

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 797**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/52** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/715** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2003** **E 11151759 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015** **EP 2338910**

54 Título: **Multímeros Zcytor17 receptores de citocinas**

30 Prioridad:

**18.01.2002 US 350325 P**

**14.06.2002 US 389108 P**

**19.12.2002 US 435361 P**

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

**28.09.2015**

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)**  
**1201 Eastlake Avenue East**  
**Seattle, Washington 98102, US**

72 Inventor/es:

**SPRECHER, CINDY A.;**  
**GAO, ZEREN;**  
**KUIJPER, JOSEPH L.;**  
**DASOVICH, MARIA M.;**  
**GRANT, FRANCIS J.;**  
**PRESNELL, SCOTT R.;**  
**WHITMORE, THEODORE E.;**  
**HAMMOND, ANGELA K.;**  
**NOVAK, JULIA E.;**  
**GROSS, JANE A. y**  
**DILLON, STACEY R.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 546 797 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

Multímeros Zcytor17 receptores de citocinas

5 **Antecedentes de la invención**

10 La proliferación y la diferenciación de células de organismos multicelulares están controladas por hormonas y factores de crecimiento polipeptídicos. Estas moléculas difundibles permiten a las células comunicarse entre sí y actuar conjuntamente para formar células, tejidos y órganos y reparar tejido dañado. Los ejemplos de hormonas y factores de crecimiento incluyen las hormonas esteroideas (por ejemplo, estrógeno, testosterona), hormona paratiroidea, hormona estimulante de folículos, interleucinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor estimulante de colonias de granulocitos - macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina (EPO) y calcitonina.

15 Las hormonas y los factores de crecimiento influyen en el metabolismo celular uniéndose a receptores. Los receptores pueden ser proteínas de membranas integrales que se unen a rutas de señalización dentro de la célula, tal como sistemas segundos mensajeros. Otras clases de receptores son las moléculas solubles, tales como los factores de transcripción.

20 Las citocinas en general estimulan la proliferación o diferenciación de células del linaje hematopoyético o participan en los mecanismos de respuestas inmunitarias e inflamatorias del organismo. Los ejemplos de citocinas que influyen en la hematopoyesis son la eritropoyetina (EPO), que estimula el desarrollo de glóbulos rojos; la trombopoyetina (TPO), que estimula el desarrollo de células del linaje de megacariocitos; y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), que estimula el desarrollo de neutrófilos. Estas citocinas son útiles para restaurar los niveles normales de células sanguíneas en pacientes que padecen anemia, trombocitopenia y neutropenia o que reciben quimioterapia contra el cáncer.

30 Las interleucinas son una familia de citocinas que median las respuestas inmunológicas, incluyendo la inflamación. Las interleucinas median diversas patologías inflamatorias. Los linfocitos T desempeñan una función primordial para una respuesta inmunitaria y produciendo muchas citocinas e inmunidad adaptativa a antígenos. Las citocinas producidas por linfocitos T se han clasificado como de tipo 1 y de tipo 2 (Kelso, A. Immun. Cell Biol. 76: 300-317, 1998). Las citocinas de tipo 1 incluyen IL-2, IFN- $\gamma$ , LT- $\alpha$ , y están implicadas en respuestas inflamatorias, inmunidad vírica, inmunidad parasitaria intracelular y rechazo de aloinjertos. Las citocinas de tipo 2 incluyen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13, y están implicadas en respuestas humorales, inmunidad a helmintos y respuesta alérgica. Las citocinas compartidas entre los Tipos 1 y 2 incluyen IL-3, GM-CSF y TNF- $\alpha$ . Existen algunos datos que sugieren que el Tipo 1 y el Tipo 2 que producen poblaciones de linfocitos T migran preferencialmente a diferentes tipos de tejido inflamado.

40 Los linfocitos T maduros pueden activarse, es decir, por un antígeno u otro estímulo, para producir, por ejemplo, citocinas, moléculas de señalización bioquímica, o receptores que también influyen sobre el destino de la población de linfocitos T.

Los linfocitos B pueden activarse mediante receptores en su superficie celular, incluyendo receptores de linfocitos B y otras moléculas accesorias para realizar funciones celulares accesorias, tales como la producción de citocinas.

45 Los monocitos/macrófagos y linfocitos T pueden activarse por receptores en su superficie celular y desempeñan un papel primordial en la respuesta inmunitaria, presentando antígeno a los linfocitos y también actúan como células accesorias para los linfocitos segregando numerosas citocinas.

50 Los linfocitos citolíticos naturales (NK, por las siglas en inglés Natural Killer cells) tienen una célula progenitora común con los linfocitos T y los linfocitos B, y desempeñan una función en la vigilancia inmunitaria. Los NK, que comprenden hasta el 15 % de los linfocitos de la sangre, no expresan receptores de antígenos y, por lo tanto, no usan reconocimiento MHC como requerimiento para unirse a una célula diana. Los NK están implicados en el reconocimiento y la destrucción de determinadas células tumorales y células infectadas por virus. Se cree que, *in vivo*, los NK requieren activación, no obstante, se ha demostrado que, *in vitro*, los NK destruyen algunos tipos de células tumorales sin activación.

El documento WO 02/00721 describe el receptor de citocina Zcytor17.

60 Las actividades demostradas *in vivo* de estas citocinas ilustran el enorme potencial de, y la necesidad de otras citocinas, agonistas de citocinas y antagonistas de citocinas o compañeros de unión.

La presente invención se dirige a estas necesidades proporcionando un nuevo receptor de citocina multimérico hematopoyético, así como composiciones y procedimientos relacionados, tal como se define en las reivindicaciones. La presente memoria descriptiva describe tales polipéptidos para estos y otro usos que, a partir de las enseñanzas incluidas en el presente documento, deben ser obvios para los expertos en la materia.

65 **Breve descripción de los dibujos**

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

5 La Figura 2 es una ilustración de una alineación múltiple de zcytor17lig (SEC ID N°: 2) (zcytor17lig) y zcytor17lig de ratón (SEC ID N°: 11) (mzcytor17lig).

La Figura 3 es una representación de hidrofiliidad Hopp/Woods de zcytor17lig humano (SEC ID N°: 2).

La Figura 4 es una alineación múltiple de secuencias de polinucleótidos de zcytor17 SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 113, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 111, y SEC ID N°: 115.

10 La Figura 5 es una alineación de zcytor17 humano (ZCYTOR) (SEC ID N°: 5) y zcytor17 de ratón (M17R-O) (SEC ID N°: 117). Entre las dos secuencias, se indican restos idénticos (:), restos conservados (.) y huecos (-).

### Sumario de la invención

15 La presente memoria descriptiva describe un receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado que comprende al menos un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 por ciento con la SEC ID N°: 111 o SEC ID N°: 109; y en el que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende la SEC ID N°: 2. Opcionalmente, el receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede comprender adicionalmente un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I. El dominio de unión a citocina del receptor de citocina de clase I puede comprender del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al 761 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al 761 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al 979 de la SEC ID N°: 7, o del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 979 de la SEC ID N°: 7. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado puede antagonizar una actividad de la SEC ID N°: 2. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado puede inhibir la proliferación de células hematopoyéticas, inhibir la proliferación de células inmunitarias, inhibir la proliferación de células inflamatorias, inhibir una respuesta inmunitaria, inhibir una respuesta inflamatoria, o inhibir la proliferación de células tumorales de origen epitelial. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado puede ser soluble. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado puede comprender adicionalmente un marcador de afinidad, tal como, por ejemplo, polihistidina, proteína A, glutatión S transferasa, Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag™, péptido de unión a estreptavidina y polipéptido F<sub>c</sub> de inmunoglobulina, o una molécula citotóxica, tal como, por ejemplo, una toxina o un radionúclido. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado en el que el polipéptido posee al menos un 90 por ciento de identidad con la SEC ID N°: 111 puede comprender del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 519 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al 543 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al 732 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 227, del resto de aminoácido 1 al 519, del resto de aminoácido 1 al 543 o del resto de aminoácido 1 al resto aminoácido 732. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado en el que el polipéptido tiene al menos una identidad del 90 por ciento con la SEC ID N°: 109 puede comprender del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 649 de la SEC ID N°: 109, o del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 649 de la SEC ID N°: 109.

La presente memoria descriptiva describe un receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado que comprende al menos un polipéptido que comprende del resto de aminoácido 20 al 227 de la SEC ID N°: 111. El al menos un polipéptido puede comprender del resto de aminoácido 1 al 227 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al 519 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al 519 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 543 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 543 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 732 de la SEC ID N°: 111, o del resto de aminoácido 20 al 732 de la SEC ID N°: 111. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado puede comprender adicionalmente un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I, por ejemplo, del resto de aminoácido 28 al 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al 761 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 761 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 979 de la SEC ID N°: 7 o del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 979 de la SEC ID N°: 7. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado puede antagonizar una actividad de un ligando que comprende la SEC ID N°: 2. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado puede inhibir la proliferación de células hematopoyéticas, inhibir la proliferación de células inmunitarias, inhibir la proliferación de células inflamatorias, inhibir una respuesta inmunitaria, inhibir una respuesta inflamatoria, o inhibir la proliferación de células tumorales de origen epitelial. Opcionalmente, el receptor citocina multimérico o heterodimérico aislado puede ser soluble. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico aislado puede comprender adicionalmente un marcador de afinidad, tal como, por ejemplo, polihistidina, proteína A, glutatión S transferasa, Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag™, péptido de unión a estreptavidina y polipéptido F<sub>c</sub> de inmunoglobulina, o una molécula citotóxica, tal como, por ejemplo, una toxina o un radionúclido.

La presente memoria descriptiva describe un receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al 227 de la SEC ID N°: 111 y del resto de aminoácido 28 al 429 de la SEC ID N°: 7.

5 La presente memoria descriptiva describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido del receptor de citocina que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 por ciento con la SEC ID N°: 111 o SEC ID N°: 109, en el que el polipéptido del receptor de citocina forma un receptor de citocina multimérico o heterodimérico y en el que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende la SEC ID N°: 2. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede comprender  
 10 adicionalmente un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I, tal como, por ejemplo, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 761 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 979 de la SEC ID N°: 7, o del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido  
 15 979 de la SEC ID N°: 7. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede antagonizar una actividad de la SEC ID N°: 2. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede inhibir la proliferación de células hematopoyéticas, inhibir la proliferación de células inmunitarias, inhibir la proliferación de células inflamatorias, inhibir una respuesta inmunitaria, inhibir una respuesta inflamatoria o inhibir la proliferación de células tumorales de origen epitelial. Opcionalmente, el receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede ser soluble. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede comprender adicionalmente un marcador de afinidad, tal como, por ejemplo, polihistidina, proteína A, glutatión S transferasa, Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag™, péptido de unión a estreptavidina y polipéptido F<sub>c</sub> de inmunoglobulina, o una molécula citotóxica, tal como, por ejemplo, una toxina o un radionúclido. El polipéptido del receptor de citocina codificado que posee al menos un 90 por ciento de identidad con  
 20 la SEC ID N°: 111 puede comprender del resto de aminoácido 20 al resto aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al 519 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al 543 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al 732 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al 227 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al 519 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 543 de la SEC ID N°: 111, o del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 732 de la SEC ID N°: 111. El polipéptido del receptor de citocina codificado que posee al menos un 90 por ciento de identidad con la SEC ID N°: 109 puede comprender del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 649 de la SEC ID N°: 109, o del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 649 de la SEC ID N°: 109.

La presente memoria descriptiva describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido del receptor de citocina que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111, en el que el polipéptido del receptor de citocina forma un receptor de citocina multimérico o heterodimérico. El polipéptido del receptor de citocina puede comprender del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 519 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 519 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 543 de la SEC ID N°: 111,  
 35 del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 543 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 732 de la SEC ID N°: 111, o del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 732 de la SEC ID N°: 111. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede comprender adicionalmente un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I, tal como, por ejemplo, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 761 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 761 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 979 de la SEC ID N°: 7, o del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 979 de la SEC ID N°: 7. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico pueden antagonizar una actividad de un ligando que comprende la  
 40 SEC ID N°: 2. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede inhibir la proliferación de células hematopoyéticas, inhibir la proliferación de células inmunitarias, inhibir la proliferación de células inflamatorias, inhibir una respuesta inmunitaria, inhibir una respuesta inflamatoria, o inhibir la proliferación de células tumorales de origen epitelial. Opcionalmente el receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede ser soluble. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede comprender adicionalmente un marcador de afinidad o una molécula citotóxica como se describe en el presente documento.  
 45 50 55

La presente memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: un promotor de la transcripción; un segmento de ADN que codifica un polipéptido del receptor de citocina que posee al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 111; y un terminador de la transcripción; en el que el polipéptido del receptor de citocina forma un receptor de citocina multimérico o heterodimérico y en el que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende la SEC ID N°: 2.  
 60

Como alternativa, la presente memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: a) un primer promotor de la transcripción; un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido del receptor de citocina que tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con la  
 65

SEC ID N°: 111; y un primer terminador de la transcripción; y b) un segundo promotor de la transcripción; un segundo segmento de ADN que codifica un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I; y un segundo terminador de la transcripción; en el que el polipéptido del receptor de citocina y el receptor de citocina de clase I forman un receptor de citocina multimérico o heterodimérico; y en el que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende la SEC ID N°: 2.

Como alternativa, la presente memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: a) un primer promotor de la transcripción; un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido que posee al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 111; y un primer terminador de la transcripción; y b) un segundo promotor de la transcripción; un segundo segmento de ADN que codifica al menos una parte de un receptor de citocina de clase I; y un segundo terminador de la transcripción; en el que el polipéptido y el receptor de citocina de clase I forman un receptor de citocina multimérico; y en el que el receptor de citocina multimérico se une al menos a una parte de la SEC ID N°: 2.

Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden incluir una secuencia de señal secretora unida al primer y al segundo segmento de ADN. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede ser soluble, unirse a membrana, o adherirse a un soporte sólido. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede antagonizar una actividad de un ligando que comprende la SEC ID N°: 2. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede inhibir la proliferación de células hematopoyéticas, inhibir la proliferación de células inmunitarias, inhibir la proliferación de células inflamatorias, inhibir una respuesta inmunitaria, inhibir una respuesta inflamatoria, o inhibir la proliferación de células tumorales de origen epitelial. Opcionalmente el receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede ser soluble. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede comprender adicionalmente un marcador de afinidad o una molécula citotóxica como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona una célula cultivada que incluye un vector de expresión como se define en las reivindicaciones, en el que la célula expresa el polipéptido o los polipéptidos codificados por el segmento o los segmentos de ADN. La célula puede secretar el receptor de citocina multimérico o heterodimérico. El receptor de citocina multimérico puede unirse a, y/o antagonizar una actividad de, la SEC ID N°: 2 como se describe adicionalmente en el presente documento.

La presente memoria descriptiva describe una células cultivada que incluye un primer vector de expresión que comprende: a) un promotor de la transcripción; b) un segmento de ADN que codifica un polipéptido del receptor de citocina que tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 111; y c) un terminador de la transcripción; y un segundo vector de expresión que comprende: a) un promotor de la transcripción; b) un segmento de ADN que codifica un dominio de unión a citocina del receptor de citocina de clase I; y c) un terminador de la transcripción; en el que el polipéptido del receptor de citocina y el receptor de citocina de clase I forman un receptor de citocina multimérico o heterodimérico y en el que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende la SEC ID N°: 2. El primer y el segundo vector de expresión pueden incluir una secuencia de señal secretora unida operativamente al primer y al segundo segmento de ADN. La célula cultivada puede comprender adicionalmente un tercer vector de expresión que incluye a) un promotor de la transcripción; b) un segmento de ADN que codifica un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I y c) un terminador de la transcripción; en el que el polipéptido del receptor de citocina, el primer receptor de citocina de clase I y el segundo receptor de citocina de clase I forman un receptor de citocina multimérico. El dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I puede ser de la SEC ID N°: 7 y/o la SEC ID N°: 9. Opcionalmente, el receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede ser soluble. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede incluir adicionalmente un marcador de afinidad como se describe en el presente documento. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede unirse al menos a una parte de la SEC ID N°: 2 y/o antagonizar una actividad de la SEC ID N°: 2 como se describe en el presente documento.

La presente memoria descriptiva describe un procedimiento para producir un anticuerpo contra un receptor de citocina multimérico o heterodimérico que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I. El procedimiento incluye inocular a un animal el receptor de citocina multimérico o heterodimérico, en el que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico provoca una respuesta inmunitaria en el animal para producir un anticuerpo que se una específicamente al receptor de citocina multimérico o heterodimérico; y aislar el anticuerpo del animal. El anticuerpo puede ser opcionalmente un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser opcionalmente un anticuerpo neutralizante. El anticuerpo puede unirse específicamente a un receptor de citocina multimérico o heterodimérico como se describe en el presente documento.

