 6 h reunida (C100); línea premonocítica U937, en reposo (M100); línea premonocítica U937, activada con PMA e ionomicina durante 1, 6 h reunida (M101); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , anti-IL-10 durante 1, 2, 6, 12, 24 h reunidos (M102); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , IL-10 durante 1, 2, 6, 12, 24 h reunidos (M103); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , anti-IL-10 durante 4, 16 h reunidos (M106); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , IL-10 durante 4, 16 h reunidos (M107); monocitos elutriados, activados con LPS durante 1 h (M108); monocitos elutriados, activados con LPS durante 6 h (M109); CD 70 % de CD1a+, de GM-CSF CD34+, TNF α 12 días, en reposo (D101); CD 70 % de CD1a+, de GM-CSF CD34+, TNF α 12 días, activadas con PMA e ionomicina durante 1 h (D102); CD 70 % de CD1a+, de GM-CSF CD34+, TNF α 12 días activadas con PMA e ionomicina durante 6 h (D103); CD 95 % de CD1a+, de GM-CSF CD34+, TNF α 12 días clasificadas por FACS, activadas con PMA e ionomicina durante 1, 6 h reunidas (D104); CD 95 % de CD14+, de GM-CSF CD34+, TNF α 12 días clasificadas por FACS, activadas con PMA e ionomicina 1, 6 h reunidas (D105); CD CD1a+ CD86+, de GM-CSF CD34+, TNF α 12 días clasificadas por FACS, activadas con PMA e ionomicina durante 1, 6 h reunidas (D106); CD de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, en reposo (D107); CD de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, en reposo (D108); CD de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, activadas con LPS 4, 16 h reunidas (D109); CD de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, activadas con TNF α , monocito supe durante 4, 16 h reunidas (D110); tumor benigno de leiomioma L11 (X101); miometrio normal M5 (O115); leiomioma maligno GS1 (X103); línea de sarcoma de fibroblasto de pulmón MRC5, activada con PMA e ionomicina durante 1, 6 h reunida (C101); línea celular de carcinoma epitelial de riñón CHA, activada con PMA e ionomicina durante 1, 6 h reunida (C102); riñón fetal masculino de 28 semanas (O100); pulmón fetal masculino de 28 semanas (O101); hígado fetal masculino de 28 semanas (O102); corazón fetal masculino de 28 semanas (O103); cerebro fetal masculino de 28 semanas (O104); vesícula biliar fetal masculina de 28 semanas (O106); intestino delgado fetal masculino de 28 semanas (O107); tejido adiposo fetal masculino de 28 semanas (O108); ovario fetal hembra de 25 semanas (O109); útero fetal hembra de 25 semanas (O110); testículo fetal masculino de 28 semanas (O111); bazo fetal masculino de 28 semanas (O112); placenta adulta de 28 semanas (O113); y amígdalas inflamadas, de 12 años de edad (X100).

IV. Producción de proteína de receptor de mamífero

Normalmente, la co-expresión será útil, y pueden prepararse construcciones para producir receptores solubles. Esto pueden efectuarse por una construcción policistónica en células apropiadas, o por construcción de vectores que coexpresan ambas subunidades de receptor juntas. Alternativamente, pueden producirse construcciones de fusión, por ejemplo, para generar anticuerpos.

Una construcción apropiada se manipula para la expresión, por ejemplo, en *E. coli*. Por ejemplo, se construye un plásmido IGIF pGex de ratón y se transforma en *E. coli*. Células recientemente transformadas se cultivan en medio LB que contiene 50 μ g/ml de ampicilina y se inducen con IPTG (Sigma, St. Louis, MO). Después de la inducción durante la noche, las bacterias se recogen y los sedimentos que contienen receptores se aíslan. Los sedimentos se homogeneizan en tampón

TE (Tris-base 50 mM a pH 8,0, EDTA 10 mM y Pefabloc 2 mM) en 2 litros. Este material se pasa tres veces por un microfluidizador (Microfluidics, Newton, MA). El sobrenadante fluidizado se centrifuga en un rotor Sorvall GS-3 durante 1 h a 13.000 rpm. El sobrenadante resultante que contiene el receptor se filtra y se pasa por una columna de glutatión-SEPHAROSE equilibrada en Tris-base 50 mM a pH 8,0. Las fracciones que contienen la proteína de receptor se reúnen y se escinden con trombina (Enzyme Research Laboratories, Inc., South Bend, IN). El conjunto escindido se pasa entonces sobre una columna de Q-SEPHAROSE equilibrada en Tris-base 50 mM. Las fracciones que contienen receptor se reúnen y se diluyen en H₂O destilada fría para reducir la conductividad, y se pasan de nuevo sobre una nueva columna de Q-SEPHAROSE. Las fracciones que contienen receptor se reúnen, se toman en alícuotas y se guardan en el congelador a -70 °C.

La comparación del espectro de CD con receptor funcional puede sugerir que la proteína está correctamente plegada. Véase Hazuda y col. (1969) J. Biol. Chem. 264:1689-1693.

Expresión de proteínas y purificación de receptor humano: Vectores adenovirales que contienen receptores humanos de longitud completa se construyen por PCR y se usan para transfectar, por ejemplo, células de encapsidación de Q293. Los virus producidos se purifican posteriormente, con todos los procedimientos según los protocolos del fabricante (Invitrogen). Se preparan proteínas de receptor, por ejemplo, a partir de 5×10^8 células Q293 infectadas (adenovirus a MOI 10) que posteriormente se incuban durante 5 días en una factoría de células en un volumen total de 1 l de medio CMF-1 libre de suero (Gibco BRL). El medio de cultivo se dializa (tubo de membrana Spectra/Por, corte de MW: 6-8 kD) contra Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, y posteriormente se pasa sobre columnas Hitrap Q Sepharose y de heparina. El flujo continuo, que contiene las proteínas de receptor, se esteriliza por filtración y se concentra aproximadamente 70 veces usando una celda de ultrafiltración Amicon 8400 con una membrana de corte de MW de 10 kD. Las muestras se dializan contra PBS, y el contenido de proteína se cuantifica por PAGE y tinción con azul de Coomassie usando lisozima como patrón. Las identidades de proteína se confirman, por ejemplo, por secuenciación del extremo N. Células Q293 idénticamente tratadas infectadas con adenovirus que codifican proteína verde fluorescente proporcionan un control de vector vacío. Los niveles de endotoxina se determinan usando el ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (BioWhittaker) y entonces fueron inferiores a 4 UE/ml. Las muestras de proteína se guardan a 4 °C.

Vectores de expresión: para expresión de mamíferos se construyen vectores que codifican receptor humano de longitud completa insertando fragmentos de ADNc generados por PCR en pME 18S. Kitamura y col. (1991) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:5082-5086.

V. Preparación de anticuerpos específicos para complejo de receptor

Ratones Balb/c endogámicos se inmunizan intraperitonealmente con formas recombinantes de la proteína, por ejemplo, receptor soluble purificado-FLAG o células NIH-3T3 transfectadas estables. Los animales se refuerzan en momentos de tiempo apropiados con proteína o células, con o sin adyuvante adicional, para estimular adicionalmente la producción de anticuerpos. El suero se recoge, o se producen hibridomas con bazos recogidos.

Alternativamente, ratones Balb/c se inmunizan con células transformadas con el gen o fragmentos del mismo, tanto células endógenas como exógenas, o con membranas aisladas enriquecidas para la expresión del antígeno. El suero se recoge en el momento apropiado, normalmente después de numerosas otras administraciones. Pueden ser útiles diversas técnicas de terapia génica, por ejemplo, en producir proteína *in situ*, para generar una respuesta inmunitaria.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, se fusionan esplenocitos con un componente de fusión apropiado y se seleccionan hibridomas en medio de crecimiento mediante procedimientos convencionales. Se criban sobrenadantes de hibridoma para la presencia de anticuerpos que se unen al receptor deseado, por ejemplo, por ELISA u otro ensayo. También pueden seleccionarse o prepararse anticuerpos que reconocen específicamente receptor o complejo.

En otro procedimiento, péptidos sintéticos o proteína purificada se presentan a un sistema inmunitario para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véanse, por ejemplo, Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; y Harlow y Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press. En situaciones apropiadas, el reactivo de unión tanto se marca como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, fluorescencia o de otro modo, como se inmoviliza a un sustrato para procedimientos de inmunopurificación. También pueden introducirse ácidos nucleicos en células en un animal para producir el antígeno, que sirve para provocar una respuesta inmunitaria. Véanse, por ejemplo, Wang y col. (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 90:4156-4160; Barry y col. (1994) BioTechniques 16:616-619; y Xiang y col. (1995) Immunity 2: 129-135.

VI. Actividad biológica de IL-B50 y complejos con IL-7R α y R δ 2

Se realizaron varios experimentos con el fin de evaluar el complejo de receptor de señalización para IL-B50, además de la función biológica de IL-B50. En los siguientes ejemplos, el término "TSLP humana" o "hTSLP" se usan indistintamente

con el término IL-B50. Adicionalmente, el término "TSLPR humano" o "hTSLPR" se usan indistintamente con el término R δ 2. Materiales y procedimientos usados en los siguientes experimentos fueron del siguiente modo.

Líneas celulares. Células epiteliales 293T humanas se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Life Technologies Inc.) complementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF) (LTBMC). La línea celular Pro-B Ba/F3 se mantuvo en medio RPMI 1640 (Life Technologies Inc.) complementado con 10 % de suero bovino fetal y 10 ng/ml de IL-3 de ratón. Células renales embrionarias humanas QBI-293A usadas para la expresión de adenovirus se cultivaron en medio CMF-1 (CellWorks, San Diego, CA). Células BOSC23 se mantuvieron en DMEM-10 % de SBF y reactivos de selección de guanina fosforibosiltransferasa (GPT) (Specialty Media). Las células se transfirieron a medio Eagle modificado por Dulbecco-10 % de SBF sin reactivos de selección de GPT 2 días antes de la transfección.

Expresión de adenovirus de TSLP humana (IL-B50) y purificación de la proteína recombinante. La región codificante madura de TSLP humana (residuos 1-131 de la Figura 3) se fusionó con la secuencia señal de ratón SLAM (Bates y col. (1999) J. Immunol. 163:1973) y se insertó en una versión modificada de vector de transferencia pQB1-AdCMV5-GFP (Quantum Biotechnologies Inc.) por PCR. Se produjo adenovirus recombinante como se describe en el manual de aplicación de Quantum 24AL98. Se usó virus recombinante para infectar 5×10^8 células en 1 l de CMF-1 con cultivo en una factoría de células Nunc (Nalge Nunc Int., Naperville, IL) durante 3 días. El medio de cultivo se clarificó por centrifugación, se dializó y se filtró antes de la aplicación a una columna de Q-Sepharose de 5 ml. El flujo continuo de Q-Sepharose, que contuvo TSLP humana, se cargó sobre una columna de heparina HiTrap de 5 ml (Pharmacia, Uppsala, Suecia) a 5 ml/min. La columna se lavó con Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, EDTA 1 mM, y se eluyó con un gradiente de NaCl 0-2,5 M en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, EDTA 1 mM. Las fracciones pico se concentraron, se dializaron contra PBS y se cuantificaron por SDS-PAGE y tinción con Coomassie usando lisozima como patrón. Se siguió un procedimiento para preparar TSLP de ratón.

Ensayos de proliferación y transferencia génica mediada por retrovirus de Ba/F3. Se clonaron ADNc de IL-7R humano y ADNc de TSLPR humano por PCR en los vectores retrovíricos pMX y su derivado pMX-puro para dar pMX-hIL-7R α y pMX-puro-TSLPR, respectivamente (Kitamura, T. (1998) Int. J. Hematol. 67:351). Las línea celular de encapsidación BOSC23 se transfectó transitoriamente con construcciones de retrovirus usando Eugene 6 (GIBCO BRL) según el protocolo del fabricante. Los sobrenadantes que contienen retrovirus se recogieron después de dos días. Células Ba/F3 se infectaron con sobrenadantes retrovirales durante 48 h sobre placas de petri recubiertas con 40 μ g/ml de fragmentos de fibronectina recombinante (Retronectin, Takara). Después de 48 h se añadió puromicina (1 μ g/ml) a aquellas células infectadas por el virus obtenidas de construcciones pMX-puro. La eficiencia de infección de células Ba/F3 fue superior al 90 % como se evaluó por infección paralela con la construcción de prueba pMXI-EGFP que codifica la proteína verde fluorescente (EGFP) potenciada. Los ensayos de proliferación usando células Ba/F fueron como se ha descrito previamente (Ho y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11267). Las células se lavaron tres veces con medio RPMI y se sembraron a una densidad de 5000 células/pocillo. Las células se cultivaron con diluciones triples seriadas de IL-3 de ratón, TSLP humana y de ratón o IL-7 humana (todas a partir de concentraciones de 225 ng/ml). Después de 36 h a 37 °C se añadió el indicador Alamar Blue ® REDOX (Trek Diagnostic Systems) a una concentración final del 10 % (vol/vol) a cada pocillo. Las células se dejaron cultivar durante 5-8 horas más después de que las placas se midieran por un fluorímetro.

Cuantificación de la expresión de ARNm. Bibliotecas de ADNc de diversos tejidos y fuentes celulares se prepararon como se ha descrito previamente (Bolin y col. (1997) J. Neurosci. 17:5493) y se usaron como moldes para análisis de Taqman-PCR. Se analizaron ADNc (50 ng por reacción) para la expresión de genes hTSLP, hTSLPR y hIL7R α por el ensayo de PCR de 5'-nucleasa fluorogénica (Holland y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276) usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (Perkin Elmer, Foster City, CA). Las reacciones se incubaron durante 2 min a 50 °C, se desnaturalizaron durante 10 min a 95 °C y se sometieron a 40 ciclos de amplificación de dos etapas con hibridación/extensión a 60 °C durante 1 min, seguido de desnaturalización a 95 °C durante 15 s. Los amplicones usados para hTSLP, hTSLPR y IL-7R α cubrieron los pb 246-315, pb 263-335 y pb 519-596, respectivamente (la numeración empieza en el codón de iniciación) y se analizaron con sondas marcadas con FAM. Los valores se expresaron como fg/50 ng de ADNc total. Los cebadores y sondas para quimiocina humana y receptores de quimiocina se obtuvieron de Perkin-Elmer como reactivos de ensayo PreDeveloped (PDAR). La expresión de quimiocina y del receptor de quimiocina se ajustó para la cantidad de 18SARNr y en comparación con las muestras de control (calibrador) usando el procedimiento de C_T comparativo (Fehniger y col. (1999) J. Immunol. 162:4511). Las muestras se midieron por duplicado. Se determinaron niveles de 18SARNr bajo condiciones limitadas de cebadores en reacciones de múltiplex como se recomienda usando una sonda marcada con Vic (Perkin Elmer, Foster City, CA).

Aislamiento y cultivo de células. Se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de capas leucocitarias de voluntarios sanos (Stanford Blood Bank, Palo Alto, CA) por centrifugación sobre Ficoll. Se aislaron monocitos humanos de PBMC por agotamiento negativo usando mAb anti-CD2 (Leu-5A), anti-CD3 (Leu-4), anti-CD8 (Leu 2a), anti-CD19 (Leu-12), anti-CD20 (Leu-16), anti-CD56 (Leu-19), (BD, San Jose CA), anti-CD67 (IOM 67) (Immunotech, Westbrook, ME) y anti-glicoforina A (10F7MN, ATCC, Rockville, MD) y de oveja anti-IgG de ratón acoplados a perlas magnéticas (Dynal, Oslo, Noruega) como se ha descrito previamente (Koppelman y col. (1997) Immunity 7:861). Los

monocitos se cultivaron en RPMI + 10 % de SBF a una densidad de 10^6 células/ml en presencia o ausencia de IL-7 (50 ng/ml) y/o hTSLP (50 ng/ml) durante 24 h y los sobrenadantes de cultivo y células se recogieron para la cuantificación de la producción de citocinas o los análisis de expresión génica. Se aislaron células dendríticas (CD) CD11c+ humanas de PBMC como se ha descrito previamente (Kadowaki y col. (2000) J. Exp. Med. 192:219). Brevemente, PBMC se incubaron con mAb anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD56, se agotaron en células de linaje+ usando perlas magnéticas (Dynal) y posteriormente se aislaron CD de sangre de linaje- CD11c+ por citometría para alcanzar una pureza superior al 99 %. Células recientemente clasificadas se cultivaron en RPMI1640 que contiene 10 % de SBF a 5×10^4 /100 μ l en placas de cultivo de media área de 96 pocillos de fondo plano o a 1×10^5 /200 μ l en placas de 96 pocillos de fondo plano, con o sin IL-B50 (15 ng/ml).