La presente memoria descriptiva describe una composición que incluye una cantidad eficaz de un receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El dominio de unión del receptor de citocina de clase I puede incluir del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede unirse a un ligando que comprende la SEC ID N°: 2. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico

soluble puede incluir adicionalmente un marcador de afinidad o una molécula citotóxica como se describe en el presente documento. La composición puede antagonizar una actividad de un ligando que comprende la SEC ID N°: 2. La composición puede inhibir la proliferación de células hematopoyéticas, inhibir la proliferación de células inmunitarias, inhibir la proliferación de células inflamatorias, inhibir una respuesta inmunitaria, inhibir una respuesta inflamatoria, o inhibir la proliferación de células tumorales de origen epitelial.

La presente invención proporciona un procedimiento para producir un receptor de citocina multimérico o heterodimérico (como se define en las reivindicaciones), que comprende cultivar una célula, como se describe en el presente documento, y aislar el receptor de citocina multimérico o heterodimérico producido por la célula.

La presente memoria descriptiva describe una composición que inhibe células inmunitarias que incluye una cantidad eficaz de un receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I; y un vehículo farmacéuticamente aceptable; en el que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico inhibe la proliferación de células inmunitarias.

La presente memoria descriptiva describe una composición que inhibe una respuesta inmunitaria que incluye una cantidad eficaz de un receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I; y un vehículo farmacéuticamente aceptable; en el que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble inhibe una respuesta inmunitaria.

La presente memoria descriptiva describe una composición que inhibe células inflamatorias que incluye una cantidad eficaz de un receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I; y un vehículo farmacéuticamente aceptable; en el que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble inhibe la proliferación de células inflamatorias.

La presente memoria descriptiva describe una composición que inhibe una respuesta inflamatoria que incluye una cantidad eficaz de un receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I; y un vehículo farmacéuticamente aceptable; en el que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble inhibe una respuesta inflamatoria.

La presente memoria descriptiva describe un procedimiento para inhibir una respuesta inmunitaria en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno. El procedimiento incluye (a) determinar, directa o indirectamente, el nivel de antígeno o patógeno presente en el mamífero; (b) administrar una composición que comprenda un receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (c) determinar, directa o indirectamente, el nivel de antígeno o patógeno en el mamífero; y (d) comparar el nivel del antígeno o patógeno en la etapa (a) con el nivel de antígeno o patógeno en la etapa (c), en el que un cambio en el nivel es indicativo de inhibición de una respuesta inmunitaria. El procedimiento puede comprender adicionalmente (e) volver a administrar una composición que comprenda un receptor de citocina multimérico en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (f) determinar, directa o indirectamente, el nivel de antígeno o patógeno en el mamífero y (g) comparar la cantidad del nivel de antígeno o patógeno en la etapa (a) con el nivel de antígeno en la etapa (f), en el que un cambio en el nivel es indicativo de inhibición de una respuesta inmunitaria.

La presente invención también proporciona un procedimiento (como se define en las reivindicaciones) para reducir células hematopoyéticas y/o células progenitoras hematopoyéticas en un mamífero. El procedimiento incluye cultivar células de médula ósea o de sangre periférica con una composición que comprenda una cantidad eficaz de un receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble de la invención para producir una disminución en la cantidad de células linfoides en las células de médula ósea o de sangre periférica en comparación con las células de la médula ósea o de sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor de citocina multimérico. Las células hematopoyéticas y progenitoras de células hematopoyéticas pueden ser células linfoides que pueden ser células monocíticas, macrófagos o linfocitos T.

La presente invención también proporciona un procedimiento (como se define en las reivindicaciones) para detectar, en una muestra biológica, la presencia de un receptor de citocina multimérico o heterodimérico. El procedimiento incluye poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o con un fragmento de anticuerpo, como se describe en el presente documento, en el que la puesta en contacto se realiza en condiciones que permitan la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo con la muestra biológica y detectar cualquier anticuerpo unido o fragmento de anticuerpo unido.

La presente invención también proporciona un procedimiento *in vitro* de destrucción de células cancerosas, como se define en las reivindicaciones. El procedimiento incluye obtener producir un receptor de citocina multimérico o heterodimérico mediante un procedimiento como se describe en el presente documento; formular el receptor de citocina multimérico o heterodimérico en un vehículo farmacéuticamente aceptable y exponer una muestra biológica

que contiene las células cancerosas a la formulación del receptor de citocina multimérico o heterodimérico; en el que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico destruye las células. El receptor de citocina multimérico o heterodimérico puede conjugarse también con una toxina.

- 5 La presente invención también proporciona un anticuerpo (como se define en las reivindicaciones) que se une específicamente a un receptor de citocina multimérico o heterodimérico como se describe en el presente documento. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo humanizado derivado de un anticuerpo monoclonal murino, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo neutralizante o un anticuerpo monoclonal humano. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse específicamente a un
- 10 receptor de citocina multimérico o heterodimérico de la presente invención y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I, como se define en las reivindicaciones. El anticuerpo puede incluir adicionalmente un radionúclido, una enzima, un sustrato, un cofactor, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, una etiqueta peptídica, una partícula magnética, un fármaco o una toxina.
- 15 La presente memoria descriptiva describe la inhibición de la proliferación o diferenciación, inducidas por zcytor17lig, de células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas. El procedimiento incluye cultivar células de médula ósea o de sangre periférica con una composición que comprenda a una cantidad de un receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble que comprenda un polipéptido del receptor de citocina que comprenda del
- 20 resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I suficiente para reducir la proliferación o diferenciación de las células hematopoyéticas o de sangre periférica en la médula ósea en comparación con las células de médula ósea o de sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble. Las células hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas pueden ser células linfoides, tal como macrófagos o linfocitos T.
- 25 La presente memoria descriptiva describe la reducción de la inflamación inducida por zcytor17lig. El procedimiento incluye administrar a un mamífero, con inflamación, una cantidad de una composición que comprenda del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina del receptor de citocina de clase I suficiente para reducir la inflamación.
- 30 La presente memoria descriptiva describe la supresión de una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación. El procedimiento incluye (1) determinar un nivel de una molécula inflamatoria; (2) administrar una composición que comprenda del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3)
- 35 determinar un nivel de post-administración de la molécula antiinflamatoria; (4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (3), en el que una ausencia de aumento o una disminución del nivel de la molécula inflamatoria es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria.
- 40 La presente memoria descriptiva describe la inhibición de la proliferación o diferenciación, inducida por zcytor17lig, de células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas. El procedimiento incluye cultivar células de médula ósea o de sangre periférica con una composición que comprenda del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I en un vehículo farmacéuticamente aceptable suficiente para reducir la proliferación o diferenciación de las células
- 45 hematopoyéticas en la médula ósea o de las células de sangre periférica en comparación con las células de médula ósea o de sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble. Las células hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas pueden ser células linfoides, tales como macrófagos o linfocitos T.
- 50 La presente memoria descriptiva describe la reducción de la inflamación inducida por zcytor17lig. El procedimiento incluye administrar a un mamífero, con inflamación, una cantidad de una composición que comprenda del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I en un vehículo farmacéuticamente aceptable suficiente para reducir la inflamación.
- 55 La presente memoria descriptiva describe la supresión de una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación. El procedimiento incluye (1) determinar un nivel de una molécula inflamatoria; (2) administrar una composición que comprenda un receptor de citocina multimérico o heterodimérico que comprenda del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111, en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3)
- 60 determinar un nivel de post-administración de la molécula inflamatoria; (4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (3), en el que una ausencia de aumento o una disminución en el nivel de la molécula inflamatoria es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria.
- 65 La presente memoria descriptiva describe el tratamiento de un mamífero que padece una enfermedad inflamatoria en la que zcytor17lig desempeña una función. El procedimiento incluye administrar, al mamífero, un antagonista de zcytor17lig, de tal manera que la inflamación se reduzca, en el que el antagonista es un receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la

SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La enfermedad inflamatoria puede ser una enfermedad inflamatoria crónica, tal como, por ejemplo, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, dermatitis atópica, eczema o soriasis. La enfermedad inflamatoria puede ser una enfermedad inflamatoria aguda, tal como, por ejemplo, endotoxemia, septicemia, síndrome de choque tóxico, o una enfermedad infecciosa. Opcionalmente, el receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble puede comprender adicionalmente un radionúclido, una enzima, un sustrato, un cofactor, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, una etiqueta peptídica, una partícula magnética, un fármaco o una toxina.

La presente memoria descriptiva describe la detección de inflamación en un paciente. El procedimiento incluye obtener un tejido o una muestra biológica de un paciente; incubar el tejido o la muestra biológica con un receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble que comprenda del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I en condiciones en las que el receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble se una a su polipéptido complementario en el tejido o en la muestra biológica; visualizar el receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble unido en el tejido o en la muestra biológica y comparar los niveles del receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble unido en el tejido o en la muestra biológica del paciente con los de un tejido o una muestra biológica control normal, en el que un aumento en el nivel del receptor de citocina multimérico o heterodimérico soluble unido al tejido o muestra biológica del paciente con respecto al tejido o muestra biológica control normal es indicativo de la inflamación en el paciente.

La presente memoria descriptiva describe la detección de un ligando del receptor de citocina múltiple de una muestra de ensayo. El procedimiento incluye poner en contacto la muestra de ensayo con un receptor de citocina multimérico o heterodimérico que comprenda un polipéptido del receptor de citocina que comprenda del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocina de clase I; y detectar, en la muestra de ensayo, la unión del receptor de citocina multimérico o heterodimérico al ligando.

### Descripción detallada de la invención

#### *Definiciones*

Antes de exponer la invención en detalle, tal vez resulte útil para entenderla, definir los siguientes términos y expresiones:

A menos que se especifique de otra manera, "un", "uno", "una", "el", "la" y "al menos un, uno, una" se usan indistintamente y significa uno (a) o más de uno (a).

La expresión "marcador de afinidad" se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que pueda unirse a un segundo polipéptido para proporcionar la purificación o la detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios de unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, como marcador de afinidad puede usarse cualquier péptido o proteína para el o la cual esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico. Los marcadores de afinidad incluyen una extensión de polihistidina, proteína A (Nilsson y col., EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson y col., Methods Enzymol. 198: 3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31, 1988), marcador de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952-4, 1985), sustancia P, péptido Flag™ (Hopp y col., Biotechnology 6: 1204-10, 1988), péptido de unión a estreptavidina u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford y col., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991. Los ADN que codifican marcadores de afinidad se obtienen de proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

La expresión "variante alélica", se usa en el presente documento para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de manera natural a través de mutación y puede producir un polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante alélica también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

Los términos "aminoterminal" y "carboxiterminal" se usan en el presente documento para indicar posiciones dentro de los polipéptidos. Si el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia o parte de un polipéptido particular para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una secuencia determinada en posición carboxiterminal con respecto a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido se localiza próxima al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

La expresión "par de complemento/anticomplemento" indica restos no idénticos que forman un par estable, no covalentemente asociado en condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o estreptavidina) son



miembros prototípicos de un par de complemento/anticomplemento. Otros pares ilustrativos de complemento/anticomplemento incluyen pares receptor/ligando, pares anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos sentido/antisentido y similares. Cuando se desee la disociación posterior del par de complemento/anticomplemento, el par de complemento/anticomplemento tendrá preferentemente una afinidad de unión de  $<10^9 \text{ M}^{-1}$ .

La expresión “complementos de una molécula de polinucleótidos” indica una molécula de polinucleótidos que tiene una secuencia base complementaria y orientación inversa según lo comparado con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria a 5' CCCGTGCAT 3'.

El término “cóntigo” indica un polinucleótido que tiene una extensión contigua de secuencia idéntica o complementaria a otro polinucleótido. Se dice que las secuencias contiguas se “superponen” a una extensión determinada de secuencia de polinucleótidos o bien en su totalidad o a lo largo de una extensión parcial del polinucleótido. Por ejemplo, los cóntigos representativos para la secuencia de polinucleótidos 5'-ATGGCTTAGGTT-3' son 5'-TAGCTTgagtct-3' y 3'-gtcgacTACCGA-5'.

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

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

El término “aislado”, cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido se ha eliminado de su entorno genético natural y está entonces libre de otras secuencias codificantes extrañas o no deseadas y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas geotecnológicas. Dichas moléculas aisladas son aquellas que se separan de su entorno natural e incluyen clones genómicos y ADNc. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención están exentas de otros genes con los que habitualmente se asocian, pero pueden incluir regiones 5' y 3' de origen natural sin traducir, tal como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será obvia para el experto en la materia (véase por ejemplo Dynan y Tijan, Nature 316: 774-78, 1985).

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

El término “neoplásico”, cuando se refiere a células, indica células que experimentan proliferación nueva y anómala, particularmente en un tejido en el que la proliferación es descontrolada y progresiva, provocando neoplasia. Las células neoplásicas pueden ser malignas, es decir, invasivas y metastásicas, o benignas.

La expresión “unido operativamente”, cuando se refiere a segmentos de ADN, indica que los segmentos se disponen de modo que funcionan juntos para sus fines pretendidos, por ejemplo la transcripción se inicia en el promotor y continúa a través del segmento codificante hacia el terminador.

El término “ortólogo” indica un polipéptido o una proteína obtenidos a partir de una especie que es el equivalente funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencias entre ortólogos son el resultado de la especiación.

“Parálogos” son proteínas distintas pero estructuralmente relacionadas elaboradas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen a través de la duplicación de genes. Por ejemplo, la  $\alpha$ -globina, la  $\beta$ -globina y la mioglobina son parálogos entre sí.

Un “polinucleótido” es un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídas desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro*, o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales o sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviados “pb”), nucleótidos (“nt”) o kilobases (“kb”). Si el contexto lo permite, los últimos dos términos pueden describir polinucleótidos que son monocatenarios o

bicatenarios. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, se usa para indicar longitud total y se entenderá que es equivalente a la expresión "pares de bases". Los expertos en la materia reconocerán que dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en longitud y que sus extremos pueden escalonarse como resultado de la escisión enzimática; por tanto todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótidos bicatenaria pueden no estar apareados.

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

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

Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptidos. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos tal como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína por la célula en la que se produce la proteína y variará con el tipo de célula. En el presente documento, las proteínas se definen en cuanto a sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; los sustituyentes, tales como, grupos carbohidrato, en general no se especifican pero pueden estar presentes de todos modos.

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

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

Un "receptor soluble" es un polipéptido receptor que no está unido a una membrana celular. Los receptores solubles son más comúnmente polipéptidos receptores de unión al ligando que carecen de dominios transmembrana y citoplásmicos. Los receptores solubles pueden comprender restos de aminoácidos adicionales, tales como marcadores de afinidad que proporcionan la purificación del polipéptido o proporcionan sitios para la adhesión del polipéptido a un sustrato, o secuencias de región constante de inmunoglobulina. Muchos receptores de superficie celular poseen equivalentes solubles, de origen natural, que se producen por proteólisis. Se dice que los polipéptidos receptores solubles carecen sustancialmente de segmentos de polipéptidos transmembrana e intracelular cuando carecen de partes suficientes de estos segmentos para proporcionar un anclaje de membrana o una transducción de señal, respectivamente.

La expresión "variante de empalme" se usa en el presente documento para indicar formas alternativas de ARN transcritas de un gen. La variación de empalmes surge naturalmente a través del uso de sitios de empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita, o menos normalmente entre moléculas de ARN transcritas separadamente, y puede dar como resultado diversos ARNm transcritos del mismo gen. Las variantes de empalme pueden codificar polipéptidos que tengan la secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante de empalme también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante de empalme de un ARNm transcrito de un gen.

Se entenderá que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros, determinados por métodos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis en gel) serán valores aproximados. Cuando se expresen dichos valores como "alrededor de" X o "aproximadamente" X, se entenderá que el valor establecido de X tendrá una precisión de  $\pm 10\%$ .

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de una nueva proteína del receptor de citocina multimérico que posee la estructura de un receptor de citocina de clase I, denominado en el presente documento "receptor de citocina multimérico" o "receptor de citocina multimérico zcytor17". El receptor de citocina multimérico

incluye al menos una parte de una subunidad del receptor zcytor17, desvelada en la Solicitud de Patente de Estados Unidos del mismo solicitante N° de Serie 09/892,949. Otro polipéptido de la subunidad del receptor que puede estar incluido en el receptor de citocina multimérico de la presente invención incluye al menos una parte de al menos un polipéptido de un receptor de citocina de clase I, tal como OSMRbeta y/o WSX-1. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos deducida indica que zcytor17 pertenece a la subfamilia de receptores que incluye gp130, LIF, IL-12, receptor de oncostatina M beta (OSMRbeta) (SEC ID N°: 7), receptores WSX-1 (SEC ID N°: 9) (Sprecher, CA y col., Biochem. Biophys. Res. Comm., 246: 81-90 (1998); y Patente de Estados Unidos N° 5.925.735), DCRS2 (Publicación WIPO N° WO 00/73451), la subunidad  $\beta$  del receptor de IL-2 y el receptor común  $\beta$  (es decir, subunidades de receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF). Un ejemplo adicional de polipéptidos subunitarios de receptores de citocina de clase I que pueden incluirse en el receptor de citocina multimérico son los receptores de IL-2, IL-4, IL-7, LIF, IL-12, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF y G-CSF (Cosman, Cytokine, 5(2): 95-106 (1993)).

Las subunidades de receptores de citocina se caracterizan por una estructura multidominio que comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana que ancla el polipéptido en la membrana celular y un dominio intracelular. El dominio extracelular puede ser un dominio de unión a ligando y el dominio intracelular puede ser un dominio efector implicado en señales de transducción, aunque las funciones de unión a ligando y efectoras pueden residir en subunidades separadas de un receptor multimérico. El dominio de unión a ligando puede en sí mismo una estructura multidominio. Los receptores multiméricos incluyen homodímeros (por ejemplo, isoformas  $\alpha\alpha$  y  $\beta\beta$  del receptor de PDGF, receptor de eritropoyetina, receptor de MPL y G-CSF), heterodímeros cuyas subunidades poseen cada una dominios efectores y de unión a ligando (por ejemplo la isoforma  $\alpha\beta$  del receptor de PDGF) y multímeros que poseen subunidades con funciones dispares (por ejemplo receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 y GM-CSF). Algunas subunidades de receptores son comunes a una pluralidad de receptores. Por ejemplo, la subunidad AIC2B, que no puede unirse a su propio ligando pero incluye un dominio de transducción de señal intracelular, es un componente de los receptores de IL-3 y GM-CSF. Muchos receptores de citocina pueden incluirse en una de las cuatro familias relacionadas basándose en la estructura y función. Los receptores hematopoyéticos, por ejemplo, se caracterizan por la presencia de un dominio que contiene restos de cisteína conservados y el motivo WSXWS (SEC ID N°: 3). La estructura del receptor de citocina la han revisado Urdal, Ann. Reports Med. Chem. 26: 221-228, 1991 y Cosman, Cytokine 5: 95-106, 1993. Bajo presión selectiva para organismos que adquieren nuevas funciones biológicas, los miembros de la nueva familia de receptores probablemente surgen de la duplicación de genes de receptores existentes que conducen a la existencia de familias multigénicas. Miembros de familias contienen de esta manera vestigios del gen ancestral y estos rasgos característicos pueden aprovecharse en el aislamiento e identificación de miembros de familias adicionales. Por tanto, la superfamilia del receptor de citocina se divide en varias familias, por ejemplo, la familia de inmunoglobulina (incluyendo receptores de CSF-1, MGF, IL-1 y PDGF); la familia de hematopoyetina (incluyendo la subunidad  $\beta$  del receptor de IL-2, la subunidad  $\alpha$  del receptor de GM-CSF, la subunidad  $\beta$  del receptor de GM-CSF; y receptores G-CSF, EPO, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 e IL-9); la familia del receptor de TNF (incluyendo receptores de TNF (p80), TNF (p60), CD27, CD30, CD40, Fas y NGF).

El análisis de la secuencia de zcytor17 sugiere que este es un miembro de la misma subfamilia de receptores que la de los receptores de gp130, LIF, IL-12, WSX-1, subunidad  $\beta$  del receptor de IL-2, IL-3, IL-4 e IL-6. Algunos receptores en esta subfamilia (por ejemplo, G-CSF) se asocian para formar homodímeros que transducen una señal. Otros miembros de la subfamilia (por ejemplo, receptores de gp130, IL-6, IL-11 y LIF) se combinan con una segunda subunidad (denominada subunidad  $\beta$ ) para unirse al ligando y transducir una señal. Las subunidades  $\beta$  específicas se asocian con una pluralidad de subunidades de receptores de citocina específicos. Por ejemplo, la subunidad  $\beta$  de gp130 (Hibi y col., Cell 63: 1149-1157, 1990) se asocia con subunidades de receptores específicas para IL-6, IL-11, y LIF (Gearing y col., EMBO J. 10: 2839-2848, 1991; Gearing y col., Patente de Estados Unidos N° 5.284.755). La oncostatina M se une a un heterodímero del receptor de LIF y gp130. El CNTF se une a receptores triméricos que comprenden subunidades del receptor de CNTF, receptor de LIF y de gp130.

Un receptor de citocina multimérico de la presente invención puede ser un heterodímero, trímero, tetrámero, pentámero y similar, que comprende al menos una parte de zcytor17 y al menos una parte de un receptor de citocina de clase I, como se define en las reivindicaciones. Además, un receptor de citocina multimérico puede ser soluble, estar unido a membrana o adherido a un soporte sólido. El análisis de la distribución tisular del ARNm del receptor zcytor17 revela expresión en subconjuntos activados de linfocitos T CD4+ y CD8+, monocitos CD14+ y una expresión más débil de linfocitos B CD19+. Además, el ARN estaba presente tanto en líneas de células monocíticas inactivadas o activadas THP-1 (ATCC N° TIB-202), U937 (ATCC N° CRL-1593.2) y HL60 (ATCC N° CCL-240).

Las secuencias de nucleótidos de ADN representativas que codifican a zcytor17 se describen en la SEC ID N°: 110 (desde el nucleótido 171 al 2366), describiéndose su secuencia deducida de 732 aminoácidos en la SEC ID N°: 111; SEC ID N°: 108 (desde el nucleótido 162 al 2108), describiéndose su secuencia deducida de 649 aminoácidos en la SEC ID N°: 109; y en la SEC ID N°: 4 (desde el nucleótido 497 al 2482), describiéndose su secuencia deducida de 662 aminoácidos en la SEC ID N°: 5. En su totalidad, el polipéptido zcytor17 (SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109 o SEC ID N°: 5) representa un segmento polipeptídico de longitud completa (del resto 1 (Met) al resto 732 (Val) de la SEC ID N°: 111; del resto 1 (Met) al resto 649 (Ile) de la SEC ID N°: 109; del resto 1 (Met) al resto 662 (Ile) de la SEC ID N°: 5). Adicionalmente, más adelante, se describen los dominios y los rasgos funcionales de los polipéptidos zcytor17.

El análisis del polipéptido zcytor17 codificado por la secuencia de ADN de la SEC ID N°: 110 reveló una fase de lectura abierta que codificaba 732 aminoácidos (SEC ID N°: 111) que comprendía un péptido de señal secretor predicho de 19 restos de aminoácidos (del resto 1 (Met) al resto 19 (Ala) de la SEC ID N°: 111), y un polipéptido maduro de 713 aminoácidos (del resto 20 (Ala) al resto 732 (Val) de la SEC ID N°: 111). El análisis del polipéptido

5 zcytor17 codificado por la secuencia de ADN de la SEC ID N°: 108 reveló una fase de lectura abierta que codificaba 649 aminoácidos (SEC ID N°: 109) que comprendía un péptido de señal secretor predicho de 19 restos de aminoácidos (del resto 1 (Met) al resto 19 (Ala) de la SEC ID N°: 109), y un polipéptido maduro de 630 aminoácidos (del resto 20 (Ala) al resto 649 (Ile) de la SEC ID N°: 109). El análisis del polipéptido zcytor17 codificado por la secuencia de ADN de la SEC ID N°: 4 reveló una fase de lectura abierta que codificaba 662 aminoácidos (SEC ID

10 N°: 5) que comprendía un péptido de señal secretor predicho de 32 restos de aminoácidos (del resto 1 (Met) al resto 32 (Ala) de la SEC ID N°: 5), y un polipéptido maduro de 630 aminoácidos (del resto 33 (Ala) al resto 662 (Ile) de la SEC ID N°: 5). Además del motivo WSXWS (SEC ID N°: 3) (correspondiente a los restos 211 a 215 de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109; y restos 224 a 228 de la SEC ID N°: 5), el receptor comprende un dominio extracelular (restos 20 (Ala) a 519 (Glu) de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109; restos 33 (Ala) a 532 (Glu) de la SEC ID N°: 5) que incluye un dominio de unión a citocina de aproximadamente 200 restos de aminoácidos (del resto 20 (Ala) al 227 (Pro) de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109; restos 33 (Ala) a 240 (Pro) de la SEC ID N°: 5); un engarce de dominio (restos 122 (Thr) a 125 (Pro) de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109; restos 135 (Thr) a 138 (Pro) de la SEC ID N°: 111); una región de penúltima cadena (restos 194 (Phe) a 202 (Arg) de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109; restos 207 (Phe) a 215 (Arg) de la SEC ID N°: 5); un dominio de fibronectina tipo III (restos 228 (Cys) a 519 (Glu) de la SEC

20 ID N°: 111 y SEC ID N°: 109; restos 241 (Cys) a 532 (Glu) de la SEC ID N°: 5); un dominio transmembrana (restos 520 (Ile) a 543 (Leu) de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109; restos 533 (Ile) a 556 (Leu) de la SEC ID N°: 5); un dominio de señalización intracelular completo (restos 544 (Lys) a 732 (Val) de la SEC ID N°: 111; restos 544 (Lys) a 649 (Ile) de la SEC ID N°: 109; y restos 557 (Lys) a 662 (Ile) de la SEC ID N°: 5) que contiene un sitio de señalización "Box I" (restos 554 (Trp) a 560 (Pro) de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109; restos 567 (Trp) a 573 (Pro) de la SEC ID N°: 5) y un sitio de señalización "Box II" (restos 617 (Gln) a 620 (Phe) de la SEC ID N°: 111 y SEC

25 ID N°: 109; restos 630 (Gln) a 633 (Phe) de la SEC ID N°: 5). Los expertos en la materia reconocerán que estas delimitaciones de dominio son aproximadas y se basan en alineamientos con proteínas conocidas y predicciones de plegamientos de proteína. Además de estos dominios, los rasgos de receptores conservados en el receptor codificado incluyen (como se muestra en la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109) un resto de Cys conservado en la posición 30 (posición 43 como se muestra en la SEC ID N°: 5), el motivo CXW (en el que X es cualquier aminoácido) en las posiciones 40-42 (posiciones 53-55 como se muestra en la SEC ID N°: 5), el resto de Trp en la posición 170 (posición 183 como se muestra en la SEC ID N°: 5) y un resto de Arg conservado en la posición 202 (posición 215 como se muestra en la SEC ID N°: 5). Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, dominios, motivos, restos y secuencias del polipéptido zcytor17, descritos anteriormente, son como se muestra en la SEC ID

30 N°: 110, SEC ID N°: 108 y SEC ID N°: 4.

Además, formas truncadas del polipéptido zcytor17 aparecen expresadas de manera natural. Ambas formas codifican receptores solubles zcytor17. Un polinucleótido que codifica una "forma larga" del receptor zcytor17 soluble, truncado dentro del dominio de fibronectina tipo III, se muestra en la SEC ID N°: 112 y el polipéptido correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 113. Esta forma truncada codifica los restos 1 (Met) a 324 (Lys) de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109) y por tanto comprende una secuencia de señal intacta, el motivo WSXWS (SEC

40 ID N°: 3), engarce, dominio de unión a citocina, penúltima cadena y restos de Cys, motivo CXW, Trp y Arg conservados, como se ha descrito anteriormente. Un polinucleótido que codifica una "forma corta" del receptor zcytor17 soluble, truncado en el extremo del dominio de unión a citocina se muestra en la SEC ID N°: 114 y el correspondiente polipéptido se muestra en la SEC ID N°: 115. Esta forma truncada codifica un polipéptido de 239 restos que es idéntico a los restos 1 (Met) a 225 (Glu) de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109 y después diverge y por tanto comprende una secuencia de señal intacta, el motivo WSXWS (SEC ID N°: 3), engarce, dominio de unión a citocina, penúltima cadena y restos de Cys, motivo CXW, Trp y Arg conservados, como se ha descrito anteriormente. En la Figura 1 se muestra una alineación múltiple de las formas truncadas comparada con las formas

45 de longitud completa de zcytor17.

Adicionalmente, el ADNc de zcytor17 de la SEC ID N°: 110, SEC ID N°: 108, SEC ID N°: 112 y SEC ID N°: 114 codifica polipéptidos que pueden usar una metionina iniciadora alternativa (en el nucleótido 75 de la SEC ID N°: 110, en el nucleótido 66 de la SEC ID N°: 108, en el nucleótido 66 de la SEC ID N°: 112 y en el nucleótido 66 de la SEC

55 ID N°: 114) que podría codificar un polipéptido en la misma fase de lectura abierta (ORF, de las siglas en inglés Open Reading Frame) como los polipéptidos zcytor17 de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 113 y SEC ID N°: 115. El uso de la metionina iniciadora alternativa añadiría 32 aminoácidos (mostrado en la SEC ID N°: 48) en fase con el extremo N de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 113 y SEC ID N°: 111. Además, el nucleótido 536 de la SEC ID N°: 4 puede servir como una metionina iniciadora alternativa, generando así el mismo extremo N (inicio en el aminoácido 14 (Met) de la SEC ID N°: 5) y una secuencia de polipéptido de señal, como la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 113 y SEC ID N°: 115. Adicionalmente, la segunda Met en el aminoácido número 2 en las secuencias de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 113 y SEC ID N°: 115 (de manera similar al número de aminoácido 15 (Met) de la SEC ID N°: 5) también puede servir como una metionina de partida alternativa para los polipéptidos.

65 En la SEC ID N°: 6 se describen las secuencias de nucleótidos de ADN representativas que codifican a OSMRbeta

(del nucleótido 368 al 3304), describiéndose su secuencia deducida de 979 aminoácidos en la SEC ID N°: 7. En su totalidad, el polipéptido OSMRbeta (SEC ID N°: 7) representa un segmento polipeptídico de longitud completa (del resto 1 (Met) al resto 979 (Cys) de la SEC ID N°: 7. Adicionalmente, más adelante, se describen los dominios y los rasgos estructurales de los polipéptidos OSMRbeta.

5 El análisis del polipéptido OSMRbeta codificado por la secuencia de ADN de la SEC ID N°: 6 revela una fase de lectura abierta que codifica 979 aminoácidos (SEC ID N°: 7) que comprende un péptido de señal secretor predicho de 27 restos de aminoácidos (del resto 1 (Met) al resto 27 (Ala) de la SEC ID N°: 7), y un polipéptido maduro de 952 aminoácidos (del resto 28 (Glu) al resto 979 (Cys) de la SEC ID N°: 7. Además de los dos motivos WSXWS (SEC ID N°: 3) (correspondientes a los restos 129 a 133 y restos 415 a 419 de la SEC ID N°: 7), el receptor comprende un dominio extracelular (restos 28 (Glu) a 739 (Ser) de la SEC ID N°: 7); que incluye un dominio de unión a citocina de aproximadamente 400 restos de aminoácidos (restos 28 (Glu) a 429 (Ala) de la SEC ID N°: 7, que incluye dos dominios engarzadores (restos 31 (Pro) a 34 (Pro) y restos 343 (Asn) a 347 (Thr)), tres regiones de unión a citocina (restos 35 (Val) a 137 (Glu), restos 240 (Pro) a 342 (Glu), y restos 348 (Asn) a 429 (Ala), un dominio de inmunoglobulina (restos 138 (Val) a 239 (Glu), dos regiones de penúltima cadena (restos 106 (His) a 115 (Lys) y restos 398 (Thr) a 405 (Arg) de la SEC ID N°: 7) y un dominio de fibronectina de tipo III (restos 430 (Pro) a 739 (Ser) de la SEC ID N°: 7); un dominio transmembrana (restos 740 (Met) a 761 (Leu) de la SEC ID N°: 7); un dominio de señalización intracelular completo (restos 762 (Lys) a 979 (Cys) de la SEC ID N°: 7) que contiene un sitio de señalización "Box I" (restos 771 (Tyr) a 777 (Pro) de la SEC ID N°: 7) y un sitio de señalización "Box II" (restos 829 (Glu) a 832 (Leu) de la SEC ID N°: 7). Los expertos en la materia reconocerán que estas delimitaciones de dominio son aproximadas, y se basan en alineaciones con proteínas conocidas y predicciones de plegamiento de proteínas. Además de estos dominios, los rasgos del receptor conservados en el receptor codificado incluyen (como se muestra en la SEC ID N°: 7) restos de Trp conservados en las posiciones 52 y 353, un resto de Cys conservado en la posición 288, un motivo CXW (en el que X es cualquier aminoácido) en las posiciones 294-296, y un resto de Arg conservado en la posición 405. Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, dominios, motivos, restos y secuencias del polipéptido OSMRbeta, descritos anteriormente, son como se muestra en la SEC ID N°: 6.