Elisa de TARC. La producción de TARC/CCL17 en sobrenadantes de cultivo se determinó por ELISA específico para quimiocinas usando MAB364 como reactivo de captura y BAF364 como reactivo de detección (R&D Systems, Mineápolis MN). La sensibilidad del ensayo fue 50 pg/ml.

Viabilidad de CD y análisis de citometría de flujo. Después de 24 horas de cultivo, CD se recogieron y se suspendieron de nuevo en un medio que contiene EDTA para disociar las agrupaciones. Primero se contaron CD viables usando exclusión con azul de tripano de células muertas. Las células restantes se tiñeron con diversos anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón conjugados con anti-FITC humana que incluyen anti-HLA-DR (Becton Dickinson), anti-CD40, anti-CD80 y CD86 (todos de Pharmingen) o un control de isotipo de Ig-G1 (Becton Dickinson), y se analizaron con un citómetro de flujo FACScan® (Becton Dickinson). Las células muertas se excluyeron basándose en características de dispersión lateral y frontal.

Ensayo de proliferación de linfocitos T. Linfocitos T CD4+/CD45RA+ sin tratamiento previo se aislaron de capas leucocíticas de sangre adulta por agotamiento negativo de células que expresan CD14, CD19, CD56, CD8, CD45RO, HLA-DR y glicoforina A usando perlas magnéticas (Dynal). Más del 95 % de las células purificadas tuvieron el fenotipo de linfocitos T CD4+CD45RA+ sin tratamiento previo. Se lavaron CD CD11c+ dos veces para eliminar cualquier citocina y se co-cultivaron con 5×10^4 linfocitos T CD4+ sin tratamiento previo alogeneicos en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo a relaciones de CD/linfocitos T crecientes. Todos los co-cultivos se llevaron a cabo por triplicado. CD solas y linfocitos T solos se usaron como controles. Después de 5 días, las células se pulsaron con 1 μ Ci de 3 H-timidina (Amersham) durante 16 horas antes de la recogida y el recuento de radiactividad.

Ensayos de activación de Stat3 y Stat5. Células transfectantes Ba/F3 estables ($\sim 2,5 \times 10^7$ células) se privaron de alimento durante 4-6 horas y luego se estimularon hasta 10^6 células/ml durante 15 min con 10 ng/ml de mIL-3 o 30 ng/ml de hTSLP. Después de la estimulación, las células se recogieron y se incubaron durante 15 min a 4 °C en tampón de lisis que contiene Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, NaCl 300 mM, EDTA 2 mM, 0,875 % de Brij 97, 0,125 % de NP40, 10 mg/ml de aprotinina, 10 mg/ml de leupeptina, PMSF 1 mM, Na_3VO_4 1 mM y NaF 1 mM. Los lisados celulares se clarificaron por centrifugación a 12.000 X g durante 15 min, y los sobrenadantes se sometieron a 8 % de SDS-PAGE. Las proteínas se electrotransfirieron sobre membranas de nailon (Immobilon-P, Millipore, Bradford, MA) y se detectaron por análisis de transferencia Western usando Abs de conejo contra anti-fosfo Stat3 y anti-fosfo Stat5 (New England Biolabs) o anti-Stat3 y anti-Stat5 (Santa Cruz Biotechnology), seguido HRP de ratón dirigida contra Ig de conejo. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron con quimioluminiscencia (ECL) potenciada (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce, Rockford, IL) sobre película de ECL (Kodak). Para volver a sondear, las transferencias se sometieron a arrastre con glicina 200 mM, 1 % de SDS, pH 2,5 durante 30 min a 65 °C.

VI.A. Señales de IL-B50 mediante IL-7R α y R δ 2

La citocina IL-B50 humana tiene como homólogos más relacionados IL-7 humana y de ratón y la TSLP de ratón recientemente descrita (Sims y col. (2000) J. Expt'l Med. 192:671-680). En ratón, tanto IL-7 como TSLP sirven de factores de crecimiento y diferenciación de linfocitos T y B. Los complejos de receptor de señalización para IL-7 de ratón y TSLP de ratón consisten en dos subunidades, respectivamente IL-7R α de ratón y R γ c de ratón (receptor común para IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 y IL-15) para IL-7 de ratón, y IL-7R α de ratón y TSLPR de ratón (R δ 1) para el ligando mTSLP (Park y col. (2000) J. Expt'l Med. 192:659-670).

En un intento por identificar el complejo de receptor de señalización para IL-B50 humana, células Ba/F3 se co-transfectaron con construcciones de expresión para IL-7R α humana y un receptor de citocina humana de orfano conocido como R δ 2, una subunidad relacionada con R γ c y mTSLPR (R δ 1), usando los procedimientos descritos anteriormente. No había estado clara ninguna relación funcional entre la subunidad de mTSLPR R δ 1 y R δ 2 humana. Las células Ba/F3 co-transfectadas mostraron una respuesta proliferativa en presencia de hIL-B50, pero no con hIL-7 o medio. Células Ba/F3 transfectadas con tanto hIL-7R α como hR δ 2 solas no mostraron una respuesta proliferativa con hIL-B50. Adicionalmente, no se observó reactividad cruzada entre mTSLP y el complejo de receptor de hTSLP. Estos hallazgos establecen que el complejo de señalización para IL-B50 humana consiste en hIL-7R α y hR δ 2.

El estado de activación correspondiente de Stat5 y Stat3 también se midió en las diversas poblaciones de células BaF3.

Tanto Stat5 como Stat3 se fosforilaron tras la adición de hTSLP, pero solo cuando estuvieron presentes tanto hTSLPR como hIL-7R α .

VI.B. Análisis de expresión de IL-B50, hIL-7R α y hR δ 2

Con el fin de identificar células diana que puedan responder a IL-B50888888, se analizó un gran panel de bibliotecas de ADNc para la expresión simultánea de tanto hIL-7R α como hR δ 2 usando PCR cuantitativa. Los resultados del análisis de expresión, realizado como se describen en Materiales y procedimientos, se presentan en las Figuras 4A-4E. En particular, el análisis de expresión de las dos subunidades de receptor indicaron que se co-expresaron principalmente en células dendríticas activadas, monocitos y linfocitos T (véanse las Figuras 4A-4D), que indica que estos tipos de células responden a IL-B50 humana. Como se muestra en la Figura 4E, IL-B50 se expresó en diversos tipos de tejido, con alta expresión en el pulmón humano.

VI.C. IL-B50 humana induce expresión de quimiocinas en población de monocitos recientemente aislada y CD de sangre CD11c+

El espectro de actividades biológicas inducidas por IL-B50 se investigó basándose en los patrones de expresión solapantes de componentes de receptor de IL-B50. Se preparó ADNc a partir de monocitos humanos cultivados durante 24 h en presencia de IL-B50 o IL-7, y la expresión de 38 quimiocinas humanas y 20 receptores de quimiocina humana se analizaron por PCR cuantitativa en "tiempo real". De forma interesante, IL-B50 (TSLP) y IL-7 influyeron en la expresión de distintos conjuntos de quimiocinas (Tabla 1), pero no afectaron la expresión de receptores de quimiocina. IL-B50 potenció la expresión de TARC/CCL17, DC-CK1/PARC/CCL18, MDC/CCL22 y MIP3 β /CL19. IL-7 también potenció la expresión de TARC/CCL17, MDC/CCL22 y MIP3 β /CCL19, pero además potenció la expresión de IL-8/CXCL8, CTAPIII/CXCL7, ENA78/CXCL5 y GROabg/CXCL123 y disminuyó los niveles de expresión de IP-10/CXCL10, I-TACK/CXCL11, SDF1/CXCL12, MCP2/CCL8 y MCP4/CCL13 (Tabla 1).

Adicionalmente, la capacidad de IL-B50 para estimular CD para producir ARNm para diversas citocinas y quimiocinas se comparó con la de GM-CSF, IL-7, CD40-ligando (CD40L) y medio solo como control, del siguiente modo. CD CD11c+ purificadas se cultivaron durante 15-17 horas con IL-B50 (15 ng/ml), GM-CSF (100 ng/ml), IL-7 (50 ng/ml), linfocitos L transfectados con CD40-ligando (1 linfocito T/4 CD) o medio solo. Se extrajo ARN total y se estudió usando PCR cuantitativa en tiempo real como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en las Figuras 14A y 14C, IL-B50 no estimuló CD humanas para producir ARNm para IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40, TNF- α , MCP-1, MCP-4, Rantes y MIG, pero estimuló CD humanas para producir ARNm para las quimiocinas TARC, MDC y MIP3- β (Figura 14B).

La inducción de proteína TARC por IL-B50 sobre poblaciones de monocitos y células dendríticas se confirmó por ELISA. El nivel de producción de TARC por células dendríticas CD11c+ fue al menos diez veces superior al de los monocitos (Figura 5).

También se examinó la inducción de proteína IL12p75 por IL-B50. Para hacer esto, CD CD11c+ purificadas se cultivaron durante 24 horas con IL-B50 (15 ng/ml), IL-7 (50 ng/ml), linfocitos L transfectados con CD40-ligando (1 linfocito T/4 CD), lipopolisacárido bacteriano (LPS: 1 mg/ml) o medio solo. El sobrenadante de cultivo se recogió y se midió IL12p75 bioactiva usando un kit de ELISA de alta sensibilidad. Como se muestra en la Figura 15, IL-B50 no estimuló CD humanas para producir proteína IL12p75.

Tabla 1. Efectos de IL-B50 y IL-7 sobre la expresión de quimiocinas*

Quimiocina	Medio	IL-B50	IL-7
CCL1	40,0	1,0	1,4
CCL2	24,8	1,0	1,5
CCL3	31,5	0,7	2,0
CCL4	28,9	1,0	1,6
CCL5	30,4	1,1	0,6
CCL7	31,3	0,7	1,4
CCL8	30,2	0,8	0,2
CCL11	40,0	1,6	1,4

(continuación)

Quimiocina	Medio	IL-B50	IL-7
CCL13	37,3	1,6	0,1
CCL14	40,0	1,3	1,3
CCL15	40,0	1,1	1,3
CCL16	40,0	2,2	7,0
CCL17	39,8	195,4	20,1
CCL18	35,8	2,9	1,7
CCL19	36,7	8,5	8,3
CCL20	40,0	1,2	1,2
CCL21	40,0	1,0	1,0
CCL22	34,3	8,8	3,0
CCL24	29,3	2,0	1,2
CCL25	40,0	1,1	1,1
CCL26	38,9	1,1	2,5
CCL27	40,0	0,8	1,2
CCL28	40,0	1,0	1,0
CXCL1-3	28,7	1,0	4,4
CXCL4	27,9	1,2	1,9
CXCL5	28,7	1,1	8,0
CXCL6	40,0	1,5	1,3
CXCL7	28,7	1,1	2,0
CXCL8	27,3	1,4	8,5
CXCL9	34,9	0,6	0,7
CXCL10	29,7	0,6	0,1
CXCL11	32,9	0,7	0,0
CXCL12	33,1	0,6	0,2
CXCL13	35,4	0,2	0,8
CXCL14	39,7	1,0	1,0
XCL1	40,0	0,9	3,8
CX3CL1	40,0	1,4	1,3

* Se cultivaron monocitos humanos en ausencia o presencia de IL-B50 (50 ng/ml) o IL-7 (50 ng/ml) durante 18 h, y la expresión de genes quimiocina se determinó por PCR cuantitativa. Los resultados se expresan como 1) valores de C_T de muestras no activadas y 2) veces de diferencia con respecto a la muestra de calibrador (medio).

VI.D. IL-B50 activa células dendríticas CD11c+.

Las CD de sangre CD11c+ inmaduras recientemente purificadas son conocidas por madurar espontáneamente en cultivo. Como se muestra en la Figura 6A, agrupaciones sueltas e irregulares en el cultivo de CD fueron evidentes después de 24 h en medio solo. En presencia de IL-B50, este proceso de maduración se potenció espectacularmente. CD en cultivo formó agrupaciones apretadas y redondas con finas dendritas visibles en la periferia de cada agrupación (Figura 6B). La maduración inducida por IL-B50 se confirmó analizando el fenotipo superficial de CD usando citometría de flujo. Mientras que IL-B50 reguló ligeramente por incremento la expresión de HLA-DR y CD86, indujo fuertemente las moléculas coestimulantes CD40 y CD80 (Figura 7). Este proceso de maduración estuvo acompañado por un aumento en la viabilidad de las CD. Adicionalmente, IL-B50 fue más potente que CD40-ligando (CD40L) e IL-7 en regular por incremento CD40 y CD80 (Figura 8). Una valoración de IL-B50 usando diluciones logarítmicas de la citocina mostró que tanto el efecto sobre la supervivencia como la inducción de moléculas coestimulantes sobre CD fue máximo a 15 ng/ml y por encima, y todavía significativo a concentraciones de tan solo 15 pg/ml.

Se analizó la capacidad estimulante de linfocitos T de CD CD11+, cultivados 24 h en medio solo o en presencia de IL-B50. Las CD se co-cultivaron con 5×10^4 linfocitos T alogeneicos CD4+CD45RA+ sin tratamiento previo a relaciones CD/linfocitos T crecientes. Como se evalúa por incorporación de ^3H -timidina en el día 5 de co-cultivo, CD cultivadas con IL-B50 indujeron proliferación de linfocitos T sin tratamiento previo hasta 10 veces más fuerte con respecto a CD cultivadas en medio (Figura 9).

Adicionalmente, la capacidad estimulante de linfocitos T de CD CD11+, cultivados con LPS, medio solo, IL-7, CD40-ligando y IL-B50 se comparó determinando la incorporación de ^3H -timidina. Como se muestra en la Figura 10, CD activadas con IL-B50 fueron más potentes que CD activadas con CD40-ligando, IL-7 y LPS en inducir la proliferación de linfocitos T CD4 sin tratamiento previo alogeneicos.

CD, cultivadas en medio solo, IL-B50, CD40-ligando, IL-7 y LPS, se co-cultivaron con linfocitos T CD4 sin tratamiento previo. Después de 6 días de cocultivo, los linfocitos T CD4 se re-estimularon durante 24 horas con anti-CD3 y anti-CD28 y los sobrenadantes de cultivo se analizaron por ELISA para cuantificar la producción de citocinas por linfocitos T. Como se muestra en las Figuras 11A-11E, CD humanas activadas con IL-B50 sensibilizaron linfocitos T CD4 sin tratamiento previo para la producción de IL-4, IL-13 y $\text{TNF-}\alpha$, pero inhibieron la producción de IL-10 e $\text{IFN-}\gamma$.

CD se cultivaron durante 24 horas en medio solo, IL-B50, IL-7, CD40-ligando o LPS, para sensibilizar linfocitos T CD8 sin tratamiento previo purificados durante 6 días en cocultivo. Las CD activadas con IL-B50 indujeron fuertemente la expansión de linfocitos T CD8 sin tratamiento previo alogeneicos (Figura 12), además de la expresión de perforina (Figura 13).

Los datos en el presente documento indican, entre otras cosas, que IL-B50 humana es una novedosa citocina hematopoyética muy estrechamente relacionada con IL-7. Representa un ortólogo humano de mTSLP. La señalización de IL-B50 humana hace uso de la combinación de $\text{hIL-7R}\alpha$ y $\text{hR}\delta 2$, que juntas forman un novedoso receptor de citocina hematopoyético. Ambas subunidades de receptor están en particular presentes en macrófagos y células dendríticas, que indica efectos funcionales de la citocina sobre aquellos tipos de células, y que media en funciones proporcionadas por aquellos tipos de células. La IL-B50 humana también promueve la fosforilación de factores de transcripción STAT3 y STAT5.

Los usos terapéuticos de IL-B50 son evidentes. Por ejemplo, pacientes con SCID con mutaciones en $\text{IL-7R}\alpha$ son deficientes en linfocitos T. Como IL-B50 usa $\text{IL-7R}\alpha$, IL-B50 comparte componentes de la ruta de señalización, y puede desempeñar una función significativa en la diferenciación de linfocitos T humanos y puede potenciar la recuperación de linfocitos T en circunstancias de agotamiento de linfocitos T.

Asimismo, son útiles los antagonistas de IL-B50. Los antagonistas adoptan diversas formas tales como muteínas de ligando, anticuerpos para ligando y anticuerpos para receptor, por ejemplo, que bloquean la unión a ligando. Como la hIL-B50 probablemente desempeña una función en el desarrollo de linfomas de linfocitos T y B, entonces el bloqueo de la señalización de IL-B50, tanto en el ligando como en sus componentes de receptor, es útil en tratamiento de algunos de estos linfomas.