La presencia de regiones transmembrana, y de motivos conservados y de baja variación generalmente se correlacionan con o definen importantes regiones estructurales en proteínas. Regiones de baja variación (por ejemplo agregados hidrófobos) están generalmente presentes en regiones de importancia estructural (Sheppard, P. y col., anteriormente). Tales regiones de baja variación a menudo contienen aminoácidos raros o poco frecuentes, tales como triptófano. Las regiones flanqueantes y las que están entre tales motivos conservados y de baja variación pueden ser más viables, pero a menudo son funcionalmente significativas ya que pueden estar relacionadas con, o definir, importantes estructuras y actividades tales como dominios de unión, actividad biológica y enzimática, transducción de señal, interacción célula-célula, dominios de localización tisular y similar.

Las regiones de restos de aminoácidos conservados en zcytor17, descritas anteriormente, pueden usarse como herramientas para identificar nuevos miembros de la familia. Por ejemplo, para amplificar secuencias que codifican las regiones conservadas de un ARN obtenido de diversas fuentes tisulares o líneas celulares puede usarse una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). En particular, a partir de las secuencias zcytor17, se diseñan cebadores muy degenerados que son útiles para este fin. El diseño y uso de tales cebadores degenerados puede realizarlo fácilmente un experto en la materia.

La presente invención también contempla un receptor zcytor17 multimérico, como se define en las reivindicaciones, que es capaz de señalización intracelular. Tales receptores pueden incluir al menos una parte de al menos un dominio extracelular de un receptor zcytor17 y un dominio intracelular de un receptor zcytor17 u otro receptor de citocina de clase I. Además del dominio extracelular de zcytor17, el receptor de citocina multimérico también puede incluir el dominio extracelular de al menos una parte del receptor de citocina de clase I, por ejemplo, los dominios de unión a ligando del receptor OSMRbeta y/o el receptor WSX-1. Como alternativa, el receptor de citocina multimérico puede incluir el dominio extracelular de otro receptor, tal como otro receptor de citocina de clase I y el dominio intracelular del zcytor17 para efectuar señalización intracelular.

La presente memoria descriptiva describe un receptor de citocina multimérico que es soluble. Por ejemplo, un receptor de citocina multimérico puede ser, por ejemplo, un heterodímero que incluye, por ejemplo, una parte del dominio extracelular de zcytor17 y una parte del dominio extracelular de un receptor de citocina de clase I, tal como OSMRbeta (SEC ID N°: 7) y/o WSX-1 (SEC ID N°: 9). Adicionalmente, un receptor de citocina multimérico soluble también puede incluir un marcador de afinidad, tal como un polipéptido F<sub>c</sub> de inmunoglobulina. El receptor de citocina multimérico soluble puede expresarse como una fusión con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, tal como un fragmento F<sub>c</sub>, que contiene dos dominios de región constante y carece de la región variable. Tales fusiones se secretan normalmente como moléculas multiméricas en las que las partes F<sub>c</sub> están unidas entre sí por enlaces disulfuro y dos polipéptidos, que no son Ig, se disponen en estrecha proximidad uno con respecto al otro. Las fusiones de este tipo pueden usarse, por ejemplo, para la dimerización, aumentando la estabilidad y la semivida *in vivo*, para el ligando de pureza de afinidad como herramienta de ensayo *in vitro* o antagonista.

65

A través de procesos de clonación y ensayos de proliferación descritos con detalle en el presente documento, se ha demostrado que un receptor de citocina multimérico de la presente invención se une a un nuevo polipéptido ligando (zcytor17lig) (SEC ID N°: 2), desvelado en la Solicitud de Patente de Estados Unidos del mismo solicitante N° de Serie 60/350.325 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos del mismo solicitante N° de Serie 60/375.323, con alta especificidad. Zcytor17lig se aisló de una genoteca de ADNc generada a partir de células de sangre periférica humana activadas (hPBC), que se seleccionaron para CD3. CD3 es un marcador de la superficie celular único para las células de origen linfóide, particularmente linfocitos T.

Se aisló un clon positivo de zcytor17lig y el análisis de secuencia reveló que la secuencia de polinucleótidos contenida dentro del ADN plasmídico era nueva. La secuencia de señal secretora está comprendida por los restos de aminoácido 1 (Met) a 23 (Ala) y el polipéptido maduro está comprendido por los restos de aminoácido 24 (Ser) a 164 (Thr) (como se muestra en la SEC ID N°: 2). Otros análisis de secuenciación N-terminal de zcytor17lig purificado de células 293T mostró un término N en el resto 27 (Leu) como se muestra en la SEC ID N°: 2, comprendiendo el polipéptido maduro los restos de aminoácidos 27 (Leu) a 164 (Thr) (como se muestra en la SEC ID N°: 2).

En general, se pronostica que las citocinas tienen una estructura de cuatro hélices alfa, siendo las hélices A, C y D las más importantes en las interacciones ligando-receptor y están más altamente conservadas entre los miembros de la familia. Haciendo referencia a la secuencia de aminoácidos de zcytor17lig humana mostrada en la SEC ID N°: 2, la alineación de las secuencias de aminoácidos de zcytor17lig humana, IL-3 humana y citocina humana, se pronostica que la hélice A de zcytor17lig está definida por los restos de aminoácidos 38-52; la hélice B por los restos de aminoácidos 83-98; la hélice C por los restos de aminoácidos 104-117; y la hélice D por los restos de aminoácidos 137-152; como se muestra en la SEC ID N°: 2. El análisis estructural sugiere que el bucle A/B es largo, el bucle B/C es corto y el bucle C/D es largo. Esta estructura de bucles da como resultado una organización helicoidal ascendente-ascendente- descendente-descendente. Basado en la estructura de cuatro hélices, los restos de cisteína que se conservan dentro de zcytor17lig, corresponden a los restos de aminoácidos 72, 133 y 147 de la SEC ID N°: 2; y 74, 137, y 151 de la SEC ID N°: 11 descritos en el presente documento. Coherente con la ubicación de la cisteína se confirma también la estructura de cuatro hélices. Además, el resto de Glu está altamente conservado en zcytor17lig, como se muestra en la SEC ID N°: 2, en el resto 43.

Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos pronosticada de zcytor17lig murino muestra 31 % de identidad con la proteína humana pronosticada en toda la longitud de las secuencias (SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 11). Basándose en la comparación entre secuencias de zcytor17lig humano y murino, se encontraron restos conservados en las regiones pronosticadas por codificar las hélices alfa C y D. Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, dominios, motivos, restos y secuencias de polipéptidos de zcytor17lig humanos, descritos en el presente documento, se muestran en la SEC ID N°: 1.

Aunque la hélice D está relativamente conservada entre zcytor17lig humano y murino, la hélice C es la más conservada. Aunque ambas especies poseen aminoácidos ácidos predominantes en esta región, las diferencias pueden dar cuenta de la especificidad de las especies en la interacción entre zcytor17lig y su receptor, comprendiendo zcytor17 receptores monoméricos, heterodiméricos (por ejemplo, zcytor17/OSNMBeta, WSX-1/OSMRbeta, zcytor17/WSX-1) o multiméricos (por ejemplo, zcytor17/OSNMBeta/WSX-1). El bucle A/B y la hélice B de zcytor17lig se conservan marginalmente, y la hélice C a través del bucle C/D en la hélice D es la más conservada entre las especies; la conservación a través de esta región sugiere que es funcionalmente significativa. Las hélices D de zcytor17lig humano y murino también están conservadas. Pueden diseñarse antagonistas de los receptores zcytor17 a través de mutaciones dentro de la hélice D de zcytor17lig. Estas pueden incluir el truncamiento de la proteína del resto Thr156 (SEC ID N°: 2), o la conservación de restos que confieren unión del ligando al receptor, pero que disminuyen la actividad de señalización.

Las citocinas en más de cuatro hélices también se agrupan por longitud de las hélices que la componen. Las citocinas de "hélice larga" generalmente consisten en hélices de aproximadamente 24-30 restos e incluyen IL-6, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibidor de leucemia (LIF) y hormona de crecimiento humana (hGH). Las citocinas de "hélice corta" generalmente consisten en hélices de 18-21 restos e incluyen IL-2, IL-4 y GM-CSF. Se cree que zcytor17lig es un nuevo miembro del grupo de citocinas de hélice corta. Estudios que usan CNTF e IL-6 demostraron que una hélice CNTF puede intercambiarse por la hélice equivalente en IL-6, otorgando a la quimera propiedades de unión a CTNF. Por tanto, parece ser que los dominios funcionales de las citocinas de cuatro hélices se determinan basándose en la homología estructural, independientemente de la identidad de secuencia y pueden mantener la integridad funcional en una quimera (Kallen y col., J. Biol. Chem. 274: 11859-11867, 1999). Por lo tanto, los dominios helicoidales de zcytor17lig pueden ser útiles para preparar moléculas de fusión quimérica, particularmente con otras citocinas de hélice corta para determinar y modular la especificidad de unión al receptor. La presente invención también contempla proteínas de fusión obtenidas por ingeniería genética con hélice A y/o hélice D y las proteínas de fusión que combinan dominios helicoidales y de bucle de otras citocinas de forma corta, tales como IL-2, IL-4, IL-15, LIF, IL-12, IL-3 y GM-CSF.

La secuencia de polinucleótidos para IL-2 humana se muestra en la SEC ID N°: 176 y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N°: 177. La secuencia de señal secretora está comprendida por los restos de aminoácido 1 (Met) a 20 (Ser) de la SEC ID N°: 177; nucleótidos 48 a 107 de la SEC ID N°: 176. El polipéptido

5 maduro está comprendido por los restos de aminoácido 21 (Ala) a 156 (Thr) de la SEC ID N°: 177; nucleótidos 108 a 515 de la SEC ID N°: 176. La hélice A de IL-2 humana está comprendida por los restos de aminoácido 27 (Thr) a 48 (Leu) de la SEC ID N°: 177; nucleótidos 126 a 191 de la SEC ID N°: 176. La hélice B de IL-2 humana está comprendida por la Hélice B1 y la Hélice B2. La hélice B1 de IL-2 humana está comprendida por los restos de aminoácido 73 (Ala) a 80 (Gln) de la SEC ID N°: 177; nucleótidos 264 a 287 de la SEC ID N°: 176. La hélice B2 de IL-2 humana está comprendida por los restos de aminoácido 83 (Glu) a 92 (Val) de la SEC ID N°: 117; nucleótidos 294 a 323 de la SEC ID N°: 176. Por lo tanto, la hélice B (que comprende las Hélices B1 y B2) de IL-2 está representada por la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 183 (secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 182) en la que los restos de aminoácidos 9 y 10 pueden ser cualquier aminoácido. La SEC ID N°: 183 es idéntica a los aminoácidos 73 (Ala) a 92 (Val) de la SEC ID N°: 177 en la que los aminoácidos 81 y 82 son cualquier aminoácido. En una forma preferida, la Hélice B de IL-2 comprende los aminoácidos 73 (Ala) a 92 (Val) de la SEC ID N°: 177; nucleótidos 264 a 323 de la SEC ID N°: 176. La Hélice C de IL-2 humana está comprendida por los restos de aminoácido 102 (His) a 116 (Val) de la SEC ID N°: 177, nucleótidos 351 a 395 de la SEC ID N°: 176. La hélice D de IL-2 humana está comprendida por los restos de aminoácido 134 (Thr) a 149 (Gln) de la SEC ID N°: 177; nucleótidos 447 a 494 de la SEC ID N°: 176.

20 La secuencia de polinucleótidos para IL-4 humana se muestra en la SEC ID N°: 178 y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N°: 179. La secuencia de señal secretora está comprendida por los restos de aminoácido 1 (Met) a 24 (Gly) de la SEC ID N°: 179; nucleótidos 64 a 135 de la SEC ID N°: 178. El polipéptido maduro está comprendido por los restos de aminoácido 25 (His) a 153 (Ser) de la SEC ID N°: 179; nucleótidos 136 a 522 de la SEC ID N°: 178. La hélice A de IL-4 humana está comprendida por los restos de aminoácido 30 (Thr) a 42 (Thr) de la SEC ID N°: 179; nucleótidos 151 a 189 de la SEC ID N°: 178. La hélice B de la IL-4 humana está comprendida por los restos de aminoácido 65 (Glu) a 83 (His) de la SEC ID N°: 179; nucleótidos 256 a 312 de la SEC ID N°: 178. La hélice C de la IL-4 humana está comprendida por los restos de aminoácido 94 (Ala) a 118 (Ala) de la SEC ID N°: 119; nucleótidos 343 a 417 de la SEC ID N°: 178. La hélice D de la IL-4 humana está comprendida por los restos de aminoácido 133 (Leu) a 151 (Cys) de la SEC ID N°: 179; nucleótidos 460 a 516 de la SEC ID N°: 178.

30 La secuencia de polinucleótidos para GM-CSF humano se muestra en la SEC ID N°: 180 y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N°: 181. La secuencia de señal secretora está comprendida por los restos de aminoácido 1 (Met) a 17 (Ser) de la SEC ID N°: 181; nucleótidos 9 a 59 de la SEC ID N°: 180. El polipéptido maduro está comprendido por los restos de aminoácido 18 (Ala) a 144 (Glu) de la SEC ID N°: 181; nucleótidos 60 a 440 de la SEC ID N°: 180. La hélice A de GM-CSF humano está comprendida por los restos de aminoácido 30 (Trp) a 44 (Asn) de la SEC ID N°: 181; nucleótidos 96 a 140 de la SEC ID N°: 180. La hélice B de GM-CSF humano está comprendida por los restos de aminoácido 72 (Leu) a 81 (Gln) de la SEC ID N°: 181; nucleótidos 222 a 251 de la SEC ID N°: 180. La hélice C de GM-CSF humano está comprendida por los restos de aminoácido 85 (Gly) a 103 (Gln) de la SEC ID N°: 181; nucleótidos 261 a 317 de la SEC ID N°: 180. La hélice D de GM-CSF humano está comprendida por los restos de aminoácido 120 (Phe) a 131 (Leu) de la SEC ID N°: 181; nucleótidos 366 a 401 de la SEC ID N°: 18.

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

Tabla 1

	Hélice A	Hélice B	Hélice C	Hélice D	
zcytor17lig	38-52	83-98	104-117	137-152	de la SEC ID N°: 2
IL-3	35-45	73-86	91-103	123-141	de la SEC ID N°: 102
IL-2	27-48	73-92	102-116	134-149	de la SEC ID N°: 177 o Hélice B como se describe en la SEC ID N°: 183
IL-4	30-42	65-83	94-118	133-151	de la SEC ID N°: 179
GM-CSF	30-44	72-81	85-103	120-131	de la SEC ID N°: 181

45 La presente invención proporciona moléculas de polinucleótidos (como se definen en las reivindicaciones), que incluyen moléculas de ADN y ARN que codifican los polipéptidos zcytor17 desvelados en el presente documento que pueden incluirse en el receptor de citocina multimérico. Los expertos en la materia reconocerán que, en vista de la degeneración del código genético, es posible una variación de secuencia considerable entre estas moléculas de polinucleótidos. La SEC ID N°: 120, SEC ID N°: 121 y SEC ID N°: 122 son secuencias de ADN degeneradas que abarcan todos los ADN que codifican el polipéptido zcytor17 de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109 y SEC ID N°: 5, respectivamente y sus fragmentos. Los expertos en la materia reconocerán que las secuencias degeneradas de la SEC ID N°: 120, SEC ID N°: 121 y SEC ID N°: 122 también proporcionan todas las secuencias de ARN que codifican la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109 y SEC ID N°: 5 sustituyendo T por U. Por tanto, el presente documento describe los polinucleótidos que codifican el polipéptido zcytor17 que comprenden del nucleótido 1 al nucleótido 2196 de la SEC ID N°: 120, del nucleótido 1 al nucleótido 1947 de la SEC ID N°: 121 y del nucleótido 1 al nucleótido 1986 de la SEC ID N°: 122 y sus equivalentes de ARN. La Tabla 2 expone los códigos de una letra usados dentro de la SEC ID N°: 120, SEC ID N°: 121 y SEC ID N°: 122 para indicar posiciones de nucleótidos degenerados. "Resoluciones" son

los nucleótidos indicados por un código de letra. "Complemento" indica el código para el nucleótido (o nucleótidos) complementario. Por ejemplo, el código Y indica C o T y su complemento R indica A o G, siendo A complementaria a T y G complementaria a C.

5

**TABLA 2**

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

Los codones degenerados usados en la SEC ID N°: 120, SEC ID N°: 121 y SEC ID N°: 122, que abarcan todos los codones posibles para un aminoácido determinado se exponen en la Tabla 3.

10

**TABLA 3**

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

15

20

Un experto habitual en la materia apreciará que se introduce cierta ambigüedad para determinar un codón degenerado representativo de todos los posibles codones que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar arginina (AGR) y el codón degenerado para arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre codones que codifican fenilalanina y leucina. Por tanto, algunos polinucleótidos abarcados por la secuencia degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, pero un experto habitual en la materia puede identificar fácilmente tales secuencias variantes por referencia a las secuencias de aminoácidos de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109 y SEC ID N°: 5; o SEC ID N°: 117 y SEC ID N°: 119. Se puede someter a ensayo fácilmente la funcionalidad de las secuencias variantes, como se describe en el presente documento.

25

Un experto habitual en la materia también apreciará que diferentes especies pueden presentar "uso de codón preferencial". En general, véase, Grantham, y col., Nuc. Acids Res. 8: 1893-912, 1980; Haas, y col. Curr. Biol. 6: 315-24, 1996; Wain-Hobson y col., Gene 13: 355-64, 1981; Grosjean y Fiers, Gene 18: 199-209, 1982; Holm, Nuc. Acids Revs. 14: 3075-87, 1986; Ikemura, J. Mol. Biol. 158: 573-97, 1982. Como se usa en el presente documento, la



expresión “uso de codón preferencial” o “codones preferenciales” es una expresión en la técnica que se refiere a codones de traducción de proteínas que se usan más frecuentemente en células de una especie determinada, favoreciendo así uno o algunos representantes de los posibles codones que codifican cada aminoácido (Véase Tabla 3). Por ejemplo, el aminoácido Treonina (Thr) puede codificarse por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en células de mamíferos, ACC es el codón más comúnmente usado; en otras especies, por ejemplo, en células de insecto, de levadura, virus o bacterias, puede ser preferenciales diferentes codones Thr. Los codones preferenciales para una especie particular pueden introducirse en los polinucleótidos de la presente invención mediante diversos procedimientos conocidos en la materia. La introducción de secuencias de codones preferenciales a ADN recombinante puede, por ejemplo, potenciar la producción de la proteína, haciendo que la traducción de la proteína sea más eficaz dentro de un tipo o especie de célula particular. Por lo tanto, las secuencias de codones degenerados desveladas en la SEC ID N°: 120, SEC ID N°: 121 y SEC ID N°: 122 sirven como molde para optimizar la expresión de polinucleótidos zcytor17 en diversos tipos y especies de células comúnmente usados en la técnica y descritos en el presente documento. Las secuencias que contienen codones preferenciales pueden someterse a ensayo y optimizarse para expresión en diversas especies y someterse a ensayo la funcionalidad como se desvela en el presente documento.

Como se observó previamente, los polinucleótidos aislados de la presente invención incluyen ADN y ARN. Los procedimientos para preparar ADN y ARN se conocen bien en la materia. En general, el ARN se aísla de un tejido o una célula que produce grandes cantidades de ARN de zcytor17. Tales tejidos y células se identifican por transferencia de Northern (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201, 1980), e incluyen PBL (linfocitos de sangre periférica), tejidos de bazo, timo, médula ósea, próstata y linfáticos, líneas celulares de eritroleucemia humana, líneas celulares de leucemia monocítica aguda, otras líneas celulares linfoides y hematopoyéticas y similares. Puede prepararse ARN total usando extracción de isotiocianato de guanidino, seguida de aislamiento por centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin y col., Biochemistry 18: 52-94, 1979). El ARN poli (A)<sup>+</sup> se prepara a partir de ARN total usando el procedimiento de Aviv y Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408-12, 1972). El ADN complementario (ADNc) se prepara a partir de ARN poli(A)<sup>+</sup> usando procedimientos conocidos. Como alternativa, puede aislarse ADN genómico. Después, los polinucleótidos que codifican polipéptidos zcytor17 se identifican y se aíslan, por ejemplo, por hibridación o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis, Patente de Estados Unidos N° 4.683.202).

Puede obtenerse un clon de longitud completa que codifica zcytor17 por procedimientos de clonación convencionales. Se prefieren los clones de ADN complementario (ADNc), aunque para algunas aplicaciones (por ejemplo, expresión de animales transgénicos), puede ser preferible usar un clon genómico, o modificar un clon de ADNc para incluir al menos un intrón genómico. Los procedimientos para preparar ADNc y clones genómicos se conocen bien y están dentro del nivel de experiencia habitual en la materia e incluyen el uso de la secuencia descrita en el presente documento o partes de ésta, para sondear o cebar una biblioteca. Las bibliotecas de expresión pueden sondearse con anticuerpos contra fragmentos del receptor, zcytor17, u otros compañeros de unión específicos.

Los polinucleótidos de la presente invención también pueden sintetizarse usando sintetizadores de ADN. Actualmente el procedimiento de elección es el procedimiento con fosoramidita. Si para una aplicación se requiere ADN bicatenario sintetizado químicamente, tal como la síntesis de un gen o un fragmento génico, entonces cada cadena complementaria se fabrica por separado. La producción de polinucleótidos cortos (de 60 a 80 pb) es técnicamente sencilla y puede conseguirse sintetizando las cadenas complementarias y después hibridándolas entre sí. Sin embargo, para producir polinucleótidos más grandes (>300 pb), normalmente se emplean estrategias especiales, porque la eficacia de acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis química del ADN raramente es del 100 %. Para superar este problema, se ensamblan genes sintéticos (bicatenarios) en forma modular a partir de fragmentos monocatenarios que tienen una longitud de 20 a 100 nucleótidos.

Un modo alternativo para preparar un gen de longitud completa es sintetizar un conjunto específico de oligonucleótidos solapantes (de 40 a 100 nucleótidos). Después de hibridar las regiones complementarias solapantes cortas 3' y 5' (de 6 a 10 nucleótidos), permanecen aún grandes huecos, pero las regiones cortas que forman pares de bases son lo suficientemente largas y estables para mantener junta la estructura. Los huecos se rellenan y el dúplex de ADN se completa mediante síntesis de ADN enzimática por la ADN polimerasa I de *E. coli*. Después de completar la síntesis enzimática, los cortes enzimáticos se sellan con ADN ligasa de T4. Las construcciones bicatenarias se unen secuencialmente a otra para formar toda la secuencia génica que se verifica por análisis de secuencia de ADN. Véase Glick y Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA, (ASM Press, Washington, D. C. 1994); Itakura y col., Annu. Rev. Biochem. 53: 323-56, 1984 y Climie y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 633-7, 1990. Además, generalmente se añaden otras secuencias que contienen señales para el inicio y la terminación correctos de la transcripción y traducción.

La presente memoria descriptiva describe reactivos que encontrarán uso en aplicaciones de diagnóstico. Por ejemplo, puede usarse el gen zcytor17lig, una sonda que comprende ADN o ARN de zcytor17lig o una de sus subsecuencias, para determinar si el gen zcytor17lig está presente en un cromosoma humano, tal como el cromosoma 12, o si se ha producido una mutación génica. Zcytor17lig se localiza en la región 12q24.31 del cromosoma 12 (Ejemplo 13). Las aberraciones cromosómicas detectables en el locus del gen zcytor17lig incluyen,

pero sin limitación, aneuploidía, cambios en el número de copias del gen, pérdida de heterocigosidad (LOH), translocaciones, inserciones, deleciones, cambios y reordenaciones en el sitio de restricción. Tales aberraciones pueden detectarse usando los polinucleótidos de la presente invención empleando técnicas de genética molecular, tal como análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), análisis de repeticiones cortas en tándem (STR), empleando técnicas PCR y otras técnicas de análisis de engarzadores genéticos conocidas en la materia (Sambrook y col., citado anteriormente; Ausubel y. col., citado anteriormente; Marian, Chest 108: 255-65, 1995).

El conocimiento exacto de la posición de un gen puede ser útil para diversos fines, que incluyen: 1) determinar si una secuencia es parte de un cóntigo existente y obtener secuencias genéticas circundantes adicionales en diversas formas, tal como clones de YAC, BAC o ADNc; 2) proporcionar un posible gen candidato para una enfermedad hereditaria que muestre un enlazador a la misma región cromosómica y 3) hacer referencia cruzada a organismos modelo, tal como ratón, lo cual puede ayudar a determinar la función podría tener un gen particular.

Un experto en la materia reconocerá que la región 12q24 está frecuentemente implicada en enormes reordenaciones genómicas, incluyendo translocaciones, deleciones, inversiones y duplicaciones que se asocian a diversos cánceres. La Base de datos Mitelman sobre Aberraciones Cromosómicas en Cáncer, en el Proyecto de Anatomía Genómica del Cáncer, Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, Md, publicada en Internet, enumera 199 casos de cánceres con reordenaciones genómicas que implican la región 12q24. De estos, la mayoría son parte de cariotipos complejos con otras reordenaciones; sin embargo, en algunos casos la reordenación que implica la región 12q24 es la única alteración genómica. Dada la expresión del receptor de zcytor17lig en células de linajes linfoides, y mieloides, es particularmente significativo destacar que existen al menos 4 casos de leucemia mieloide publicados en la bibliografía en los que, o bien la translocación (2 casos: Yamagata y col, Cancer Genet Cytogenet 97: 90-93, 1997; Dunphy y Batanian, Cancer Genet Cytogenet 114: 51-57, 1999) o la duplicación (2 casos: Bonomi y col, Cancer Genet Cytogenet 108: 75-78, 1999) son la única alteración genómica. Esto sugiere que un gen o genes que residen dentro de 12q24 podrían estar directamente implicados en la transformación maligna de las células de estos pacientes. La sobreexpresión inapropiada de zcytor17lig podría contribuir a la transformación maligna promoviendo la proliferación aberrante de células que llevan el receptor, a través de mecanismos autocrinos o paracrinos. La inhibición de la actividad de zcytor17lig podría así inhibir el crecimiento de dichas células. Como alternativa, una reorganización genómica que provoca la inactivación del gen zcytor17lig puede promover la transformación maligna y/o la metástasis eliminando las funciones inmunoreguladas de zcytor17lig. De hecho, se ha elaborado un mapa de un gen que suprime la metástasis en cáncer de próstata a 12q24-qter (Ichikawa y col, Asian J Androl 2: 167-171, 2000). Si zcytor17lig es el gen dentro de esta región responsable de la supresión de metástasis, entonces zcytor17lig en sí mismo puede tener valor terapéutico en el tratamiento del cáncer.

Un diagnóstico podría ayudar a los médicos a determinar el tipo de enfermedad y la terapia adecuada asociada, o la asistencia en el asesoramiento genético. Como tales, los anticuerpos anti-zcytor17lig, polinucleótidos y polipéptidos de la invención pueden usarse para la detección del polipéptido zcytor17lig, ARNm o anticuerpos anti-zcytor17lig, sirviendo así como marcadores y usarse directamente para detectar enfermedades genéticas o cánceres, como se describe en el presente documento, usando procedimientos conocidos en la materia y descritos en el presente documento. Adicionalmente, las sondas del polinucleótido zcytor17lig pueden usarse para detectar anomalías o genotipos asociados con deleciones y translocaciones del cromosoma 12q24.3 asociadas con enfermedades humanas, u otras translocaciones implicadas con la progresión de tumores malignos u otras mutaciones de 12q24.3, que se espera estén implicadas en las reordenaciones cromosómicas de la malignidad; o en otros cánceres. De manera similar, las sondas polinucleotídicas de zcytor17lig pueden usarse para detectar anomalías o genotipos asociados a la trisomía del cromosoma 12, y pérdida cromosómica asociada a enfermedades humanas o aborto espontáneo. Por tanto, las sondas polinucleotídicas de zcytor17lig pueden usarse para detectar anomalías o genotipos asociados con estos defectos.

Un experto habitual en la materia reconocería que las sondas polinucleotídicas de zcytor17lig son particularmente útiles para el diagnóstico de anomalías cromosómicas importantes asociadas a pérdida de heterogeneidad (LOH), aumento de cromosomas (por ejemplo, trisomía), translocación, amplificación de ADN y similares. Se sabe que las translocaciones dentro del locus cromosómico 12q24.3, en el que se localiza el gen zcytor17lig, se asocian a enfermedades humanas. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, las deleciones, translocaciones, duplicaciones y trisomía de 12q24 se asocian al cáncer. Por tanto, dado que el gen zcytor17lig se mapea hacia esta región crítica, las sondas polinucleotídicas de zcytor17lig de la presente invención pueden usarse para detectar anomalías o genotipos asociados a la translocación, deleción y trisomía y similares de 12q24, como se describió anteriormente.

Como se analizó anteriormente, los defectos en el gen zcytor17lig propiamente dicho pueden provocar una patología humana hereditaria. Las moléculas de la presente invención, como los polipéptidos, antagonistas, agonistas, polinucleótidos y anticuerpos de la presente invención, ayudarían en la detección, diagnóstico, prevención y tratamiento asociados al defecto genético de zcytor17lig. Asimismo, las sondas polinucleotídicas de zcytor17lig pueden usarse para detectar diferencias alélicas entre individuos enfermos o no enfermos en el locus del cromosoma zcytor17lig. Como tales, las secuencias de zcytor17lig pueden usarse como diagnósticas en la formación del perfil de ADN forense.

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

Las mutaciones asociadas con el locus de zcytor17lig pueden detectarse usando las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, empleando procedimientos convencionales para análisis de mutación directa, tal como análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, análisis de repeticiones cortas en tándem empleando técnicas PCR, análisis de sistemas de ampliación-mutación refractaria, detección de polimorfismos de conformación monocatenaria, procedimientos de escisión de RNasa, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, análisis de emparejamiento erróneo asistido por fluorescencia y otras técnicas de análisis genéticas conocidas en la materia (véanse, por ejemplo, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), Marian, *Chest* 108:255 (1995), Coleman y Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Humana Press, Inc. 1996), Elles (ed.) *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), *Laboratory Protocols for Mutation Detection* (Oxford University Press 1996), Birren y col. (eds.), *Genome Analysis, Vol. 2: Detecting Genes* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998), Dracopoli y col. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics* (John Wiley y Sons 1998), y Richards y Ward, "Molecular Diagnostic Testing," in *Principles of Molecular Medicine*, páginas 83-88 (Humana Press, Inc. 1998). El análisis directo de un gen zcytor17lig para una mutación puede realizarse usando el ADN genómico de un sujeto. El experto en la materia conoce los procedimientos para ampliar ADN genómico obtenido, por ejemplo, de linfocitos de sangre periférica, (véase, por ejemplo, Dracopoli y col. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, en las páginas 7.1.6 a 7.1.7 (John Wiley y Sons 1998)).

La presente memoria descriptiva describe polipéptidos y polinucleótidos equivalentes de otras especies (ortólogos). Estas especies incluyen, pero sin limitación, mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y otras especies de vertebrados e invertebrados. Son de particular interés los polipéptidos de zcytor17 de otras especies de mamíferos, incluyendo polipéptidos de murinos, porcinos, ovinos, bovinos, caninos, felinos, equinos y otros primates. Los ortólogos de zcytor17 humano pueden clonarse usando la información y las composiciones proporcionadas por la presente invención en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, puede clonarse un ADNc usando ARNm obtenido de un tipo de tejido o célula que exprese zcytor17, como se desvela en el presente documento. Las fuentes de ARNm adecuadas pueden identificarse sondeando transferencias Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias desveladas en el presente documento. Después se prepara una genoteca de ARNm de un tejido o una línea celular positiva. Después, puede aislarse un ADNc que codifique zcytor17 mediante

diversos procedimientos, tales como sondeando con un ADNc humano completo o parcial o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas basadas en las secuencias desveladas. También puede clonarse un ADNc usando PCR (Mullis, anteriormente), usando cebadores diseñados a partir de la secuencia de zcytor17 humana representativa desvelada en el presente documento. Dentro de un procedimiento adicional, puede usarse la genoteca de ADNc para transformar o transfectar células hospedadoras, y la expresión del ADNc de interés puede detectarse con un anticuerpo para el polipéptido zcytor17. Para el aislamiento de clones genómicos también pueden aplicarse técnicas similares.