En el presente documento, basándose en los estudios de unión, el mapeo de la subunidad de receptor de hIL-B50 identificado $\text{IL-7R}\alpha$ y el receptor humano novedoso $\text{R}\delta 2$ (un pariente cercano de γc o $\text{IL-2R}\gamma$ humana) como complejo de receptor de señalización (la co-expresión en células Ba/F3 proporciona una señal proliferativa en respuesta a IL-B50). Los perfiles de expresión de receptores indican que tanto $\text{IL-7R}\alpha$ como $\text{R}\delta 2$ se expresaron principalmente en células dendríticas, aunque ambos también se expresaron en monocitos. La expresión de células dendríticas indica una función para la citocina en la maduración de células o rutas importantes en la presentación de antígeno, que indica el uso de la citocina para expansión, por ejemplo, *ex vivo*, de células presentadoras de antígeno.

LISTADO DE SECUENCIAS

- La SEC ID N°: 1 proporciona la secuencia de nucleótidos de IL-7R α de primate.
 La SEC ID N°: 2 proporciona la secuencia de polipéptidos de IL-7R α de primate.
 La SEC ID N°: 3 proporciona la secuencia de nucleótidos de R δ 2 de primate.
 5 La SEC ID N°: 4 proporciona la secuencia de polipéptidos de R δ 2 de primate.
 La SEC ID N°: 5 proporciona la secuencia de nucleótidos de IL-B50 de primate.
 La SEC ID N°: 6 proporciona la secuencia de polipéptidos de IL-B50 de primate.
 <110> Schering Corporation
- 10 <120> Citocinas de mamífero*; receptores; reactivos y procedimientos relacionados
- <130> DX01341 PCT
- <140>
- 15 <141>
- <150> US 60/298.268
 <151> 14-06-2001
- 20 <150> US 60/247.218
 <151> 10-11-2000
- <160> 6
- 25 <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
 <211> 1658
 <212> ADN
- 30 <213> Desconocido
- <220>
 <223> Descripción de organismo desconocido: primate; supuesto humano
- 35 <220>

<221> CDS

<222> (23)..(1399)

<220>

5

<221> mat_peptide

<222> (83)..(1399)

<400> 1

```

ctctctctct atctctctca ga atg aca att cta ggt aca act ttt ggc atg 52
      Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met
      -20                               -15

gtt ttt tct tta ctt caa gtc gtt tct gga gaa agt ggc tat gct caa 100
Val Phe Ser Leu Leu Gln Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln
-10                               -5          -1  1          5

aat gga gac ttg gaa gat gca gaa ctg gat gac tac tca ttc tca tgc 148
Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys
      10                               15          20

tat agc cag ttg gaa gtg aat gga tcg cag cat tca ctg acc tgt gct 196

```

ES 2 424 126 T3

Tyr	Ser	Gln	Leu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala		
		25					30					35					
ttt	gag	gac	cca	gat	gtc	aac	acc	acc	aat	ctg	gaa	ttt	gaa	ata	tgt	244	
Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys		
	40					45				50							
ggg	gcc	ctc	gtg	gag	gta	aag	tgc	ctg	aat	ttc	agg	aaa	cta	caa	gag	292	
Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Val	Lys	Cys	Leu	Asn	Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu		
	55				60					65					70		
ata	tat	ttc	atc	gag	aca	aag	aaa	ttc	tta	ctg	att	gga	aag	agc	aat	340	
Ile	Tyr	Phe	Ile	Glu	Thr	Lys	Lys	Phe	Leu	Leu	Ile	Gly	Lys	Ser	Asn		
			75						80					85			
ata	tgt	gtg	aag	gtt	gga	gaa	aag	agt	cta	acc	tgc	aaa	aaa	ata	gac	388	
Ile	Cys	Val	Lys	Val	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp		
		90						95						100			
cta	acc	act	ata	gtt	aaa	cct	gag	gct	cct	ttt	gac	ctg	agt	gtc	atc	436	
Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu	Ser	Val	Ile		
		105					110					115					
tat	cgg	gaa	gga	gcc	aat	gac	ttt	gtg	gtg	aca	ttt	aat	aca	tca	cac	484	
Tyr	Arg	Glu	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Val	Val	Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His		
	120					125					130						
ttg	caa	aag	aag	tat	gta	aaa	gtt	tta	atg	cat	gat	gta	gct	tac	cgc	532	
Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg		
	135				140					145					150		
cag	gaa	aag	gat	gaa	aac	aaa	tgg	acg	cat	gtg	aat	tta	tcc	agc	aca	580	
Gln	Glu	Lys	Asp	Glu	Asn	Lys	Trp	Thr	His	Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr		
				155					160					165			
aag	ctg	aca	ctc	ctg	cag	aga	aag	ctc	caa	ccg	gca	gca	atg	tat	gag	628	
Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu		
			170					175						180			
att	aaa	gtt	cga	tcc	atc	cct	gat	cac	tat	ttt	aaa	ggc	ttc	tgg	agt	676	
Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser		
		185					190					195					
gaa	tgg	agt	cca	agt	tat	tac	ttc	aga	act	cca	gag	atc	aat	aat	agc	724	
Glu	Trp	Ser	Pro	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Arg	Thr	Pro	Glu	Ile	Asn	Asn	Ser		
	200					205					210						
tca	ggg	gag	atg	gat	cct	atc	tta	cta	acc	atc	agc	att	ttg	agt	ttt	772	
Ser	Gly	Glu	Met	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Thr	Ile	Ser	Ile	Leu	Ser	Phe		
	215				220					225					230		
ttc	tct	gtc	gct	ctg	ttg	gtc	atc	ttg	gcc	tgt	gtg	tta	tgg	aaa	aaa	820	
Phe	Ser	Val	Ala	Leu	Leu	Val	Ile	Leu	Ala	Cys	Val	Leu	Trp	Lys	Lys		
				235					240					245			
agg	att	aag	cct	atc	gta	tgg	ccc	agt	ctc	ccc	gat	cat	aag	aag	act	868	
Arg	Ile	Lys	Pro	Ile	Val	Trp	Pro	Ser	Leu	Pro	Asp	His	Lys	Lys	Thr		
			250					255					260				

ES 2 424 126 T3

```

ctg gaa cat ctt tgt aag aaa cca aga aaa aat tta aat gtg agt ttc 916
Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe
      265                270                275

aat cct gaa agt ttc ctg gac tgc cag att cat agg gtg gat gac att 964
Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile
      280                285                290

caa gct aga gat gaa gtg gaa ggt ttt ctg caa gat acg ttt cct cag 1012
Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln
      295                300                305                310

caa cta gaa gaa tct gag aag cag agg ctt gga ggg gat gtg cag agc 1060
Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser
      315                320                325

ccc aac tgc cca tct gag gat gta gtc gtc act cca gaa agc ttt gga 1108
Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Val Thr Pro Glu Ser Phe Gly
      330                335                340

aga gat tca tcc ctc aca tgc ctg gct ggg aat gtc agt gca tgt gac 1156
Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp
      345                350                355

gcc cct att ctc tcc tct tcc agg tcc cta gac tgc agg gag agt ggc 1204
Ala Pro Ile Leu Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly
      360                365                370

aag aat ggg cct cat gtg tac cag gac ctc ctg ctt agc ctt ggg act 1252
Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr
      375                380                385                390

aca aac agc acg ctg ccc cct cca ttt tct ctc caa tct gga atc ctg 1300
Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu
      395                400                405

aca ttg aac cca gtt gct cag ggt cag ccc att ctt act tcc ctg gga 1348
Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly
      410                415                420

tca aat caa gaa gaa gca tat gtc acc atg tcc agc ttc tac caa aac 1396
Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn
      425                430                435

cag tgaagtgtaa gaaacccaga ctgaacttac cgtgagcgac aaagatgatt 1449
Gln

taaaaggga gtctagagtt cctagtctcc ctcacagcac agagaagaca aaattagcaa 1509

aaccocacta cacagtctgc aagattctga aacattgctt tgaccactct tccctgagttc 1569

agtggcactc aacatgagtc aagagcatcc tgcttctacc atgtggattt ggtcacaagg 1629

tttaaggtga cccaatgatt cagctatatt 1658

```

<210> 2

<211> 459

<212> PRT

5

<213> Desconocido

<400> 2

ES 2 424 126 T3

```

Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln
-20          -15          -10          -5

Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp
          -1  1          5          10

Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val
          15          20          25

Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val
          30          35          40

Asn Thr Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val
          45          50          55          60

Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr
          65          70          75

Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly
          80          85          90

Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys
          95          100          105

Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn
          110          115          120

Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val
          125          130          135          140

Lys Val Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn
          145          150          155

Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln
          160          165          170

Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile
          175          180          185

Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr
          190          195          200

Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro
          205          210          215          220

Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu
          225          230          235

Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val
          240          245          250

Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys
          255          260          265

```

ES 2 424 126 T3

Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu
 270 275 280
 Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val
 285 290 295 300
 Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu
 305 310 315
 Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu
 320 325 330
 Asp Val Val Val Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr
 335 340 345
 Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser
 350 355 360
 Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val
 365 370 375 380
 Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro
 385 390 395
 Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala
 400 405 410
 Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala
 415 420 425
 Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
 430 435

<210> 3

<211> 1557

<212> ADN

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de organismo desconocido: primate; supuesto humano

10 <220>

<221> CDS

<222> (13)..(1125)

<220>

15 <221> mat_péptido

<222> (79)..(1125)

<400> 3

ES 2 424 126 T3

```

cggcacgagg gc atg ggg cgg ctg gtt ctg ctg tgg gga gct gcc gtc ttt 51
      Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe
      -20                      -15                      -10

ctg ctg gga ggc tgg atg gct ttg ggg caa gga gga gca gca gaa gga 99
Leu Leu Gly Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly
      -5                      -1 1                      5

gta cag att cag atc atc tac ttc aat tta gaa acc gtg cag gtg aca 147
Val Gln Ile Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr
      10                      15                      20

tgg aat gcc agc aaa tac tcc agg acc aac ctg act ttc cac tac aga 195
Trp Asn Ala Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg
      25                      30                      35

ttc aac ggt gat gag gcc tat gac cag tgc acc aac tac ctt ctc cag 243
Phe Asn Gly Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln
      40                      45                      50                      55

gaa ggt cac act tcg ggg tgc ctc cta gac gca gag cag cga gac gac 291
Glu Gly His Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp
      60                      65                      70

att ctc tat ttc tcc atc agg aat ggg acg cac ccc gtt ttc acc gca 339
Ile Leu Tyr Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala
      75                      80                      85

agt cgc tgg atg gtt tat tac ctg aaa ccc agt tcc ccg aag cac gtg 387
Ser Arg Trp Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val
      90                      95                      100

aga ttt tcg tgg cat cag gat gca gtg acg gtg acg tgt tct gac ctg 435
Arg Phe Ser Trp His Gln Asp Ala Val Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu
      105                      110                      115

tcc tac ggg gat ctc ctc tat gag gtt cag tac cgg agc ccc ttc gac 483
Ser Tyr Gly Asp Leu Leu Tyr Glu Val Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp
      120                      125                      130                      135

acc gag tgg cag tcc aaa cag gaa aat acc tgc aac gtc acc ata gaa 531
Thr Glu Trp Gln Ser Lys Gln Glu Asn Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu
      140                      145                      150

ggc ttg gat gcc gag aag tgt tac tct ttc tgg gtc agg gtg aag gct 579
Gly Leu Asp Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala
      155                      160                      165

atg gag gat gta tat ggg cca gac aca tac cca agc gac tgg tca gag 627
Met Glu Asp Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu
      170                      175                      180

gtg aca tgc tgg cag aga ggc gag att cgg gat gcc tgt gca gag aca 675
Val Thr Cys Trp Gln Arg Gly Glu Ile Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr
      185                      190                      195

cca acg cct ccc aaa cca aag ctg tcc aaa ttt att tta att tcc agc 723
Pro Thr Pro Pro Lys Pro Lys Leu Ser Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser
      200                      205                      210                      215

ctg gcc atc ctt ctg atg gtg tct ctc ctc ctt ctg tct tta tgg aaa 771
Leu Ala Ile Leu Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys
      220                      225                      230

```

ES 2 424 126 T3

```

tta tgg aga gtg aag aag ttt ctc att ccc agc gtg cca gac ccg aaa 819
Leu Trp Arg Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys
                235                240                245

tcc atc ttc ccc ggg ctc ttt gag ata cac caa ggg aac ttc cag gag 867
Ser Ile Phe Pro Gly Leu Phe Glu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln Glu
                250                255                260

tgg atc aca gac acc cag aac gtg gcc cac ctc cac aag atg gca ggt 915
Trp Ile Thr Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala Gly
                265                270                275

gca gag caa gaa agt ggc ccc gag gag ccc ctg gta gtc cag ttg gcc 963
Ala Glu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala
280                285                290                295

aag act gaa gcc gag tct ccc agg atg ctg gac cca cag acc gag gag 1011
Lys Thr Glu Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu
                300                305                310

aaa gag gcc tct ggg gga tcc ctc cag ctt ccc cac cag ccc ctc caa 1059
Lys Glu Ala Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln
                315                320                325

ggc ggt gat gtg gtc aca atc ggg ggc ttc acc ttt gtg atg aat gac 1107
Gly Gly Asp Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp
                330                335                340

cgc tcc tac gtg gcg ttg tgatggacac accactgtca aagtcaacgt 1155
Arg Ser Tyr Val Ala Leu
                345

caggatccac gttgacattt aaagacagag gggactgtcc cggggactcc acaccaccat 1215

ggatgggaag tctccacgcc aatgatggta ggactaggag actctgaaga cccagcctca 1275

ccgcctaata cgccactgc cctgctaact ttccccaca tgagtctctg tgttcaaagg 1335

cttgatggca gatgggagcc aattgctcca ggagatttac tcccagttcc ttttcgtgcc 1395

tgaacgttgt cacataaacc ccaaggcagc acgtccaaaa tgctgtaaaa ccatcttccc 1455

actctgtgag tccccagttc cgtccatgta cctgttccat agcattggat tctcggagga 1515

ttttttgtct gttttgagac tccaaaccac ctctaccct ac 1557

```

<210> 4

<211> 371

<212> PRT

5

<213> Desconocido

<400> 4

```

Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe Leu Leu Gly
    -20                -15                -10

Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile

```

ES 2 424 126 T3

-5	-1	1	5	10
Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala	15		20	25
Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly	30		35	40
Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His	45		50	55
Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr	60		65	70
Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala Ser Arg Trp	75	80	85	90
Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val Arg Phe Ser	95		100	105
Trp His Gln Asp Ala Val Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu Ser Tyr Gly	110		115	120
Asp Leu Leu Tyr Glu Val Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp Thr Glu Trp	125		130	135
Gln Ser Lys Gln Glu Asn Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu Gly Leu Asp	140		145	150
Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala Met Glu Asp	155	160	165	170
Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu Val Thr Cys	175		180	185
Trp Gln Arg Gly Glu Ile Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr Pro Thr Pro	190		195	200
Pro Lys Pro Lys Leu Ser Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile	205		210	215
Leu Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys Leu Trp Arg	220		225	230
Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys Ser Ile Phe	235	240	245	250
Pro Gly Leu Phe Glu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln Glu Trp Ile Thr	255		260	265
Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala Gly Ala Glu Gln	270		275	280
Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala Lys Thr Glu	285		290	295
Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala	300		305	310
Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp	315	320	325	330
Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr	335		340	345
Val Ala Leu				

<210> 5

<211> 480

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

5 <223> Descripción de organismo desconocido: primate; supuesto humano

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(477)

10

<220>

<221> mat_péptido

<222> (85)..(477)

15

<400> 5

```

atg ttc cct ttt gcc tta cta tat gtt ctg tca gtt tct ttc agg aaa 48
Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser Val Ser Phe Arg Lys
      -25                -20                -15

atc ttc atc tta caa ctt gta ggg ctg gtg tta act tac gac ttc act 96
Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr
      -10                -5                -1 1

aac tgt gac ttt gag aag att aaa gca gcc tat ctc agt act att tct 144
Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser
      5                10                15 20

aaa gac ctg att aca tat atg agt ggg acc aaa agt acc gag ttc aac 192
Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn
      25                30                35

aac acc gtc tct tgt agc aat cgg cca cat tgc ctt act gaa atc cag 240
Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln
      40                45                50

agc cta acc ttc aat ccc acc gcc ggc tgc gcg tcg ctc gcc aaa gaa 288
Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu
      55                60                65

atg ttc gcc atg aaa act aag gct gcc tta gct atc tgg tgc cca ggc 336
Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly
      70                75                80

tat tcg gaa act cag ata aat gct act cag gca atg aag aag agg aga 384
Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg
      85                90                95 100

aaa agg aaa gtc aca acc aat aaa tgt ctg gaa caa gtg tca caa tta 432
Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu
      105                110                115

caa gga ttg tgg cgt cgc ttc aat cga cct tta ctg aaa caa cag taa 480
Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
      120                125                130

```

<210> 6

<211> 159

<212> PRT

<213> Desconocido

5

<400> 6

```

Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser Val Ser Phe Arg Lys
      -25                      -20                      -15

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr
      -10                      -5                      -1  1

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser
  5                      10                      15                      20

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn
                      25                      30                      35

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln
                      40                      45                      50

Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu
      55                      60                      65

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly
      70                      75                      80

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg
      85                      90                      95                      100

Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu
                      105                      110                      115

Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
                      120                      125                      130

```

REIVINDICACIONES

1. Uso de un antagonista de IL-B50 (Figura 3A), que es un anticuerpo neutralizante para IL-7R α (SEC ID N°: 2) o la subunidad R δ 2 (SEC ID N°: 4) o un complejo que comprende dichas subunidades o un anticuerpo que neutraliza IL-B50, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades alérgicas bloqueando el funcionamiento de células dendríticas humanas.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que dichas células dendríticas humanas incluyen el subconjunto CD11c+.
3. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista de IL-B50 (Figura 3A), que es un anticuerpo neutralizante para IL-7R α (SEC ID N°: 2) o la subunidad R δ 2 (SEC ID N°: 4) o un complejo que comprende dichas subunidades o un anticuerpo que neutraliza IL-B50, para el tratamiento de enfermedades alérgicas bloqueando el funcionamiento de células dendríticas humanas.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que dichas células dendríticas humanas incluyen el subconjunto CD11c+.

Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos (véase SEC ID N°: 1 y 2) de una IL-7R α de primate, por ejemplo, humana; indicado el sitio de escisión de la señal predicho.

```

ctctctctct atctctctca ga atg aca att cta ggt aca act ttt ggc atg 52
Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met
-20
gtt ttt tct tta ctt caa gtc gtt tct gga gaa agt ggc tat gct caa 100
Val Phe Ser Leu Leu Gln Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln
-10 -5 -1 1 5
aat gga gac ttg gaa gat gca gaa ctg gat gac tac tca ttc tca tgc 148
Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys
10 15 20
tat agc cag ttg gaa gtg aat gga tcg cag cat tca ctg acc tgt gct 196
Tyr Ser Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala
25 30 35
ttt gag gac cca gat gtc aac acc acc aat ctg gaa ttt gaa ata tgt 244
Phe Glu Asp Pro Asp Val Asn Thr Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys
40 45 50
ggg gcc ctc gtg gag gta aag tgc ctg aat ttc agg aaa cta caa gag 292
Gly Ala Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu
55 60 65 70

```

FIG. 1A

```

ata tat ttc atc gag aca aag aaa ttc tta ctg att gga aag agc aat      340
ile tyr phe ile glu thr lys lys phe leu leu ile gly lys ser asn      85
75

ata tgt gtg aag gtt gga gaa aag agt cta acc tgc aaa aaa ata gac      388
ile cys val lys val gly glu lys ser leu thr cys lys lys ile asp      100
90

cta acc act ata gtt aaa cct gag gct cct ttt gac ctg agt gtc atc      436
leu thr thr ile val lys pro glu ala pro phe asp leu ser val ile      115
105

tat cgg gaa gga gcc aat gac ttt gtg gtg aca ttt aat aca tca cac      484
tyr arg glu gly ala asn asp phe val val thr phe asn thr ser his      130
120

ttg caa aag aag tat gta aaa gtt tta atg cat gat gta gct tac cgc      532
leu gln lys lys tyr val lys val leu met his asp val ala tyr arg      145
135

cag gaa aag gat gaa aac aaa tgg acg cat gtg aat tta tcc agc aca      580
gln glu lys asp glu asn lys trp thr his val asn leu ser ser thr      155
160

```

FIG. 1B

```

aag ctg aca ctc ctg cag aga aag ctc caa ccg gca gca atg tat gag 628
Lys Leu Thr Leu Leu Gln Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu
170 175 180

att aaa gtt cga tcc atc cct gat cac tat ttt aaa ggc ttc tgg agt 676
Ile Lys Val Arg Ser Ile Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser
185 190 195

gaa tgg agt cca agt tat tac ttc aga act cca gag atc aat aat agc 724
Glu Trp Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser
200 205 210

tca ggg gag atg gat cct atc tta cta acc atc agc att ttg agt ttt 772
Ser Gly Glu Met Asp Pro Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe
215 220 225

ttc tct gtc gct ctg ttg gtc atc ttg gcc tgt gtg tta tgg aaa aaa 820
Phe Ser Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys
235 240 245

agg att aag cct atc gta tgg ccc agt ctc ccc gat cat aag aag act 868
Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr
250 255 260

ctg gaa cat ctt tgt aag aaa cca aga aaa aat tta aat gtg agt ttc 916
Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe
265 270 275

```

FIG. 1C

aat cct gaa agt ttc ctg gac tgc cag att cat agg gtg gat gac att 964
 Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile
 280 285 290

 caa gct aga gat gaa gtg gaa ggt ttt ctg caa gat acg ttt cct cag 1012
 Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln
 295 300 305 310

 caa cta gaa gaa tct gag aag cag agg ctt gga ggg gat gtg cag agc 1060
 Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser
 315 320 325

 ccc aac tgc cca tct gag gat gta gtc gtc act cca gaa agc ttt gga 1108
 Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Thr Pro Glu Ser Phe Gly
 330 335 340

 aga gat tca tcc ctc aca tgc ctg gct ggg aat gtc agt gca tgt gac 1156
 Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp
 345 350 355

 gcc cct att ctc tcc tct tcc agg tcc cta gac tgc agg gag agt ggc 1204
 Ala Pro Ile Leu Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly
 360 365 370

 aag aat ggg cct cat gtg tac cag gac ctc ctg ctt agc ctt ggg act 1252
 Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Ser Leu Gly Thr
 375 380 385 390

FIG. 1D

```

aca aac agc acg ctg ccc cct cca ttt tct ctc caa tct gga atc ctg 1300
Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu
395 400 405

aca ttg aac cca gtt gct cag ggt cag ccc att ctt act tcc ctg gga 1348
Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly
410 415 420

tca aat caa gaa gaa gca tat gtc acc atg tcc agc ttc tac caa aac 1396
Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn
425 430 435

cag tgaagtgttaa gaaaccacaga ctgaacttac cgtgagcgac aaagatgatt 1449
Gln

taaaaggga gtctagagtt cctagtctcc ctcacagcac agagaagaca aaattagcaa 1509

aaccocacta cacagtctgc aagattctga aacattgctt tgaccactct tcttgagttc 1569

agtggcactc aacatgagtc aagagcatcc tgcttctacc atgtggattt ggtcacaaagg 1629

tttaagggtga cccaatgatt cagctattt 1658

```

FIG. 1E

Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos (véase SEC ID N°: 3 y 4) de una Rδ2 de primate, por ejemplo, humana; indicado el sitio de escisión de la señal predicho.

```

cgggcacgagg gc atg ggg cgg ctg gtt ctg tgg gga gct gcc gtc ttt 51
      Met Gly Arg Leu Val Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe -10
      -20
ctg ctg gga ggc tgg atg gct ttg ggg caa gga gga gca gaa gga 99
Leu Leu Gly Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly
      -5      -1      1      5
gta cag att cag atc atc tac ttc aat tta gaa acc gtg cag gtg aca 147
Val Gln Ile Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr
      10      15      20
tgg aat gcc agc aaa tac tcc agg acc aac ctg act ttc cac tac aga 195
Trp Asn Ala Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg
      25      30      35
ttc aac ggt gat gag gcc tat gac cag tgc acc aac tac ctt ctc cag 243
Phe Asn Gly Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln
      40      45      50      55
gaa ggt cac act tcg ggg tgc cta gac gca gag cag cga gac gac 291
Glu Gly His Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp
      60      65      70

```

FIG. 2A

```

att ctc tat ttc tcc atc agg aat ggg acg cac ccc gtt ttc acc gca      339
Ile Leu Tyr Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala
75      80      85

agt cgc tgg atg gtt tat tac ctg aaa ccc agt tcc ccg aag cac gtg      387
Ser Arg Trp Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val
90      95      100

aga ttt tcg tgg cat cag gat gca gtg acg gtg acg tgt tct gac ctg      435
Arg Phe Ser Trp His Gln Asp Ala Val Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu
105      110      115

tcc tac ggg gat ctc ctc tat gag gtt cag tac cgg agc ccc ttc gac      483
Ser Tyr Gly Asp Leu Leu Tyr Glu Val Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp
120      125      130      135

acc gag tgg cag tcc aaa cag gaa aat acc tgc aac gtc acc ata gaa      531
Thr Glu Trp Gln Ser Lys Gln Glu Asn Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu
140      145      150

ggc ttg gat gcc gag aag tgt tac tct ttc tgg gtc agg gtg aag gct      579
Gly Leu Asp Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala
155      160      165

atg gag gat gta tat ggg cca gac aca tac cca agc gac tgg tca gag      627
Met Glu Asp Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu
170      175      180

```

FIG. 2B

```

gtg aca tgc tgg cag aga ggc gag att cgg gat gcc tgt gca gag aca 675
Val Thr Cys Trp Gln Arg Gly Glu Ile Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr
185 190 195

cca acg cct ccc aaa cca aag ctg tcc aaa ttt att tta att tcc agc 723
Pro Thr Pro Pro Lys Pro Lys Leu Ser Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser
200 205 210 215

ctg gcc atc ctt ctg atg gtg tct ctc ctc ctt ctg tct tta tgg aaa 771
Leu Ala Ile Leu Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys
220 225 230

tta tgg aga gtg aag aag ttt ctc att ccc agc gtg cca gac ccg aaa 819
Leu Trp Arg Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys
235 240 245

tcc atc ttc ccc ggg ctc ttt gag ata cac caa ggg aac ttc cag gag 867
Ser Ile Phe Pro Gly Leu Phe Leu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln Glu
250 255 260

tgg atc aca gac acc cag acc cag aac gtg gcc cac ctc cac aag atg gca ggt 915
Trp Ile Thr Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala Gly
265 270 275

gca gag caa gaa agt ggc ccc gag gag ccc ctg gta gtc cag ttg gcc 963
Ala Glu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala
280 285 290 295

```

FIG. 2C

```

aag act gaa gcc gag tct ccc agg atg ctg gac cca cag acc gag gag 1011
Lys Thr Glu Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu
300 305 310

aaa gag gcc tct ggg gga tcc ctc cag ctt ccc cac cag ccc ctc caa 1059
Lys Glu Ala Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln
315 320 325

ggc ggt gat gtg gtc aca atc ggg ggc ttc acc ttt gtg atg aat gac 1107
Gly Gly Asp Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp
330 335 340

cgc tcc tac gtg gcg ttg tgatggacac accactgtca aagtcaacgt 1155
Arg Ser Tyr Val Ala Leu
345

```

FIG. 2D

caggatccac gttgacattt aaagacagag gggactgtcc cggggactcc acaccaccat 1215
ggatgggaag tctccacgcc aatgatggta ggactaggag actctgaaga ccagccctca 1275
ccgcctaata cggccactgc cctgctaact tccccccaca tgagtctctg tgttcaaaag 1335
cttgatggca gatgggagcc aattgctcca ggagatttac tccagttcc tttcgtgcc 1395
tgaacggtgt cacataaacc ccaaggcagc acgtccaaaa tgctgtaaaa ccattctccc 1455
actctgtgag tccccagttc cgtccatgta cctgttccat agcattggat tctcggagga 1515
ttttttgtct gttttgagac tccaaaccac ctctaccct ac 1557

FIG. 2E

MFPEALLYVLSVSFRKIFILQLVGLVLTVD 30
 FTNCDFEIKIKAAYLSTISKDLITYMSGTKS 60
 TEFNNTVSCSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGC 90
 ASLAKEMFAMKTKAALAIAWCPGYSETQINA 120
 TQAMKKRRKRKRVTTNKCLEQVSQQLQGLWRR 150
 FNRPLLKQQ

FIG. 3A

1 agtgtgaaac tggggtggaa tgggtgtcca cgtatgttcc cttttgcctt
 51 actatatggt ctgtcagttt ctttcaggaa aatcttcatc ttacaacttg
 101 tagggctggt gttaaacttac gacttcacca actgtgactt tgagaagatt
 151 aaagcagcct atctcagtag tatttctaaa gacctgatta catatatgag
 201 tgggaccaaa agtaccgagt tcaacaacac cgtctcttgt agcaatcggc
 251 cacattgcct tactgaaatc cagagcctaa cttcaatcc caccgccggc
 301 tgcgcgtcgc tcgccaaaaga aatgttcgcc atgaaaaacta aggtgcctt
 351 agctatctgg tgcccaggct attcggaaac tcagataaat gctactcagg
 401 caatgaagaa gaggagaaaa agaaaagtca caaccaataa atgtctggaa
 451 caagtgtcac aattacaagg attgtggcgt cgcttcaatc gacccttact
 501 gaaacaacag taaaccatct ttattatggt catatttcac agcaccaaaa
 ta

FIG. 3B

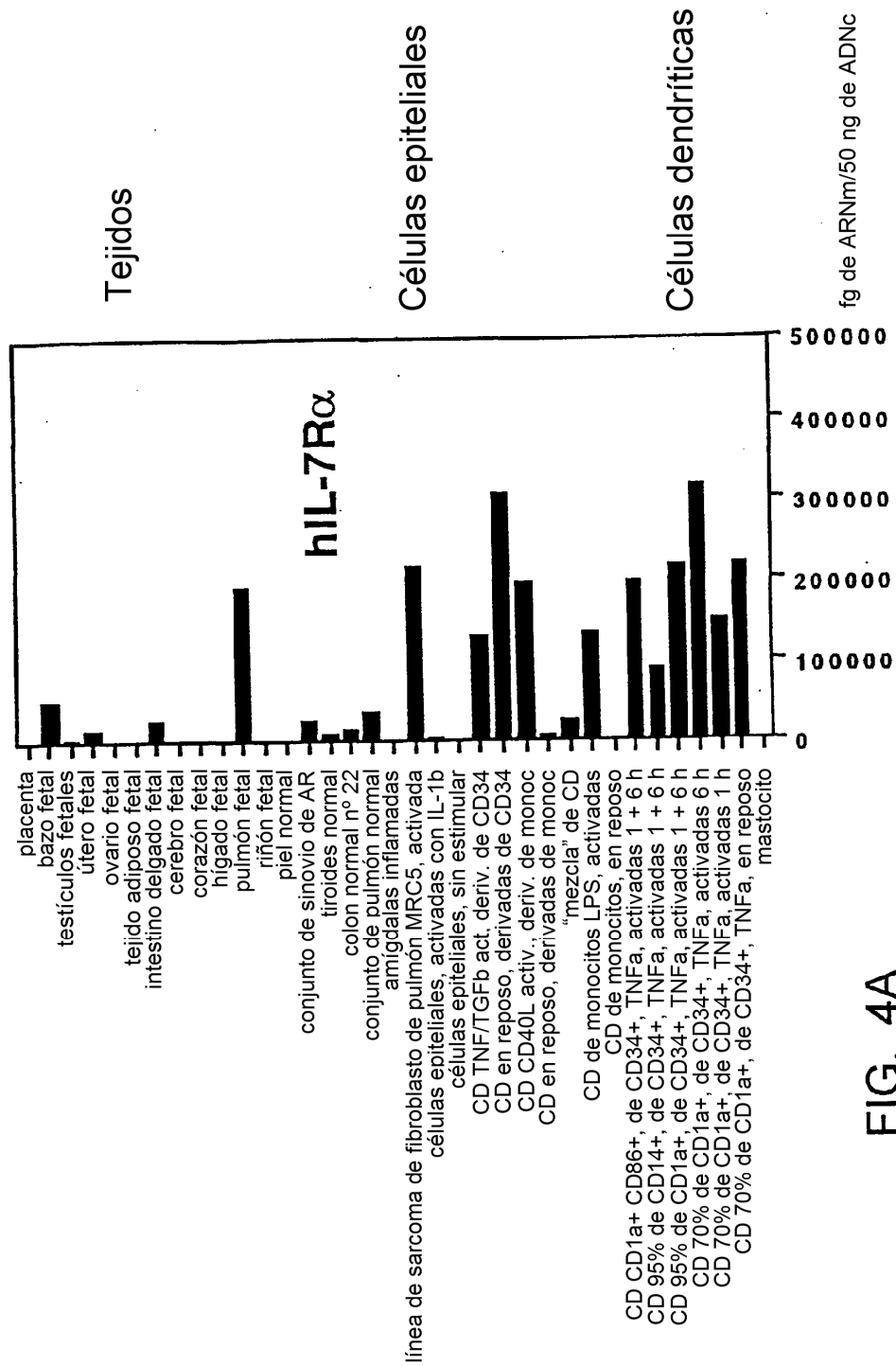


FIG. 4A

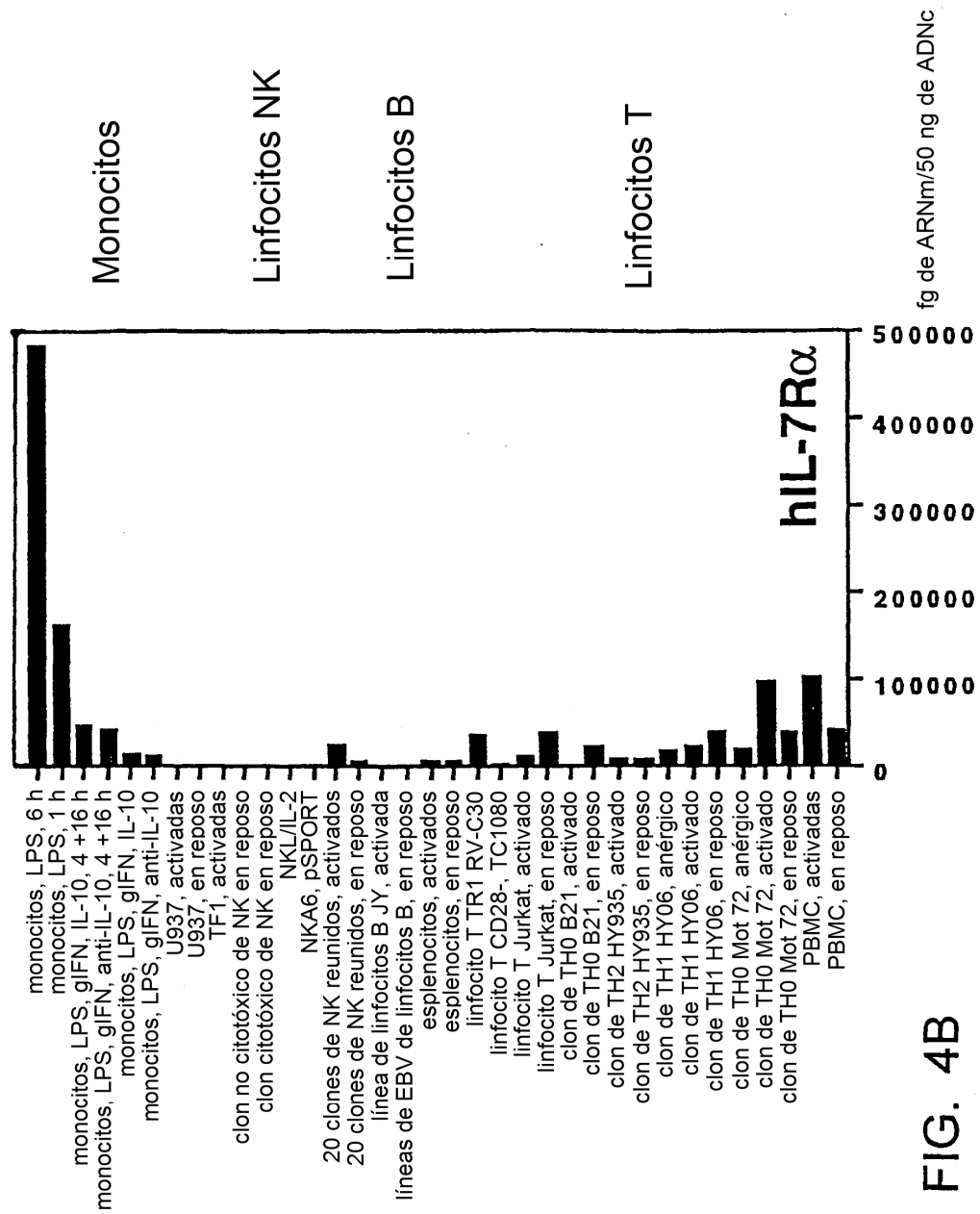


FIG. 4B

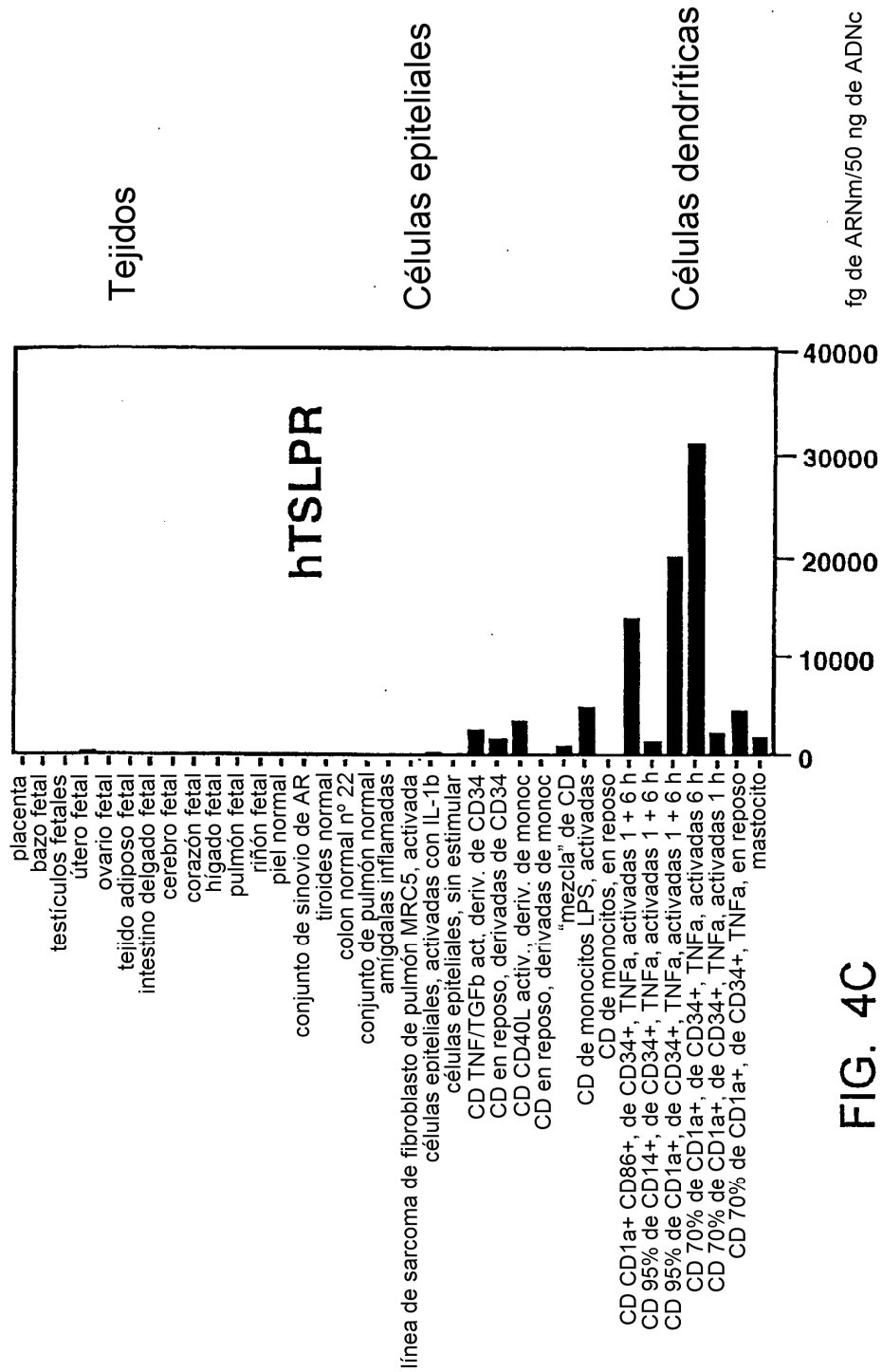


FIG. 4C

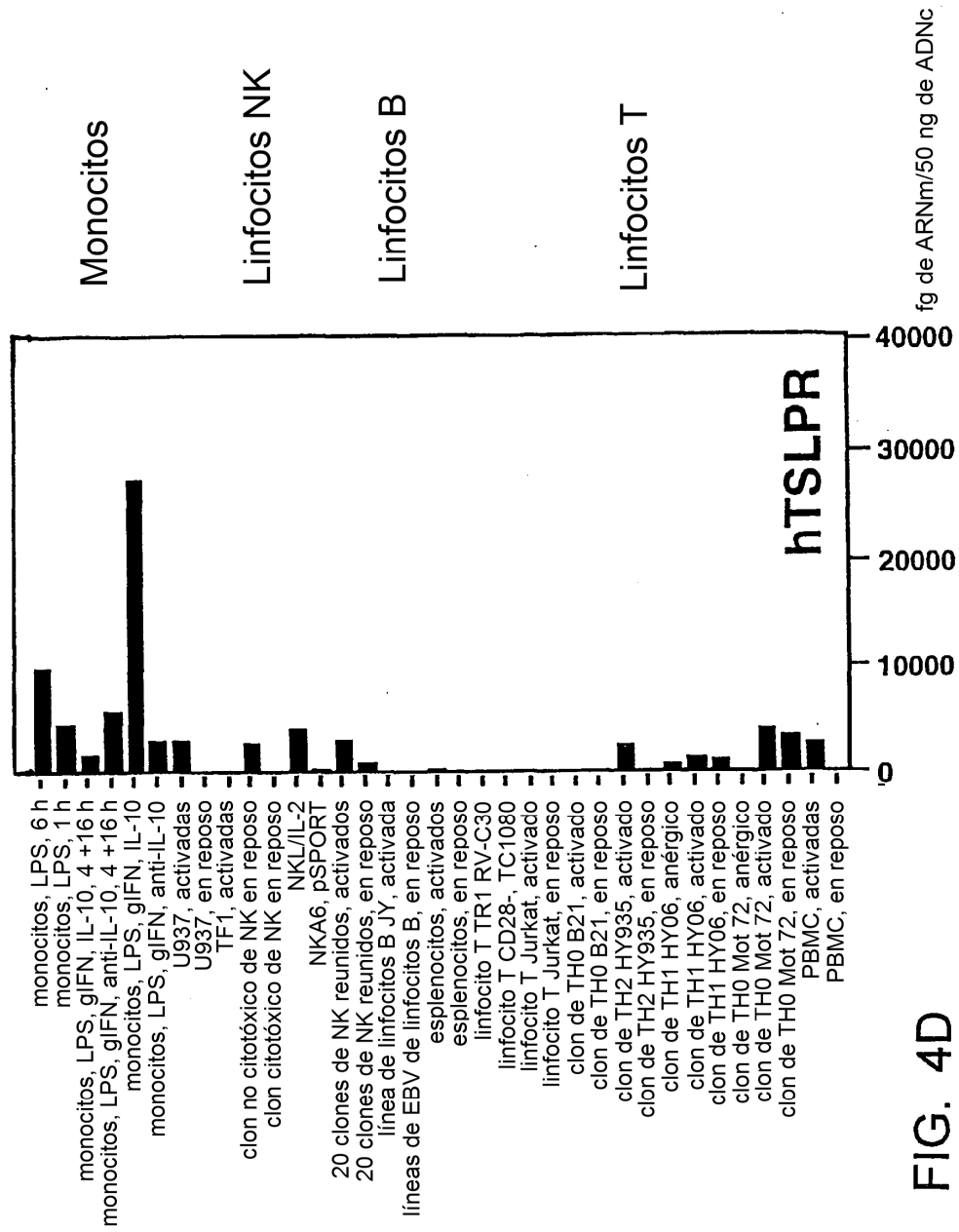


FIG. 4D

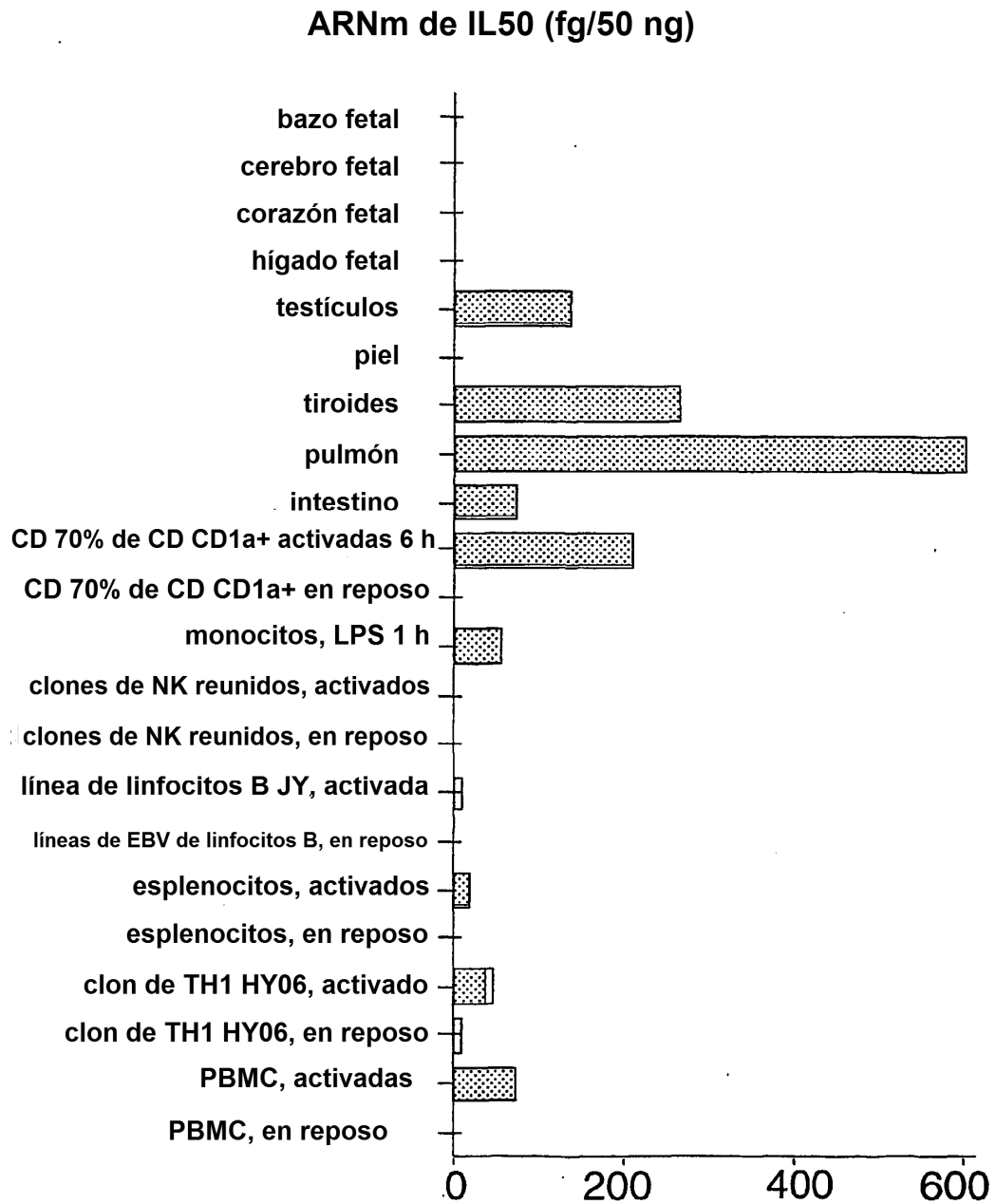


FIG. 4E

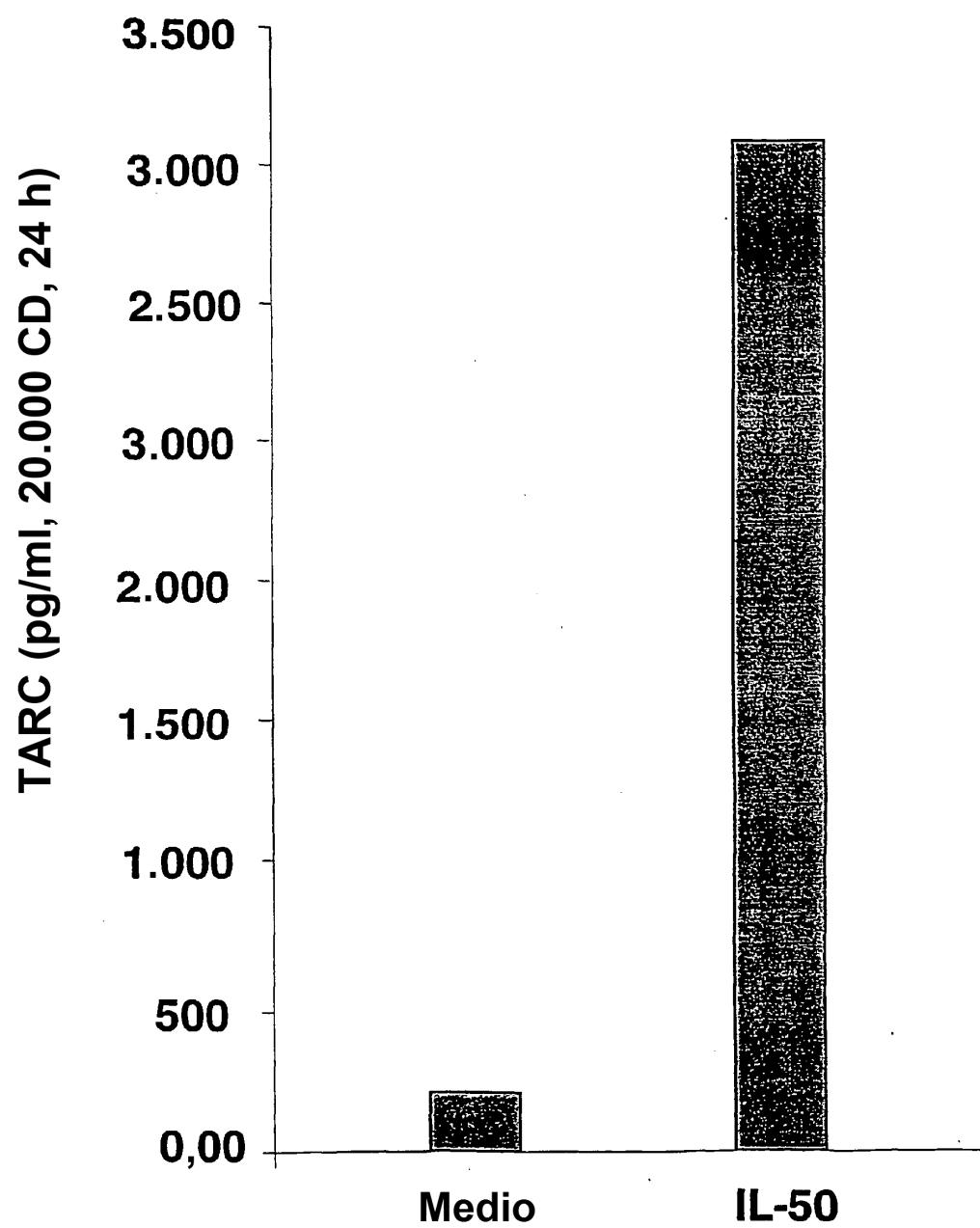


FIG. 5