Se ha identificado una secuencia de polinucleótidos para el ortólogo de ratón de zcytor17 y se muestra en la SEC ID N°: 116 y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N°: 117. El análisis del polipéptido zcytor17 de ratón codificado por la secuencia de ADN de la SEC ID N°: 116 revela una fase de abertura abierta que codifica 662 aminoácidos (SEC ID N°: 117) que comprende un péptido de señal secretor predicho de 45 restos de aminoácido (del resto 1 (Met) al resto 45 (Ala) de la SEC ID N°: 117), y un polipéptido maduro de 617 aminoácidos (del resto 46 (Val) al resto 662 (Cys) de la SEC ID N°: 117). Adicionalmente, puede usarse un resto de Met adicional, Met (28) como una metionina de partida; que comprende un segundo péptido de señal secretor predicho de 18 restos de aminoácido (del resto 28 (Met) al resto 45 (Ala) de la SEC ID N°: 117), y el mismo polipéptido maduro de 617 aminoácidos (del resto 46 (Val) al resto 662 (Cys) de la SEC ID N°: 117. Además del motivo WSXWS (SEC ID N°: 3) correspondiente a los restos 224-228 de la SEC ID N°: 117, el receptor comprende un dominio extracelular desde los restos 46 (Val) a 533 (Glu) de la SEC ID N°: 117) que incluye un dominio de unión a citocina de aproximadamente 200 restos de aminoácido (restos 46 (Val) a 240 (Pro) de la SEC ID N°: 117) y un dominio de fibronectina III (restos 241 (His) a 533 (Glu) de la SEC ID N°: 117); un motivo CXW (restos 66 (Cys) a 68 (Trp) de la SEC ID N°: 117); un engarce de dominio (restos 142 (Thr) a 145 (Pro) de la SEC ID N°: 117); una región de penúltima cadena (restos 207 (Phe) a 215 (Arg) de la SEC ID N°: 117); un dominio transmembrana (restos 534 (Ile) a 550 (Ile) de la SEC ID N°: 117); dominio de señalización intracelular completo (restos 551 (Lys) a 662 (Cys) de la SEC ID N°: 117) que contiene un sitio de señalización "Box I" (restos 568 (Cys) a 574 (Pro) de la SEC ID N°: 117), y un sitio de señalización "Box IT" (restos 628 (Glu) a 631 (Ile) de la SEC ID N°: 117). Los restos conservados comunes a los receptores de citocina de clase I son los restos 56 (Cys), 187 (Trp) y 215 (Arg). Una comparativa de las secuencias de aminoácidos de ser humano y de ratón revela que tanto los polipéptidos humanos como ortólogos contienen características estructurales correspondientes descritas anteriormente (y, véase, la Figura 2). La secuencia madura para zcytor17 de ratón comienza en Val<sub>46</sub> (como se muestra en la SEC ID N°: 117), que corresponde a Ala<sub>33</sub> (como se muestra en la SEC ID N°: 5) en la secuencia humana. Existe aproximadamente una identidad del 61 % entre las secuencias de ratón y de ser humano sobre toda la longitud de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 117. El porcentaje de identidad anterior se determinó usando un programa FASTA con ktup=1, penalización por apertura de hueco=12, penalización por extensión de hueco=2 y matriz de sustitución=BLOSUM62, con otros parámetros establecidos por defecto. Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, dominios, motivos, restos y secuencias del polipéptido zcytor17 de ratón, descritos anteriormente, son como se muestra en la SEC ID N°: 116.

Asimismo, una forma soluble truncada del polipéptido del receptor zcytor17 de ratón parece expresarse de manera natural. Se ha identificado una secuencia de polinucleótidos de una forma soluble truncada del receptor zcytor17 de ratón y se muestra en la SEC ID N°: 118 y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N°: 119. El análisis del polipéptido de zcytor17 de ratón soluble truncado codificado por la secuencia de ADN de la SEC ID N°: 118 revela una fase de lectura abierta que codifica 547 aminoácidos (SEC ID N°: 119) que comprende un péptido de señal secretor predicho de 45 restos de aminoácido (del resto 1 (Met) al resto 45 (Ala) de la SEC ID N°: 119) y un polipéptido maduro de 502 aminoácidos (del resto 46 (Val) al resto 547 (Val) de la SEC ID N°: 119). Asimismo, un resto de Met adicional, Met (28) puede usarse como una metionina de partida; que comprende un segundo péptido de señal secretor predicho de 18 restos de aminoácido (del resto 28 (Met) al resto 45 (Ala) de la SEC ID N°: 119) y el mismo polipéptido maduro de 502 aminoácidos (del resto 46 (Val) al resto 547 (Val) de la SEC ID N°: 119. Además del motivo WSXWS (SEC ID N°: 3) correspondiente a los restos 224-228 de la SEC ID N°: 119, el receptor comprende un dominio extracelular desde los restos 46 (Val) a 533 (Trp) de la SEC ID N°: 119) que incluye un dominio de unión a citocina de aproximadamente 200 aminoácidos (restos 46 (Val) a 240 (Pro) de la SEC ID N°: 119) y un dominio de fibronectina III (restos 241 (His) a 533 (Trp) de la SEC ID N°: 119); un motivo CXW (restos 66 (Cys) a 68 (Trp) de la SEC ID N°: 119); un engarce de dominio (restos 142 (Thr) a 145 (Pro) de la SEC ID N°: 119); una región de penúltima cadena (restos 207 (Phe) a 215 (Arg) de la SEC ID N°: 119); y una región cola C-terminal (restos 534 (Leu) a 547 (Val). Los restos conservados comunes a los receptores de citocina de clase I, son los restos 56 (Cys), 187 (Trp) y 215 (Arg). Una comparativa de las secuencias de aminoácidos de ser humano y de ratón, incluyendo zcytor17 de ratón soluble truncado, revela que tanto los polipéptidos humanos como los ortólogos contienen características estructurales correspondientes descritas anteriormente (y, véase, Figura 2). Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, dominios, motivos, restos y secuencias del polipéptido zcytor17 de ratón soluble truncado, descritos anteriormente, se muestran en la SEC ID N°: 118.

Los expertos en la materia reconocerán que las secuencias desveladas en la SEC ID N°: 110, SEC ID N°: 108 y SEC ID N°: 4 representan alelos de zcytor17 humano y que se espera que ocurra la variación alélica y el empalme alternativo. Las variantes alélicas de esta secuencia pueden clonarse sondeando ADNc o genotecas genómicas de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos convencionales. Las variantes alélicas de la secuencia de ADN mostrada en la SEC ID N°: 110, SEC ID N°: 108 o SEC ID N°: 4, incluyendo aquellas que contienen mutaciones

silenciosas y aquellas en las que las mutaciones producen cambios en la secuencia de aminoácidos, se describen en el presente documento, al igual que las proteínas que son variantes alélicas de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 5 SEC ID N°: 117 o SEC ID N°: 119. Los ADNc generados a partir de los ARNm de empalme alternativo, que conservan las propiedades del polipéptido zcytor17 se incluyen dentro del ámbito de la presente invención, al igual que los polipéptidos codificados por tales ADNc y ARNm. Las variantes alélicas y variantes de empalme de estas secuencias pueden clonarse sondeando ADNc o genotecas genómicas de diferentes individuos o tejidos de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la materia. Por ejemplo, los receptores zcytor17 solubles, de forma corta y de forma larga, descritos anteriormente, y en la SEC ID N°: 112 y SEC ID N°: 113 o SEC ID N°: 114 y SEC ID N°: 115 pueden considerarse variantes alélicas o de empalme de zcytor17.

La presente memoria descriptiva describe polipéptidos zcytor17 aislados que son sustancialmente similares a los polipéptidos de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109 o SEC ID N°: 5 y sus ortólogos, por ejemplo, SEC ID N°: 117 y SEC ID N°: 119. La expresión "sustancialmente similar" se usa en el presente documento para indicar polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o más del 99 % con las secuencias mostradas en la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109 o SEC ID N°: 5 o sus ortólogos, por ejemplo, SEC ID N°: 117 y SEC ID N°: 119. Tales polipéptidos serán, más preferentemente, al menos el 90 %, y más preferentemente el 95 % o más, idénticos a la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109 y SEC ID N°: 5 o sus ortólogos). El porcentaje de identidad de secuencia se determina por procedimientos convencionales. Véanse, por ejemplo, Altschul y col., Bull. Math. Bio. 48: 603-616, 1986 y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919, 1992. En resumen, para optimizar las puntuaciones de alineación, se alinean dos secuencias de aminoácidos usando una penalización de apertura de hueco de 10, una penalización de extensión de hueco de 1 y la matriz de puntuación "blosum 62" de Henikoff y Henikoff (indicada anteriormente), como se muestra en la Tabla 4 (los aminoácidos se indican con códigos convencionales de una letra). Después el porcentaje de identidad se calcula como:

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

**Tabla 4**

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

La identidad de secuencia de las moléculas de polinucleótidos se determina por procedimientos similares usando una proporción como se desvela anteriormente.

- 5 Los expertos en la materia apreciarán que para alinear dos secuencias de aminoácidos se dispone de muchos algoritmos establecidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un procedimiento de alineación de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartida por una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento y la secuencia de aminoácidos de un presunto zcytor17 variante.
- 10 El algoritmo FASTA lo describen Pearson y Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), y Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990).

15 En síntesis, FASTA caracteriza primero la similitud de secuencias identificando regiones compartidas por la secuencia interrogante (*por ejemplo*, SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 117 y SEC ID N°: 119) y una secuencia de ensayo que tiene o bien la densidad más alta de identidad (si la ktup variable es 1) o pares de identidades (si ktup=2), sin considerar sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos conservadoras. Después, a las diez regiones con la densidad más alta de identidades se les vuelve a asignar una puntuación comparando la similitud de todos los aminoácidos apareados, usando una matriz de sustitución de aminoácidos, y los finales de las regiones se "recortan" para incluir solamente aquellos restos que contribuyen a la puntuación más

20 alta. Si hay varias regiones con puntuaciones superiores al "valor de corte" (calculado por una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor ktup), entonces se examinan las regiones iniciales recortadas para determinar si las regiones pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con huecos. Finalmente, las regiones de puntuación más alta de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una

modificación del algoritmo Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787 (1974)), que permite inserciones y deleciones de aminoácidos.

5 Los parámetros preferidos para los analistas de FASTA son: ktup=1, penalización por abertura de hueco=10, penalización por extensión de hueco=1 y matriz de sustitución=BLOSUM62, estableciéndose otros parámetros por defecto. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el fichero de la matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el Anexo 2 de Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990).

10 FASTA también puede usarse para determinar la identidad de secuencia de las moléculas de ácido nucleico usando una proporción, como se desvela anteriormente. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor ktup puede variar entre uno y seis, preferentemente entre tres y seis, más preferentemente tres, estableciéndose por defecto otros parámetros del programa FASTA.

15 La tabla BLOSUM62 (Tabla 4) es una matriz de sustitución de aminoácidos derivada de aproximadamente 2.000 alineaciones múltiples locales de segmentos de secuencias de proteínas, que representa regiones altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992)). Por consiguiente, las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 pueden usarse para definir sustituciones de aminoácidos conservativas que pueden introducirse en las secuencias de aminoácidos de la presente invención. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácidos basadas exclusivamente en propiedades químicas (como se analiza más adelante), el lenguaje "sustitución de aminoácidos conservativa" preferentemente se refiere a una sustitución representada por un valor BLOSUM62 mayor de -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácido es conservativa si la sustitución se caracteriza por un valor BLOSUM62 de 0, 1, 2 ó 3. De acuerdo con este sistema, las sustituciones de aminoácidos conservativas preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 1 (por ejemplo, 1, 2 ó 3), aunque las sustituciones de aminoácidos conservativas más preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 2 (por ejemplo, 2 ó 3).

30 Los polipéptidos zcytor17 variantes o polipéptidos zcytor17 sustancialmente homólogos se caracterizan por tener una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferentemente de una naturaleza inferior, de lo que lo son las sustituciones de aminoácidos conservativas (véase la Tabla 5) y otras sustituciones que no influyen significativamente en el plegamiento o actividad del polipéptido; pequeñas deleciones, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino- o carboxilo- terminal, tal como un resto de metionina amino terminal, un pequeño péptido de engarce de hasta aproximadamente 20-25 restos o un marcador de afinidad. La presente memoria descriptiva describe polipéptidos que comprenden una secuencia que es idéntica al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 % y más preferentemente un 95 % o más a la región correspondiente de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 117 o SEC ID N°: 119 excluyendo las secuencias marcadoras, de extensión, de engarce y similares. Los polipéptidos que comprenden marcadores de afinidad pueden comprender adicionalmente un sitio de escisión proteolítica entre el polipéptido zcytor17 y el marcador de afinidad. Los sitios adecuados incluyen sitios de escisión de trombina y sitios de escisión del factor Xa.

40

*Tabla 5*

Sustituciones de aminoácidos conservativas

Básica:	arginina lisina histidina
Ácida:	ácido glutámico ácido aspártico
Polar:	glutamina asparagina
Hidrofóba:	leucina isoleucina valina
Aromática:	fenilalanina triptófano tirosina
Pequeña:	glicina alanina serina treonina metionina

45 La presente memoria descriptiva describe un receptor de citocina multimérico aislado que comprende un polipéptido que posee al menos una identidad de secuencia del 90 por ciento con la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109 o SEC ID N°: 5; y al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I, en el que el receptor de citocina multimérico se une al menos a una parte de la SEC ID N°: 2. El polipéptido que tiene al menos una identidad de secuencia del 90 por ciento con la SEC ID N°: 111 puede incluir, por ejemplo, del resto de aminoácido 20 al resto de

aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 519, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 543 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 544 al resto de aminoácido 732 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 544 al resto de aminoácido 649 de la SEC ID N°: 109, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 732 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 649 de la SEC ID N°: 109, y combinaciones de los mismos. La al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I incluye, por ejemplo, OSMRbeta (SEC ID N°: 7) y/o WSX-1 (SEC ID N°: 9). Por ejemplo, la al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I que comprende al menos una parte de la SEC ID N°: 7 puede comprender del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 35 al resto de aminoácido 137 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 240 al resto de aminoácido 342 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 348 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 761 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 762 al resto de aminoácido 979 de la SEC ID N°: 7, y/o combinaciones de los mismos. El receptor de citocina multimérico puede ser un heterodímero, trímero, tetrámero, pentámero o similar. Además, el receptor de citocina multimérico puede ser soluble, puede estar inmovilizado en un soporte sólido o unido a membranas. Opcionalmente, el receptor de citocina multimérico puede antagonizar una actividad de la SEC ID N°: 2, tal como inhibir o reducir la proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias y/o inflamatorias o inhibir o reducir la mejora del proceso hematopoyético, inmunitario y/o inflamatorio, o inhibir o reducir la diferenciación de células hematopoyéticas, por ejemplo, células linfoides tales como células monocíticas, macrófagos y/o linfocitos T. El receptor de citocina multimérico de la presente invención también puede comprender un marcador de afinidad seleccionado del grupo de polihistidina, proteína A, glutatión S transferasa, Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag™, péptido de unión a estreptavidina y un polipéptido F<sub>c</sub> de inmunoglobulina.

La presente memoria descriptiva describe un complejo ligando/receptor que comprende un polipéptido que incluye al menos una parte de la SEC ID N°: 2; y un receptor de citocina multimérico soluble que comprende al menos una parte de al menos un polipéptido seleccionado del grupo de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 9, en el que el polipéptido está adherido al receptor de citocina multimérico soluble. El receptor de citocina multimérico soluble puede comprender el dominio extracelular y/o dominio transmembrana de zcytor17 (SEC ID N°: 111), OSMRbeta (SEC ID N°: 7), y/o WSX-1 (SEC ID N°: 9). Por ejemplo, el receptor de citocina multimérico soluble puede comprender del resto de aminoácido 20 al 227 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al 519 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al 543 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 28 al 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 35 al 137 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 240 al 342 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 348 al 429 de la SEC ID N°: 7, o combinaciones de los mismos. El receptor de citocina multimérico soluble puede ser un heterodímero, trímero, tetrámero, pentámero o similar. El receptor de citocina multimérico de la presente invención también puede comprender un marcador de afinidad como se describe en el presente documento. El polipéptido del complejo ligando/receptor puede comprender los restos de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 seleccionados del grupo de 38 a 152, 27 a 164, 24 a 164, 1 a 164, 38 a 52, 83 a 98, 104 a 117, 137 a 152, y combinaciones de los mismos.

El complejo ligando/receptor descrito en el presente documento también puede comprender una proteína de fusión. La proteína de fusión puede comprender al menos cuatro polipéptidos, en el que el orden de los polipéptidos desde el extremo N al extremo C es un primer polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 38-52 de la SEC ID N°: 2; un primer espaciador de 6-27 restos de aminoácidos; un segundo polipéptido que comprende los restos de aminoácidos seleccionados del grupo de (a) restos de la hélice B de IL-2 de la SEC ID N°: 183; (b) restos 65-83 de la hélice B de IL-4 de la SEC ID N°: 179; (c) restos 73-86 de la hélice B de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos 72-81 de la hélice B de GM-CSF de la SEC ID N°: 181; y (e) restos de aminoácidos 83-98 de la SEC ID N°: 2; un segundo espaciador de 5-11 restos de aminoácidos; un tercer polipéptido que comprende los restos de aminoácidos seleccionados del grupo de (a) restos 102-116 de la hélice C de IL-2 de la SEC ID N°: 177; (b) restos 94-118 de la hélice C de IL-4 de la SEC ID N°: 179; (c) restos 91-103 de la hélice C de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos 85-103 de la hélice C de GM-CSF de la SEC ID N°: 181; y (e) restos de aminoácidos 104-117 de la SEC ID N°: 2; un tercer espaciador de 3-29 restos de aminoácidos; y un cuarto polipéptido que comprende los restos de aminoácidos seleccionados del grupo de (a) restos 134-149 de la hélice D de IL-2 de la SEC ID N°: 177; (b) restos 123-141 de la hélice D de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (c) restos 133-151 de la hélice D de IL-4 de la SEC ID N°: 179; (d) restos 120-131 de la hélice D de GM-CSF de la SEC ID N°: 181; y (e) los restos de aminoácidos 137-152 de la SEC ID N°: 2; y un receptor de citocina multimérico que comprende al menos una parte de al menos un polipéptido seleccionado del grupo de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 9; en el que la proteína de fusión está adherida al receptor de citocina multimérico.

De manera alternativa, la proteína de fusión puede comprender al menos cuatro polipéptidos, en el que el orden de los polipéptidos desde el extremo N al extremo C es un primer polipéptido que comprende restos de aminoácidos seleccionados de un grupo de (a) restos 27-48 de la hélice A de IL-2 de la SEC ID N°: 177; (b) restos 30-42 de la hélice A de IL-4 de la SEC ID N°: 179; (c) restos 35-45 de la hélice A de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos 30-44 de la hélice A de GM-CSF de la SEC ID N°: 181; y (e) restos de aminoácidos 38-52 de la SEC ID N°: 2; un primer espaciador de 6-27 restos de aminoácidos; un segundo polipéptido que comprende los restos de aminoácidos seleccionados del grupo de (a) restos de la hélice B de IL-2 de la SEC ID N°: 183; (b) restos 65-83 de la hélice B de IL-4 de la SEC ID N°: 179; (c) restos 73-86 de la hélice B de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos 72-81 de la hélice B de GM-CSF de la SEC ID N°: 181; y (e) restos de aminoácidos 83-98 de la SEC ID N°: 2; un segundo espaciador



de 5-11 restos de aminoácidos; un tercer polipéptido que comprende restos de aminoácidos seleccionados del grupo de (a) restos 102-116 de la hélice C de IL-2 de la SEC ID N°: 177; (b) restos 94-118 de la hélice C de IL-4 de la SEC ID N°: 179; (c) restos 91-103 de la hélice C de IL-3 de la SEC ID N°: 102; (d) restos 85-103 de la hélice C de GM-CSF de la SEC ID N°: 181; y (e) restos de aminoácidos 104-117 de la SEC ID N°: 2; un tercer espaciador de 3-29  
 5 restos de aminoácidos y un cuarto polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 137-152 de la SEC ID N°: 2; y un receptor de citocina multimérico que comprende al menos una parte de al menos un polipéptido seleccionado del grupo de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 9; en el que la proteína de fusión está adherida al receptor de citocina multimérico. Un receptor de citocina multimérico puede comprender al menos uno de los siguientes polipéptidos de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 9, o los dominios  
 10 extracelulares de los mismos. El complejo ligando/receptor puede ser soluble y adicionalmente puede incluir un marcador de afinidad como se describe en el presente documento.

La presente memoria descriptiva describe un polinucleótido aislado y purificado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia de al menos un 90 por ciento con la  
 15 SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, o SEC ID N°: 5, en el que el polipéptido y al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I forma un receptor de citocina multimérico, y en el que el receptor de citocina multimérico se une al menos a una parte de la SEC ID N°: 2. La presente memoria descriptiva también describe un polinucleótido aislado y purificado que codifica un polipéptido que comprende al menos una parte de al menos una  
 20 de las SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109 o SEC ID N°: 5, en el que el polipéptido y al menos una parte de un receptor de citocina de clase I forma un receptor de citocina multimérico, y en el que el receptor de citocina multimérico se une al menos a una parte de la SEC ID N°: 2. El polinucleótido puede codificar un polipéptido que esté incluido en un receptor de citocina multimérico soluble y que también puede incluir un marcador de afinidad como se describe en el presente documento. El polipéptido puede comprender, por ejemplo, los restos de aminoácidos 20 a 227 de la SEC  
 25 ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al 519 de la SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al 543 de la SEC ID N°: 111 y/o combinaciones de los mismos. Además, la al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I puede comprender, por ejemplo, los restos de aminoácidos 28 a 739 de la SEC ID N°: 7, los restos de aminoácidos 28 a 429 de la SEC ID N°: 7, los restos de aminoácidos 35 a 137 de la SEC ID N°: 7, los restos de aminoácidos 240 a 342 de la SEC ID N°: 7, los restos de aminoácidos 348 a 429 de la SEC ID N°: 7, y/o  
 30 combinaciones de los mismos. El receptor de citocina multimérico soluble puede ser un heterodímero, trímero, tetrámero, pentámero o similar. La al menos una parte de la SEC ID N°: 2 puede incluir, por ejemplo, restos de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 seleccionados del grupo de 38 a 152, 27 a 164, 24 a 164, 1 a 164, 38 a 52, 83 a 98, 104 a 117, 137 a 152, y combinaciones de los mismos. Opcionalmente, el receptor de citocina multimérico puede antagonizar una actividad de la SEC ID N°: 2 como se describe en el presente documento.

La presente memoria descriptiva describe otras diversas fusiones de polipéptidos y proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones de polipéptidos. Por ejemplo, puede prepararse un polipéptido  
 35 zcytor17 como una fusión con una proteína dimerizante como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.155.027 y 5.567.584. Las proteínas dimerizantes preferidas en este sentido incluyen dominios de región constante de inmunoglobulina. Las fusiones del polipéptido zcytor17-inmunoglobulina pueden expresarse en células modificadas por ingeniería genética para producir diversos análogos zcytor17 multiméricos. Pueden fusionarse dominios auxiliares con polipéptidos zcytor17 para dirigirlos a células, tejidos, o macromoléculas específicas (por  
 40 ejemplo, colágeno). Puede fusionarse un polipéptido zcytor17 con uno o más restos, tal como un marcador de afinidad para purificación y un dominio diana. Las fusiones polipeptídicas también pueden comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase, Tuan y col., *Connective Tissue Research* 34: 1-9, 1996. Por ejemplo, uno o más dominios del receptor soluble zcytor17 pueden unirse a un receptor de citocina soluble, tal como OSMRbeta y/o WSX-1, lo que puede mejorar sus propiedades biológicas o la eficacia de producción. Adicionalmente, el receptor de citocina multimérico soluble puede incluir adicionalmente un marcador de afinidad. Un  
 45 marcador de afinidad puede ser, por ejemplo, un marcador seleccionado del grupo de polihistidina, proteína A, glutatión S transferasa, Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag<sup>TM</sup>, péptido de unión a estreptavidina y un polipéptido Fc de inmunoglobulina.  
 50

Las proteínas descritas en el presente documento también pueden comprender restos de aminoácidos de origen no natural. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxioprolina, *trans*-4-hidroxioprolina, *N*-metilglicina, *alo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido piperídico, ácido tiazolidina carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *terc*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina, y 4-fluorofenilalanina. Se conocen diversos métodos en la materia para incorporar a las proteínas  
 55 restos de aminoácidos de origen no natural. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro* en el que se suprimen las mutaciones sin sentido usando ARNt supresores químicamente aminoacilados. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se realizan en un sistema acelular que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas disponibles en el mercado y otros reactivos. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson y col., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2722, 1991; Ellman y col., *Methods Enzymol.* 202: 301, 1991; Chung y col., *Science* 259: 806-9, 1993; y Chung y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10145-9, 1993). En un  
 60 segundo procedimiento, la traducción se realiza en ovocitos de *Xenopus* por microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti y col., *J. Biol. Chem.* 271: 19991-8, 1996). En un tercer

- procedimiento, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que ha de reemplazarse (por ejemplo fenilalanina) y en presencia de aminoácido (o aminoácidos) de origen no natural deseado (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina, o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural se incorpora a la proteína en lugar de su equivalente natural. Véase, Koide y col., *Biochem.* 33: 7470-7476, 1994. Los restos de aminoácido de origen natural pueden convertirse en especies de origen no natural por modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida al sitio para expandir más el intervalo de sustituciones (Wynn y Richards, *Protein Sci.* 2: 395-403, 1993).
- Los restos de aminoácidos zcytor17 pueden sustituir a un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético, aminoácidos de origen no natural y aminoácidos sintéticos.
- Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la materia, tal como mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989; Bass y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4498-502, 1991). En esta última técnica, en cada resto de la molécula se introducen mutaciones sencillas de alanina y se somete a ensayo la actividad biológica de las moléculas mutantes resultantes (por ejemplo unión al ligando y transducción de señal) como se desvela a continuación para identificar restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también Hilton y col., *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708, 1996. También pueden determinarse sitios de interacción ligando/receptor, proteína-proteína u otras interacciones biológicas por análisis de estructura física, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con mutación de presuntos aminoácidos en el sitio de contacto. Véase, por ejemplo de Vos y col., *Science* 255: 306-312, 1992; Smith y col., *J. Mol. Biol.* 224: 899-904, 1992; Wlodaver y col., *FEBS Lett.* 309: 59-64, 1992. Las identidades de los aminoácidos esenciales también pueden deducirse a partir de análisis de homologías con receptores relacionados.
- La determinación de restos de aminoácidos que están dentro de regiones o dominios que son críticos para mantener la integridad estructural puede determinarse. Dentro de estas regiones pueden determinarse restos específicos que serán más o menos tolerantes al cambio y mantendrán la estructura terciaria general de la molécula. Los procedimientos para analizar la estructura de la secuencia incluyen, pero sin limitación, alineamiento de secuencias múltiples con alta identidad de aminoácidos o nucleótidos y análisis por ordenador usando programas informáticos disponibles (por ejemplo, el visor Insight II<sup>®</sup> y herramientas de modelación de homología; MSI, San Diego, CA), propensiones de estructuras secundarias, patrones binarios, empaquetamiento complementario e interacciones polares enterradas (Barton, *Current Opin. Struct. Biol.* 5: 372-376, 1995 y Cordes y col., *Current Opin. Struct. Biol.* 6: 3-10, 1996). En general, cuando se diseñan modificaciones a moléculas o se identifican fragmentos específicos la determinación de la estructura estará acompañada de actividad evaluadora de las moléculas modificadas.
- Los cambios en las secuencias de aminoácidos se realizan en los polipéptidos zcytor17 para minimizar la ruptura de la estructura de orden superior esencial para la actividad biológica. Por ejemplo, cuando el polipéptido zcytor17 comprende una o más hélices, se realizarán cambios en los restos de aminoácidos de manera que no rompan la geometría de la hélice y otros componentes de la molécula en la que los cambios de conformación anulen alguna función crítica, por ejemplo, la unión de la molécula a sus compañeros de unión. Los efectos de los cambios en las secuencias de aminoácidos pueden pronosticarse, por ejemplo, con un modelo por ordenador como se desvela anteriormente o pueden determinarse por análisis de la estructura cristalina (véase, por ejemplo, Laphorn y col., *Nat. Struct. Biol.* 2: 266-268, 1995). Otras técnicas bien conocidas en la materia comparan los plegamientos de una proteína variante con una molécula convencional (por ejemplo, la proteína natural). Por ejemplo, puede realizarse la comparación del patrón de cisteína en moléculas variantes y convencionales. La espectrometría de masa y la modificación química, usando reducción y alquilación, proporcionan procedimientos para determinar restos de cisteína que están asociados a enlaces disulfuro o no tienen tales asociaciones (Bean y col., *Anal. Biochem.* 201: 216-226, 1992; Gray, *Protein Sci.* 2: 1732-1748, 1993; y Patterson y col., *Anal. Chem.* 66: 3727-3732, 1994). En general, se cree que si una molécula modificada no tiene el mismo patrón de enlaces disulfuro que la molécula convencional, el plegamiento se vería afectado. Otro procedimiento muy conocido y aceptado para medir el plegamiento es el dicroísmo circular (DC). La medición y comparación de los espectros DC generados por una molécula modificada y una molécula convencional son una práctica de rutina (Johnson, *Proteins* 7: 205-214, 1990).
- La cristalografía es otro procedimiento bien conocido para analizar el plegamiento y la estructura. La resonancia magnética nuclear (RMN), el mapeo peptídico digestivo y el mapeo epitópico son también procedimientos conocidos para analizar el plegamiento y las similitudes estructurales entre proteínas y polipéptidos (Schaanan y col., *Science* 257: 961-964, 1992).
- Se puede general un perfil de hidrofiliidad Hopp/Woods de la secuencia de proteínas zcytor17 como se muestra en la SEC ID N<sup>o</sup>: 2, SEC ID N<sup>o</sup>: 46, SEC ID N<sup>o</sup>: 54, SEC ID N<sup>o</sup>: 57 y SEC ID N<sup>o</sup>: 93 (Hopp y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3824-3828, 1981; Hopp, *J. Immun. Meth.* 88: 1-18, 1986 y Triquier y col., *Protein Engineering* 11: 153-169, 1998). Véase, la Figura 1. Este perfil se basa en una ventana desplazable de seis restos. Los restos enterrados G, S y T y los restos expuestos H, Y y W se ignoraron. Por ejemplo, en zcytor17, las regiones hidrófilas incluyen los restos de aminoácidos 43 a 48 de la SEC ID N<sup>o</sup>: 2 y la SEC ID N<sup>o</sup>: 46 (restos 56 a 61 de la SEC ID N<sup>o</sup>: 54), restos de aminoácidos 157 a 162 de la SEC ID N<sup>o</sup>: 2 y SEC ID N<sup>o</sup>: 46 (restos 170 a 175 de la SEC ID N<sup>o</sup>: 54), restos de

aminoácidos 158 a 163 de la SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 46 (restos 171 a 176 de la SEC ID N°: 54), restos de aminoácidos 221 a 226 de la SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 46 (restos 234 a 239 de la SEC ID N°: 54), y restos de aminoácidos 426 a 431 de la SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 46 (restos 439 a 444 de la SEC ID N°: 54).

5 Los expertos en la materia reconocerán que la hidrofiliidad o hidrofobicidad se tomará en cuenta al diseñar modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido zcytor17, de manera que se altere el perfil estructural y biológico general. Son de particular interés para el reemplazo los restos hidrófobos seleccionados del grupo que consiste en Val, Leu e Ile o del grupo que consiste en Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp. Por ejemplo, los restos que toleran la sustitución podrían incluir restos tales como se muestra en la SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 46, SEC ID N°: 54, SEC ID N°: 57 y SEC ID N°: 93. Sin embargo, los restos de cisteína serían relativamente intolerantes a la sustitución.

15 Las identidades de aminoácidos esenciales también pueden deducirse a partir de análisis de similitud de secuencia entre los miembros de la familia de receptores de citocina de clase I con zcytor17. Usando procedimientos tales como el análisis "FASTA", anteriormente descrito, se identifican regiones de gran similitud dentro de una familia de proteínas, y se usan para analizar la secuencia de aminoácidos para regiones conservadas. Un planteamiento alternativo para identificar un polinucleótido zcytor17 variante basándose en la estructura consiste en determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un posible polipéptido zcytor17 variante puede hibridarse a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 45 o SEC ID N°: 53, como se analizó anteriormente.