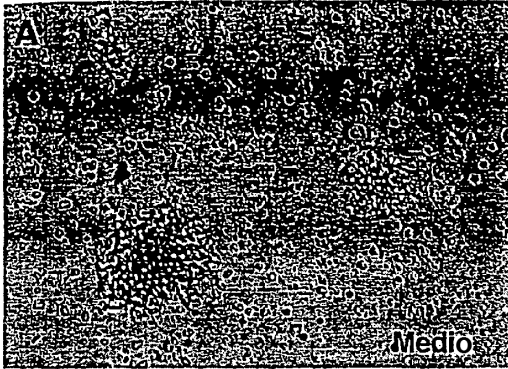


FIG. 6A

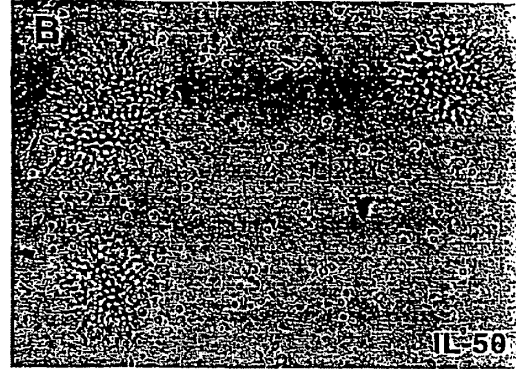


FIG. 6B

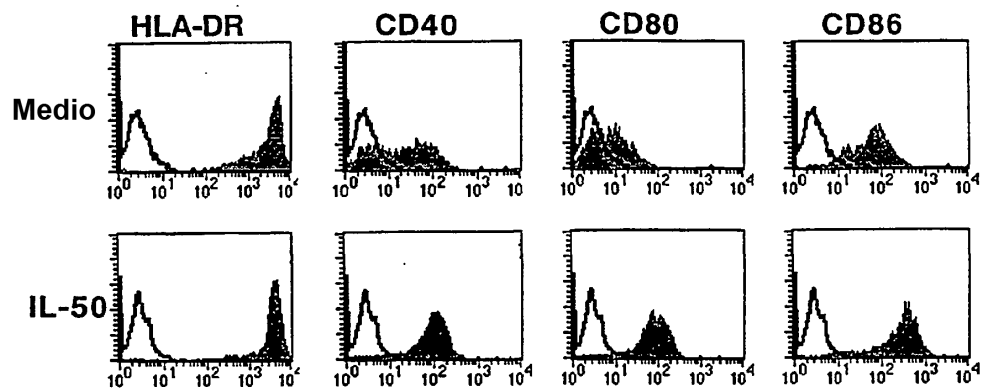


FIG. 7

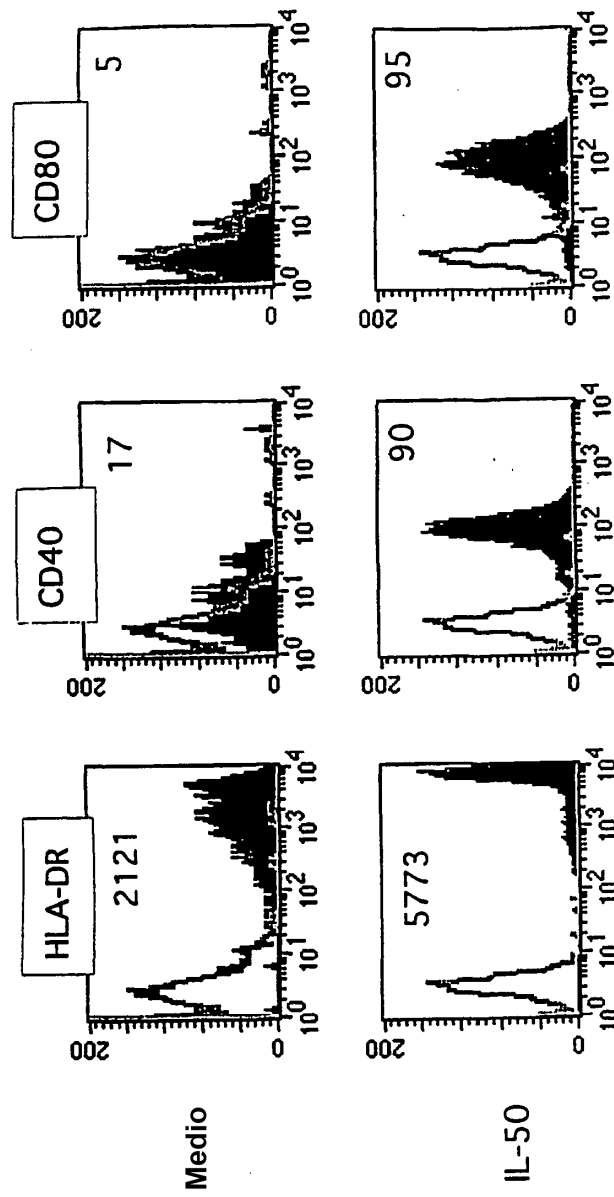


FIG. 8A

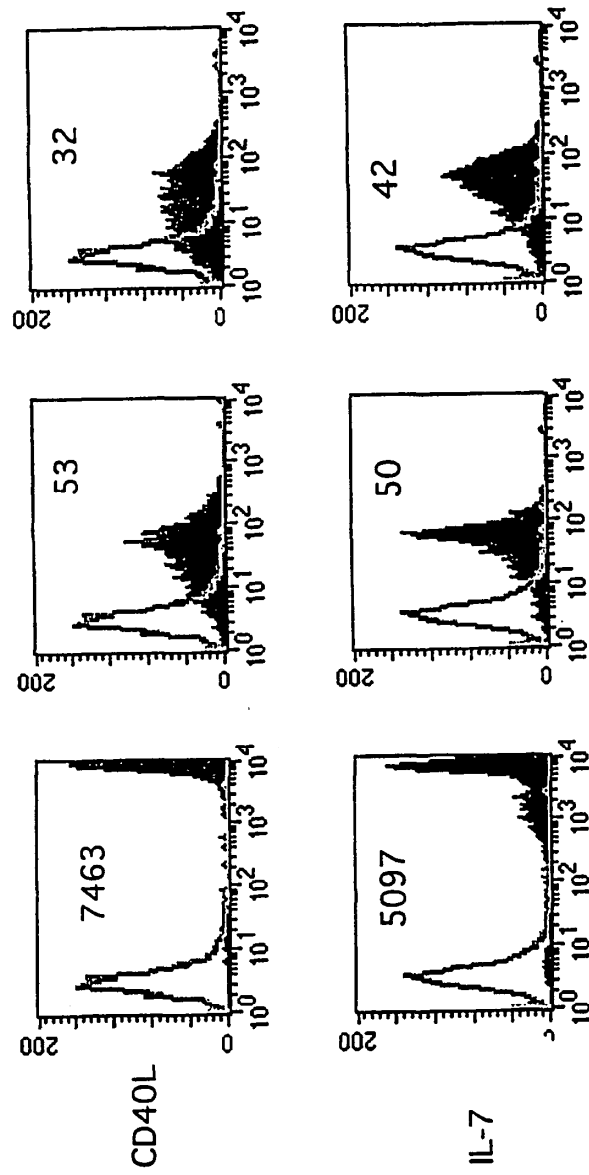


FIG. 8B

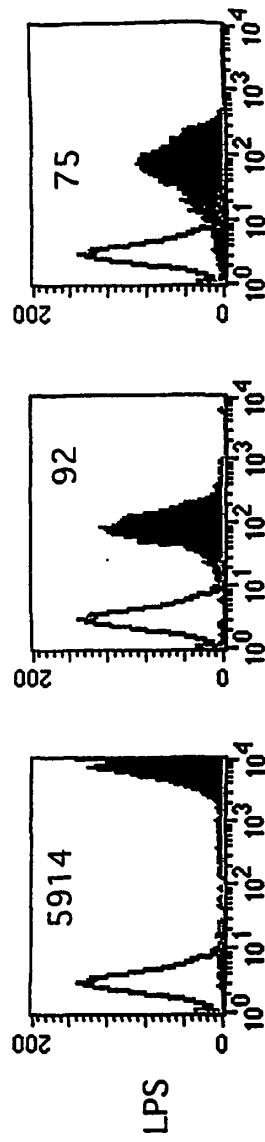


FIG. 8C

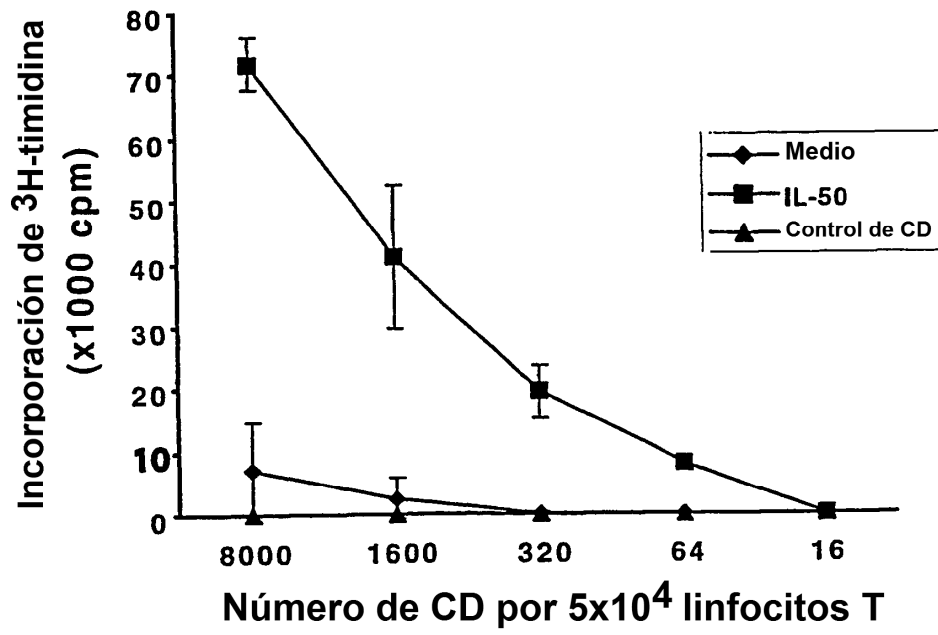


FIG. 9

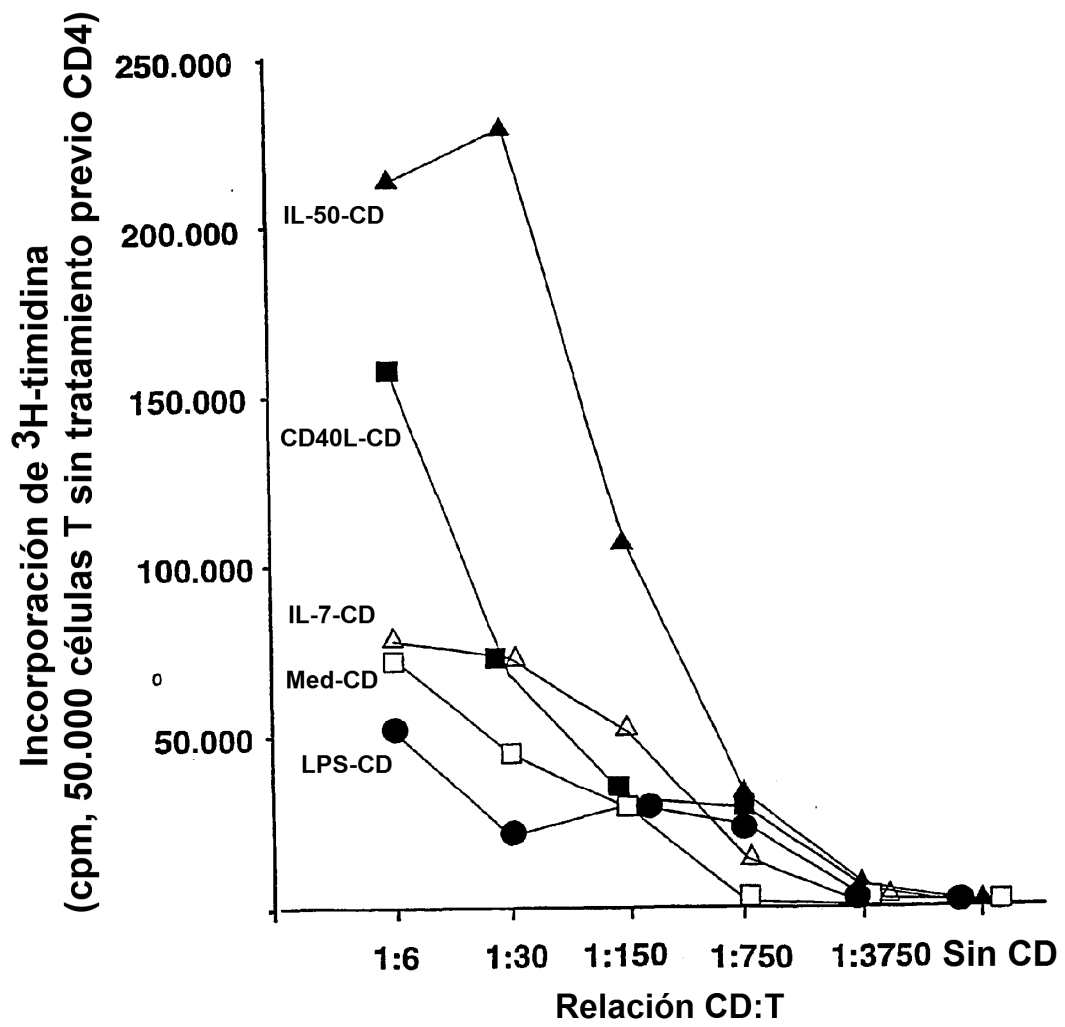


FIG. 10

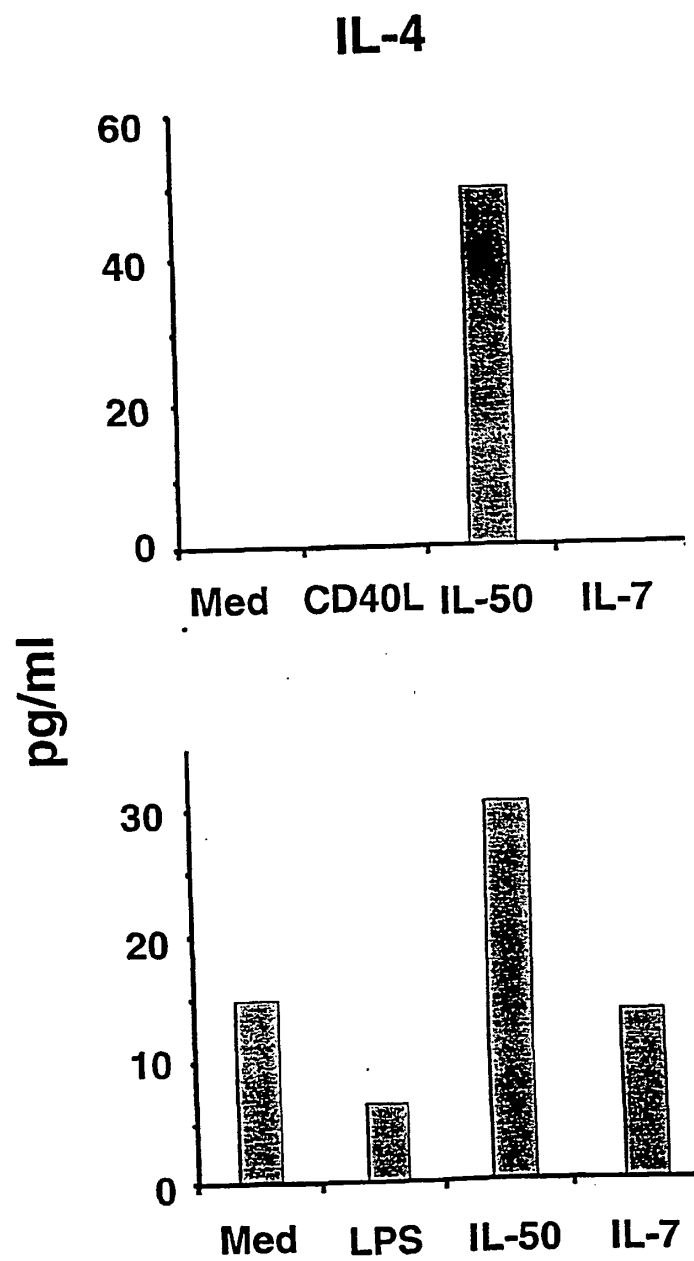


FIG. 11A

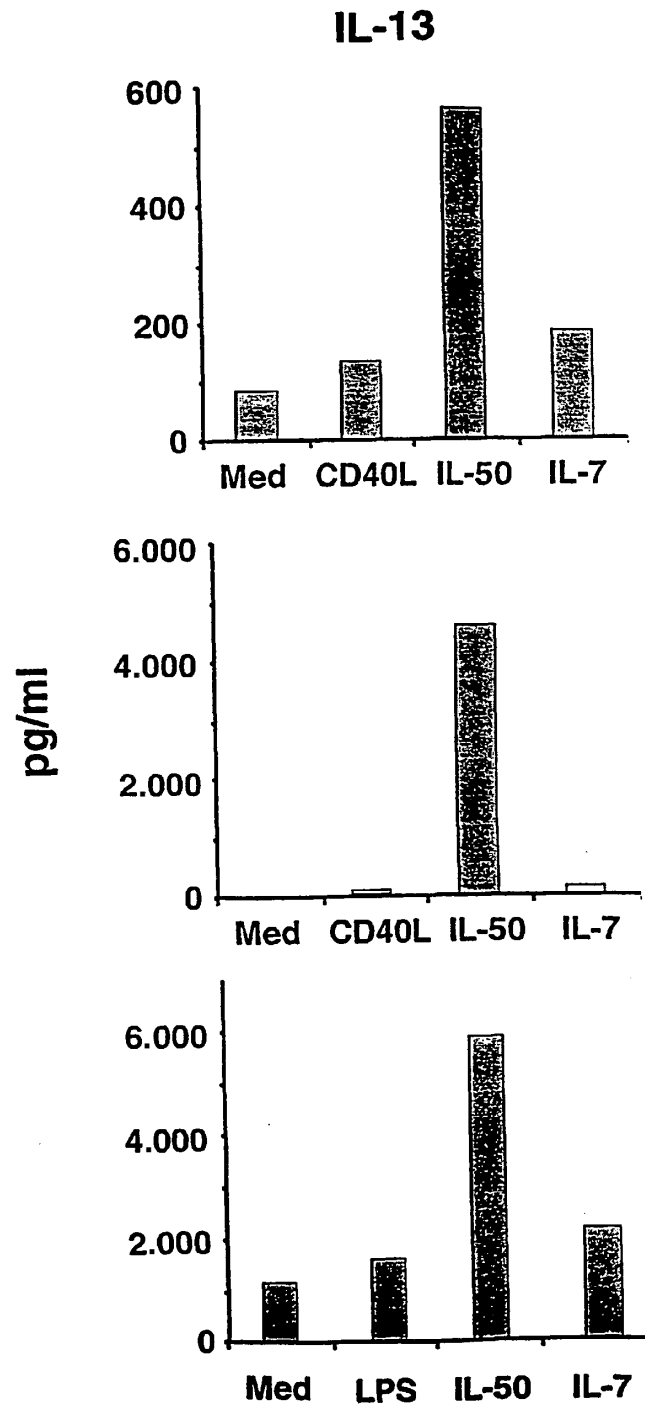


FIG. 11B

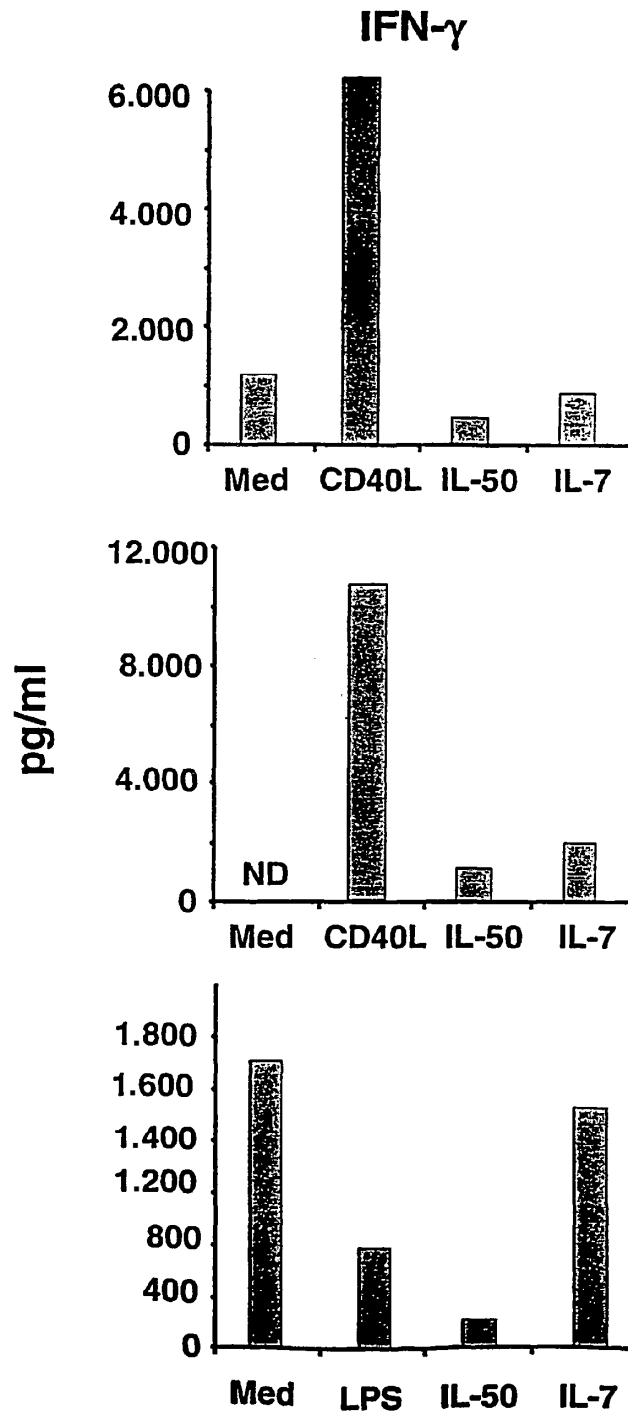


FIG. 11C

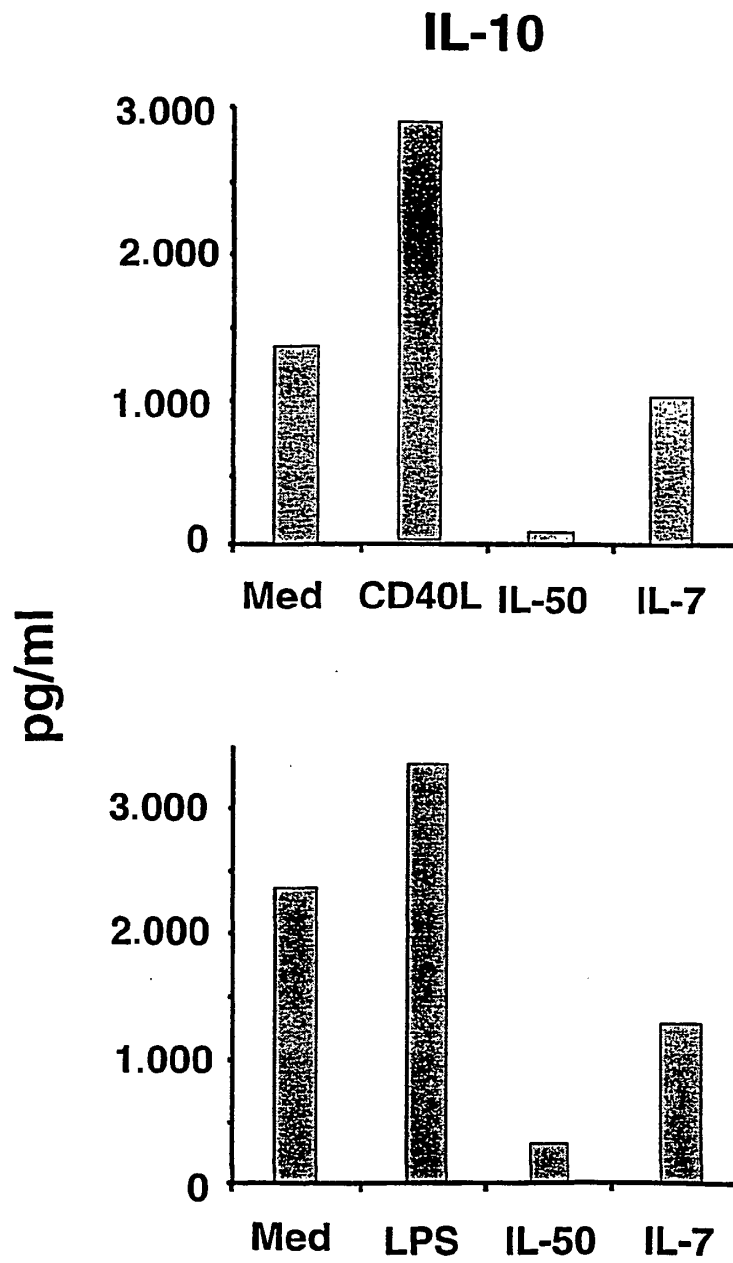


FIG. 11D

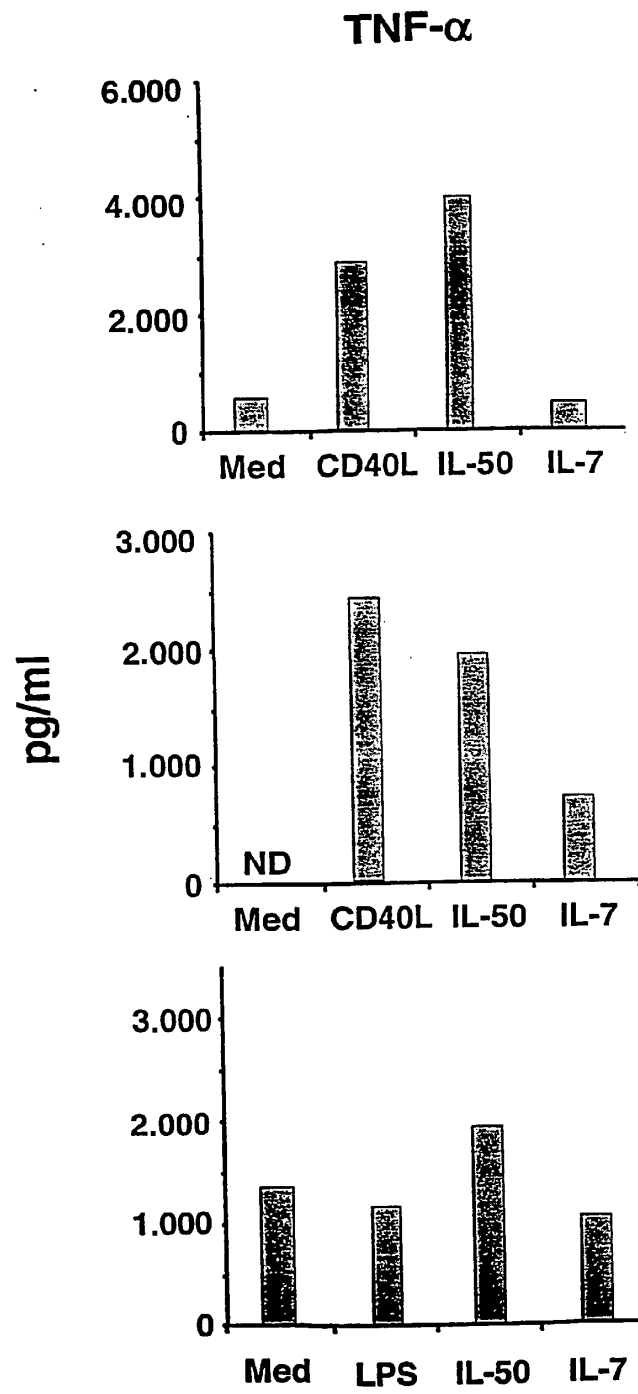


FIG. 11E

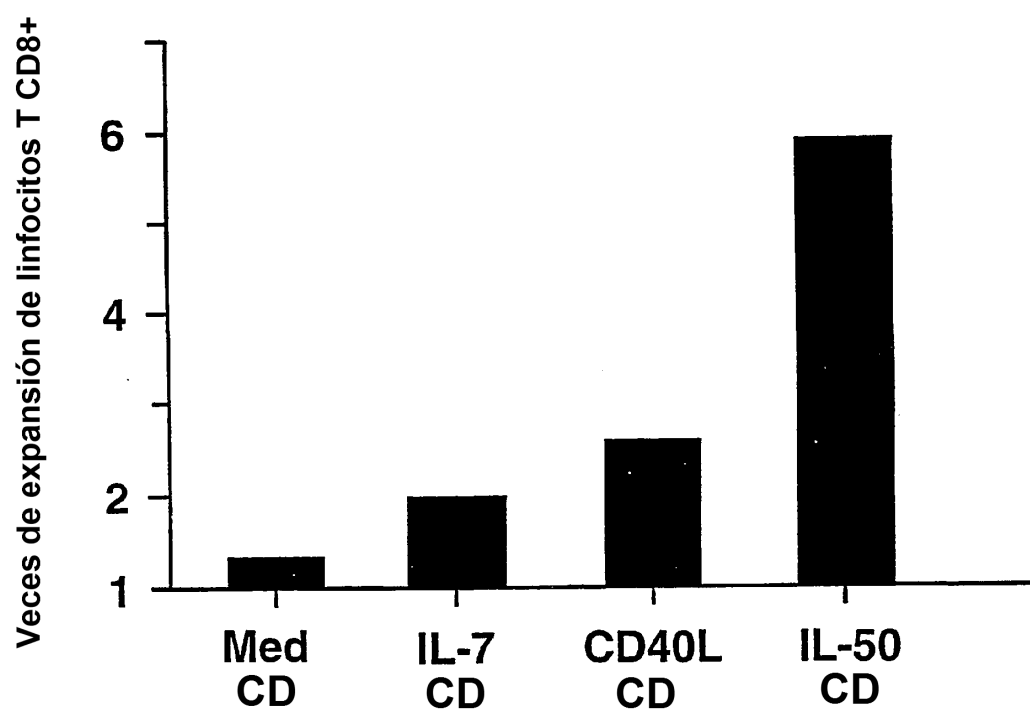


FIG. 12

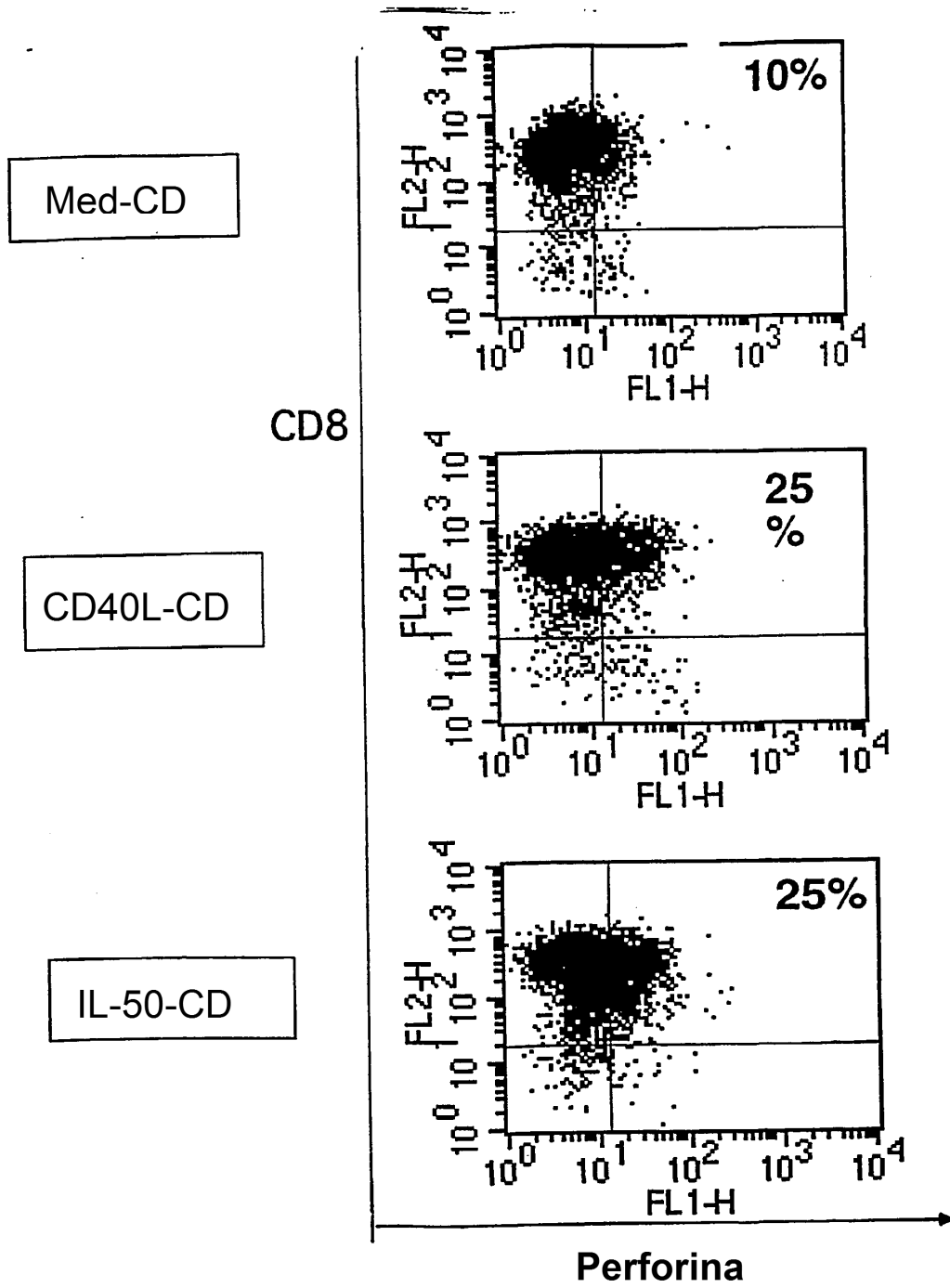


FIG. 13

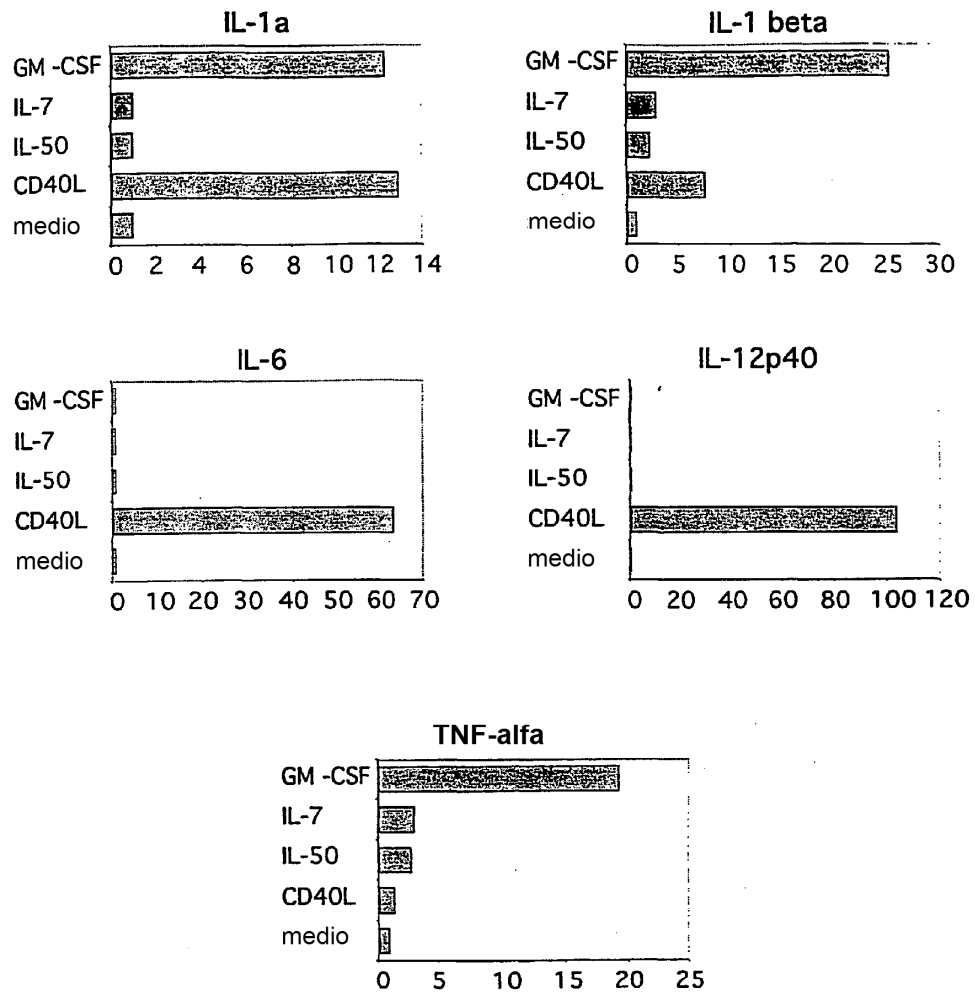


FIG. 14A

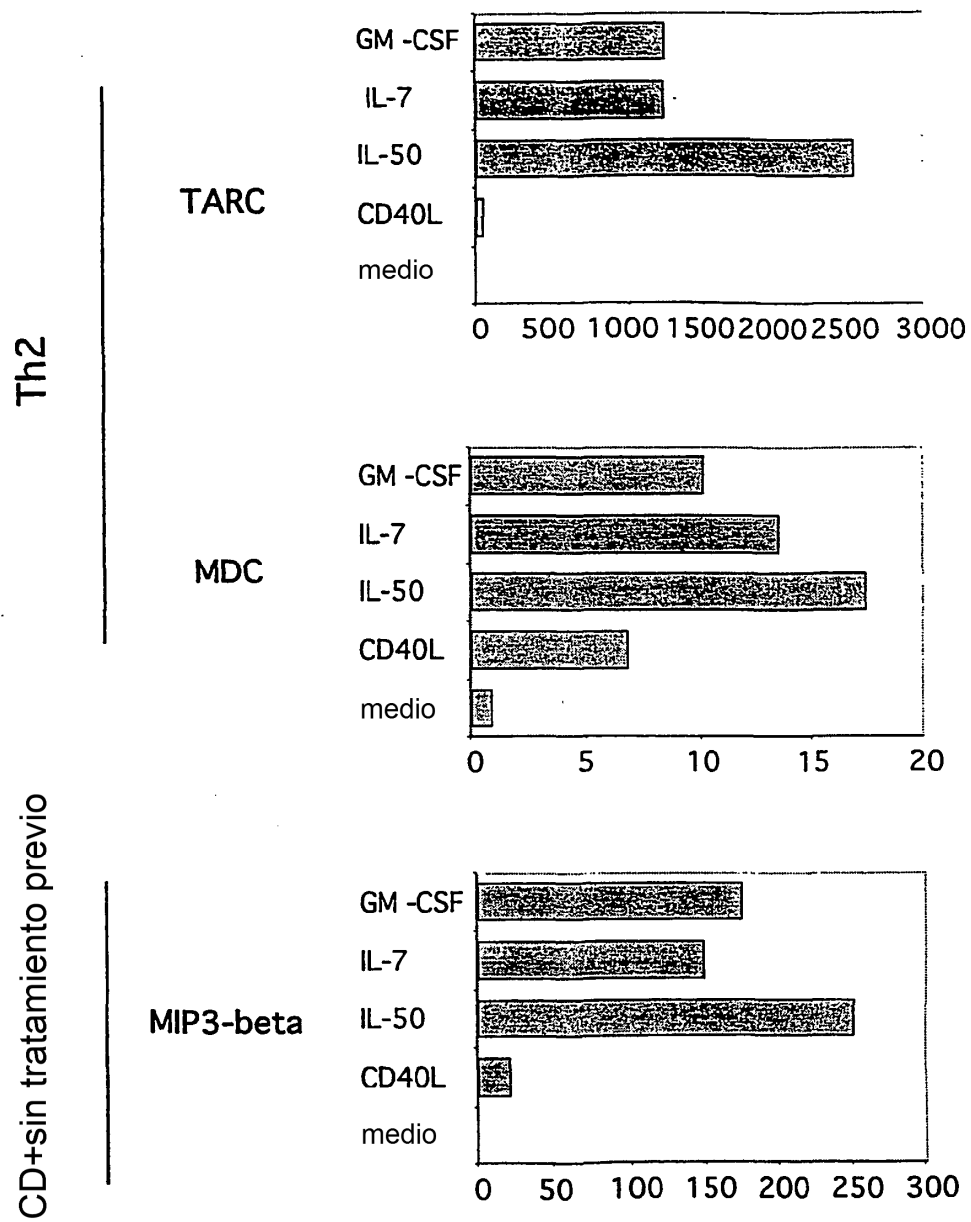


FIG. 14B

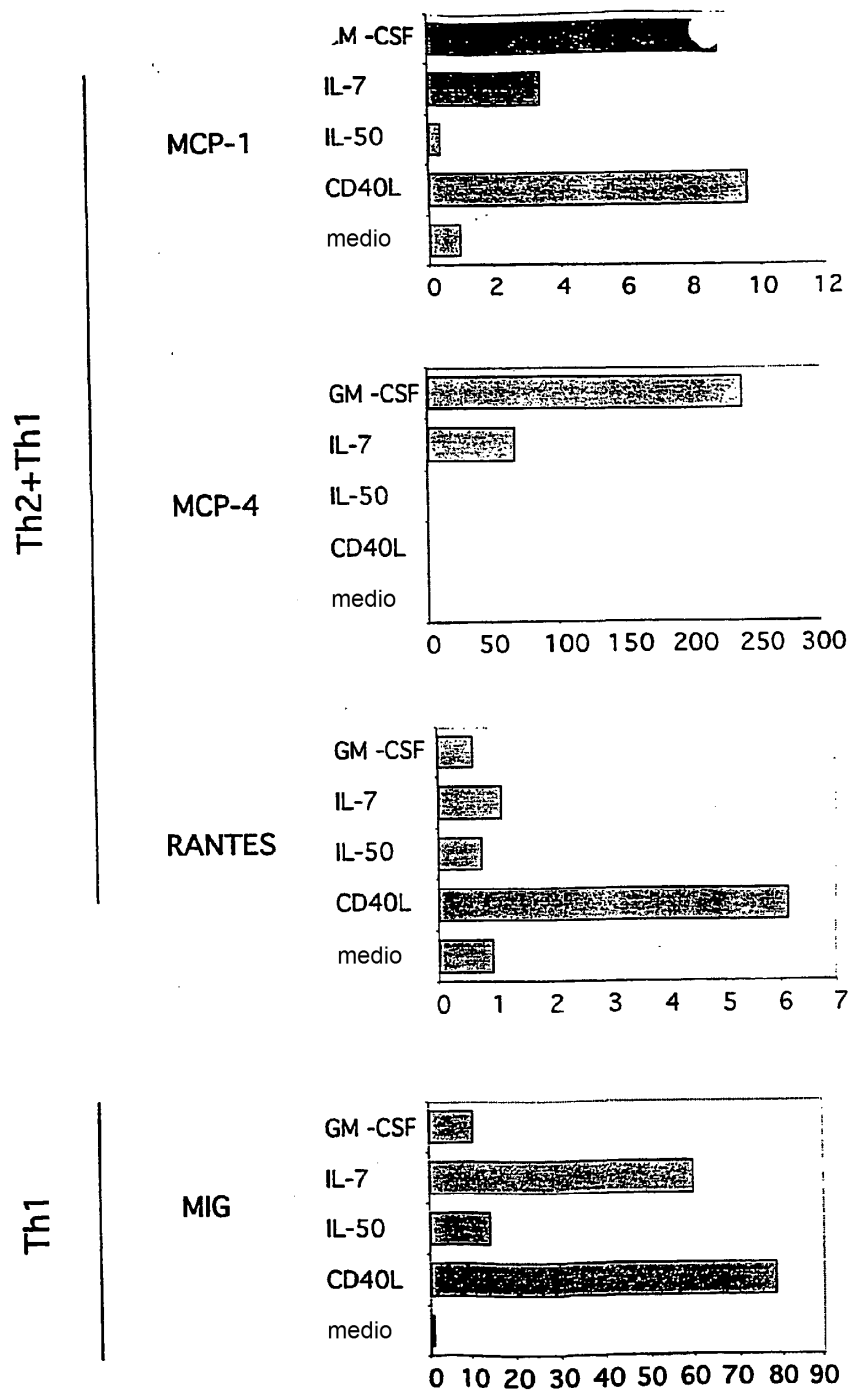


FIG. 14C

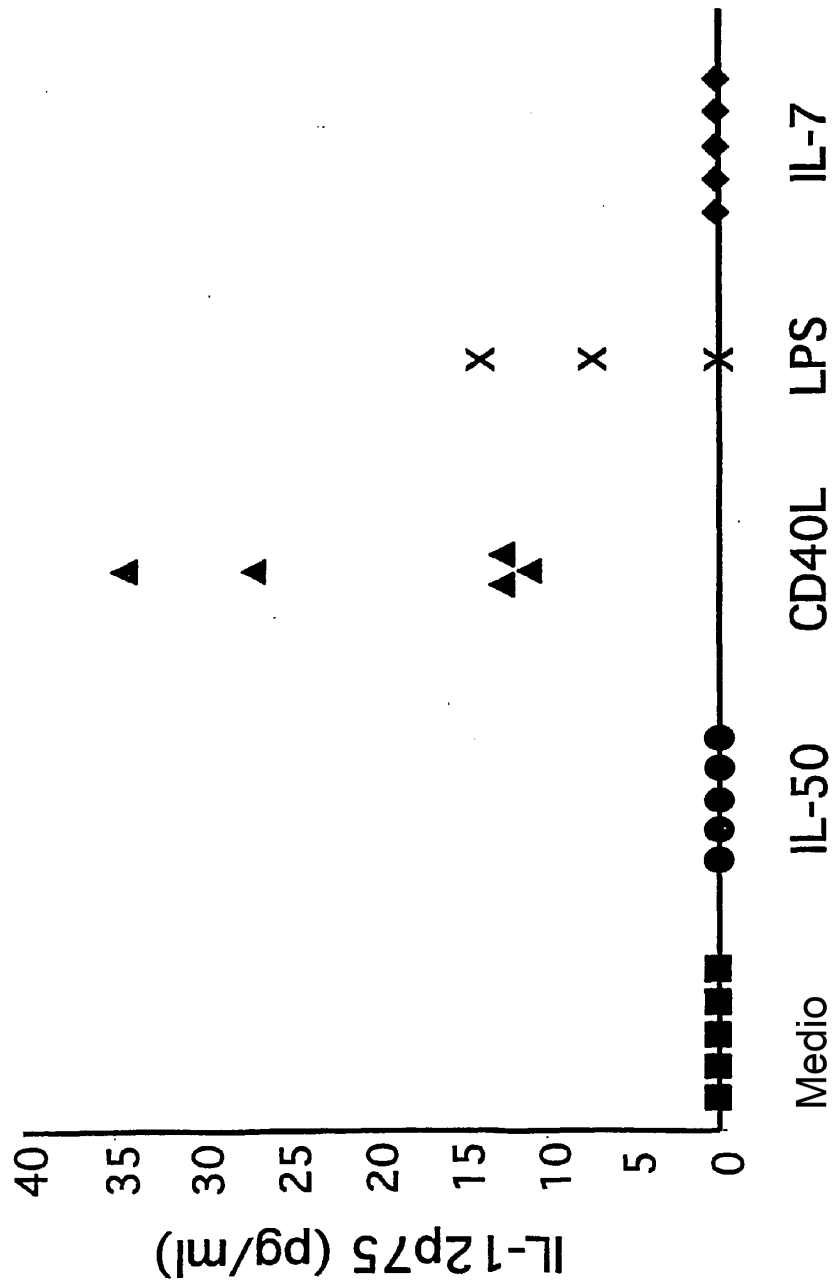


FIG. 15