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

30 La presente memoria descriptiva describe un receptor de citocina multimérico que incluye fragmentos funcionales de los polipéptidos zcytor17 y las moléculas de ácido nucleico que codifican tales fragmentos funcionales. Un zcytor17 "funcional" o su fragmento, como se define en el presente documento, se caracteriza por su capacidad para mediar la actividad proliferativa o de diferenciación, por su capacidad para inducir o inhibir funciones celulares especializadas o por su capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-zcytor17 o ligando zcytor17 (solubles o inmovilizados). Además, fragmentos funcionales también incluyen el péptido de señal, el dominio de señalización intracelular y similar. Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, zcytor17 se caracteriza por una estructura de receptor de citocina de clase I. Por tanto, la presente memoria descriptiva describe proteínas de fusión que abarcan: (a) moléculas polipeptídicas que comprenden un dominio extracelular, dominios de unión a citocina o dominios intracelulares descritos en el presente documento y (b) fragmentos funcionales que comprenden uno o más de estos dominios. La otra parte del polipéptido de la proteína de fusión puede comprender al menos una parte de uno o más de otro receptor de citocina de clase I, por ejemplo, gp130, LIF, IL-12, WSX-1, subunidad  $\beta$  del receptor IL-2 y el receptor  $\beta$  común (es decir, subunidades  $\beta$  de receptores de IL3, IL-5 y GM-CSF), o por un péptido señal secretor no natural y/o no relacionado que facilita la secreción de la proteína de fusión.

45 Para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido zcytor17, pueden realizarse análisis de delección rutinarios de moléculas de ácido nucleico. Como ilustración, las moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 45 o SEC ID N°: 53 o fragmentos de las mismas, pueden digerirse con *Ba*31 nucleasa para obtener una serie de delecciones anidadas. Estos fragmentos de ADN se insertan después en vectores de expresión en la fase de lectura apropiada y los polipéptidos expresados se aíslan y se someten a ensayo para actividad de zcytor17 o para la capacidad de unirse a anticuerpos anti-zcytor17 o el ligando de zcytor17. Una alternativa a la digestión de exonucleasa consiste en usar mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para introducir delecciones o codones de terminación para especificar la producción de un fragmento de zcytor17 deseado. Como alternativa, pueden sintetizarse fragmentos particulares de un polinucleótido zcytor17 usando la reacción en cadena de la polimerasa.

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

Pueden realizarse y someterse a ensayo sustituciones de aminoácidos múltiples, usando procedimientos conocidos de mutagénesis y selección, como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241: 53-57, 1988) o por Bowie y Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156, 1989). En resumen, estos autores desvelan procedimientos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar un polipéptido funcional y después

5 secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. También pueden usarse otros procedimientos que incluyen presentación de fagos (por ejemplo, Lowman y col., Biochem. 30: 10832-10837, 1991; Ladner y col., Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; Huse, Publicación WIPO WO 92/062045) y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire y col., Gene 46: 145, 1986; Ner y col., DNA 7: 127, 1988).

10 Las variantes de las secuencias de ADN y de polipéptidos zcytor17 descritas también generarse entremezclando ADN, como desvelan Stemmer, Nature 370: 389-91, 1994, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-51, 1994 y la Publicación WIPO WO 97/20078. En síntesis, las moléculas de ADN variantes se generan por recombinación homóloga *in vitro*, por fragmentación aleatoria de un ADN progenitor seguido por de re-ensamblaje usando PCR, lo

15 que da como resultado mutaciones puntuales introducidas aleatoriamente. Esta técnica puede modificarse usando una familia de moléculas de ADN progenitor, como variantes alélicas o moléculas de ADN de distintas especies, para introducir variabilidad adicional al proceso. La selección o detección de la actividad deseada, seguida de iteraciones adicionales de mutagénesis y ensayos, proporciona una rápida "evolución" de secuencias, seleccionando las mutaciones deseables, a la vez que se seleccionan simultáneamente contra cambios perjudiciales.

20 Los procedimientos de mutagénesis, desvelados en el presente documento, pueden combinarse con procedimientos de selección automáticos de alto rendimiento para detectar la actividad de los polipéptidos del receptor zcytor17 clonados, mutagenizados en células hospedadoras. Los ensayos preferidos en este aspecto incluyen ensayos de proliferación celular y ensayos de unión a ligando basados en biodetectores, que se describen más adelante. Las

25 moléculas de ADN mutagenizadas que codifican receptores activos o partes de los mismos (por ejemplo, fragmentos de unión al ligando, dominios de señalización y similar) pueden recuperarse de las células hospedadoras y secuenciarse rápidamente usando equipos modernos. Estos procedimientos permiten la determinación rápida de la importancia de restos de aminoácido individuales en un polipéptido de interés y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

30 La presente memoria descriptiva describe un nuevo receptor de citocina multimérico en el que un segmento que comprende al menos una parte de uno o más de los dominios de zcytor17, por ejemplo, secretor extracelular transmembrana e intracelular, se fusiona otro polipéptido, por ejemplo, un dominio extracelular de un receptor de citocina de clase I, tal como OSMRbeta y/o WSX-1. La fusión se realiza preferentemente empalmado a nivel de

35 ADN para permitir la expresión de moléculas quiméricas en sistemas de producción recombinantes. Después, las moléculas resultantes se someten a ensayo para determinar propiedades tales como, solubilidad mejorada, estabilidad mejorada, semivida de eliminación prolongada, expresión y niveles de secreción mejorados y propiedades farmacodinámicas. Tal receptor de citocina multimérico puede comprender adicionalmente otros restos de aminoácidos (por ejemplo un engarce polipeptídico) entre las proteínas o polipéptidos componentes. Un engarce

40 de dominio puede comprender una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 aminoácidos de longitud y de aproximadamente 10 aminoácidos de longitud. Una función de un engarce es separar las regiones de la proteína activa para promover su bioactividad independiente y permitir que cada región asuma su conformación bioactiva independiente de interferencia de su

45 estructura colindante.

Usando los procedimientos analizados en el presente documento, un experto habitual en la materia puede identificar y/o preparar diversos fragmentos o variantes de polipéptidos de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 117 y SEC ID N°: 119 que conservan la transducción de señal o la actividad de unión al ligando. Por

50 ejemplo, puede fabricarse un "receptor soluble" zcytor17 preparando diversos polipéptidos que sean sustancialmente homólogos al dominio de unión de citocina (restos 20 (Ala) a 227 (Pro) de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109; restos 33 (Ala) a 240 (Pro) de la SEC ID N°: 5), el dominio extracelular (restos 20 (Ala) a 519 (Glu) de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109; restos 33 (Ala) a 532 (Glu) de la SEC ID N°: 5), o variantes alélicas o sus ortólogos de especies (véase, por ejemplo, la SEC ID N°: 117 y SEC ID N°: 119 y sus fragmentos funcionales, como se describe

55 en el presente documento)) y conservar la actividad de unión al ligando de la proteína zcytor17 de tipo silvestre. Además, pueden aislarse receptores solubles zcytor17 variantes, tales como los mostrados en la SEC ID N°: 113 y SEC ID N°: 115. Tales polipéptidos pueden incluir aminoácidos adicionales, por ejemplo, a partir de parte o de todos los dominios transmembrana e intracelulares. Como se desvela en general en el presente documento, tales polipéptidos también pueden incluir segmentos polipeptídicos adicionales tales como marcadores, etiquetas de afinidad y similares.

60

Para cualquier polipéptido zcytor17, incluyendo variantes, receptores solubles y polipéptidos o proteínas de fusión, un experto habitual en la materia puede generar fácilmente una secuencia de polinucleótidos completamente degenerada que codifique esta variante usando la información expuesta en las Tablas 1 y 2 anteriores.

65

Los receptores de citocina multiméricos zcytor17 de la presente invención, incluyendo polipéptidos de longitud

- completa, fragmentos biológicamente activos y polipéptidos de fusión, pueden producirse en células huésped modificadas por ingeniería genética de acuerdo con técnicas convencionales. Las células huésped adecuadas son aquellos tipos de células que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y crecer en cultivos, e incluyen células bacteriana, fúngicas y células eucariotas superiores cultivadas. Se prefieren las células eucariotas, particularmente las células cultivadas de organismos multicelulares. Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y Ausubel y col., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Inc., NY, 1987, desvelan técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir ADN exógeno en diversas células huésped
- 5
- 10 La presente memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende una molécula de ADN aislada y purificada que incluye los siguientes elementos unidos operativamente: un primer promotor de transcripción, un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 por ciento con la SEC ID N°: 111, y un primer terminador de la transcripción; y un segundo promotor de la transcripción, un segundo segmento de ADN que codifica al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I y un
- 15 segundo terminador de la transcripción; en el que el polipéptido y el receptor de citocina de clase I forman un receptor de citocina multimérico; y en el que el receptor de citocina multimérico se une a al menos una parte de la SEC ID N°: 2. La molécula de ADN puede comprender adicionalmente una secuencia de señal secretora unida operativamente al primer y segundo segmento de ADN. El receptor de citocina multimérico puede ser soluble y/o puede comprender adicionalmente un marcador de afinidad como se describe en el presente documento. Además,
- 20 el receptor de citocina multimérico puede antagonizar una actividad de la SEC ID N°: como se describe en el presente documento. La al menos una parte del receptor de citocina de clase I puede comprender partes de la SEC ID N°: 7 y/o SEC ID N°: 9, tales como, por ejemplo, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 35 al resto de aminoácido 137 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 240 al resto de aminoácido 342 de la SEC ID N°: 7, del resto aminoácido 348 al resto de aminoácido 429 de la SEC
- 25 ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 761 de la SEC ID N°: 7, del resto aminoácido 762 al resto de aminoácido 979 de la SEC ID N°: 7 o combinaciones de los mismos. La presente memoria descriptiva describe una célula cultivada que contiene el vector de expresión descrito anteriormente.
- 30 En general, una secuencia de ADN que codifica, por ejemplo, un polipéptido zcytor17 está unida operativamente a otros elementos genéticos necesarios para su expresión, que incluye generalmente un promotor y un terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá normalmente uno o más marcadores de selección y uno o más orígenes de replicación, no obstante los expertos en la materia reconocerán que dentro de determinados sistemas de marcadores de selección pueden proporcionarse en vectores separados, y la replicación
- 35 de ADN exógeno puede proporcionarse por integración en el genoma de la célula huésped. La selección de promotores terminadores, marcadores de selección, vectores y otros elementos es una cuestión de diseño rutinario que se encuentra dentro del nivel de la experiencia habitual en la materia. Muchos de estos elementos se describen en la bibliografía y se obtienen en el mercado.
- 40 Para dirigir, por ejemplo, un polipéptido zcytor17 en la ruta secretora de una célula huésped, en el vector de expresión se proporciona una secuencia de señal secretora (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre). La secuencia de señal secretora puede ser la de zcytor17, o puede derivar de otra proteína secretada (por ejemplo t-PA) o sintetizarse *de novo*. La secuencia de señal secretora está unida operativamente a la secuencia de ADN de zcytor17, es decir, las dos secuencias se unen en la fase de lectura correcta y se posicionan
- 45 para dirigir el polipéptido recién sintetizado hacia la ruta secretora de la célula huésped. Las secuencias de las señales secretoras normalmente se posicionan en 5' hacia la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque determinadas secuencias de señales secretoras pueden posicionarse en otros sitios en la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch y col., Patente de Estados Unidos N° 5.037.743; Holland y col., Patente de Estados Unidos N° 5.143.830).
- 50 Como alternativa, la secuencia de señal secretora contenida en los polipéptidos de la presente invención se usa para dirigir otros polipéptidos hacia la ruta secretora. La presente memoria descriptiva describe tales polipéptidos de fusión. Usando procedimientos conocidos en la materia y desvelados en el presente documento, puede fabricarse un polipéptido de fusión de señal en el que una secuencia de señal secretora derivada del aminoácido 1 (Met) al aminoácido 19 (Ala) de la SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 109, o en el que una secuencia de señal secretora deriva del aminoácido 1 (Met) al aminoácido 32 (Ala) de la SEC ID N°: 5, o del aminoácido 1 (Met) al aminoácido 45 (Ala) de la SEC ID N°: 117 o SEC ID N°: 119), o del aminoácido 28 (Met) al resto 45 (Ala) de la SEC ID N°: 117 o SEC ID N°: 119), está unida operativamente a otro polipéptido. La secuencia de señal secretora contenida en los polipéptidos de fusión de la presente invención está preferentemente condensada en forma aminoterminal a un péptido adicional para dirigir el péptido adicional hacia la ruta secretora. Tales construcciones tienen numerosas aplicaciones conocidas en la materia. Por ejemplo, estas nuevas construcciones de fusión de secuencia de señal secretora pueden dirigir la secreción de un componente activo de una proteína normalmente no secretada. Tales fusiones pueden usarse *in vivo* o *in vitro* para dirigir péptidos a través de la ruta secretora.
- 60
- 65 La presente memoria descriptiva describe una célula cultivada que comprende un primer vector de expresión que comprende una molécula de ADN que contiene los siguientes elementos unidos operativamente: un promotor de la

transcripción, un segmento de ADN que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % con la SEC ID N°: 111, y un terminador de la transcripción; y un segundo vector de expresión que comprende un promotor de la transcripción, un segmento de ADN que codifica al menos una parte de un receptor de citocina de clase I, y un terminador de la transcripción; en el que el polipéptido y el receptor de citocina de clase I forman un receptor de citocina multimérico. El primer y segundo vector de expresión puede comprender adicionalmente una secuencia de señal secretora unida operativamente al primer y segundo segmento de ADN. El receptor de citocina multimérico puede ser soluble, puede ser un heterodímero y/o puede comprender adicionalmente un marcador de afinidad como se describe en el presente documento. Además, el receptor de citocina multimérico puede antagonizar una actividad de la SEC ID N°: 2 como se describe en el presente documento. La al menos una parte de un receptor de citocina de clase I puede comprender partes de la SEC ID N°: 7 y/o SEC ID N°: 9, tales como, por ejemplo, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 35 al resto de aminoácido 137 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 240 al resto de aminoácido 342 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 348 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 739 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 761 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 762 al resto de aminoácido 979 de la SEC ID N°: 7 o combinaciones de los mismos.

Las células de mamífero cultivadas son huéspedes adecuados dentro de la presente invención. Los procedimientos para inducir ADN exógeno en una célula huésped de mamífero incluyen transcripción mediada por fosfato de calcio (Wigler y col., Cell 14: 725, 1978; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981; Graham y Van der Eb, Virology 52: 456, 1973), electroporación (Neumann y col., EMBO J. 1: 841-845, 1982), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel y col., citado anteriormente.) y transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson y col., Focus 15: 73, 1993; Ciccarone y col., Focus 15: 80, 1993) y vectores víricos (Miller y Rosman, BioTechniques 7: 980-90, 1989; Wang y Finer, Nature Med. 2: 714-716, 1996). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas la desvelan, por ejemplo, Levinson y col., en la Patente de Estados Unidos N° 4.713.339; Hagen y col., en la Patente de Estados Unidos N° 4.784.950; Palmiter y col., en la Patente de Estados Unidos N° 4.579.821; y Ringold, en la Patente de Estados Unidos N° 4.656.134. Las células de mamífero cultivadas adecuadas incluyen las líneas celulares COS-1 (ATCC N° CRL 1650), COS-7 (ATCC N° CRL 1651), BHK (ATCC N° CRL 1632), BHK 570 (ATCC N° CRL 10314), 293 (ATCC N° CRL 1573; Graham y col., J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977) y de ovario de hámster Chino (por ejemplo CHO-K1; ATCC N° CCL 61). En la técnica se conocen líneas celulares adicionales adecuadas y se obtienen de bancos públicos tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland. En general, se prefieren los promotores de transcripción fuertes, como los promotores de SV-40 o citomegalovirus. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen aquellos genes de metalotioneína (Patentes de Estados Unidos N° 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor principal tardío de adenovirus.

La selección de fármacos, generalmente se usa para seleccionar células de mamíferos cultivadas en las que se ha insertado ADN extraño. Dichas células normalmente se denominan "transfectantes". Las células que se han cultivado en presencia del agente selectivo y que son capaces de pasar el gen de interés a su descendencia se denominan "transfectantes estables". Un marcador de selección preferido es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección se realiza en presencia de un fármaco de tipo neomicina tal como G-418 o similar. Los sistemas de selección también pueden usarse para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un proceso denominado "amplificación". La amplificación se realiza cultivando transfectantes en presencia de un nivel bajo del agente selectivo y luego aumentando la cantidad del agente selectivo para seleccionar células que produzcan altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador de selección amplificable preferido es la hidrofolato reductasa, que confiere resistencia a metotrexato. También pueden usarse otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo resistencia a higromicina, resistencia a múltiples fármacos, puromicin acetyl transferasa). Pueden usarse marcadores alternativos que introducen un fenotipo alterado, como proteína fluorescente verde, o proteínas de la superficie celular tales como CD4, CD8, MHC de Clase I, alcalina fosfatasa de placenta, para clasificar células transfectadas de células no transfectadas mediante clasificación FACS o tecnología de separación de esferas magnéticas.

Como células huésped también pueden usarse otras células eucariotas superiores, incluyendo células vegetales, células de insectos y células aviares. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como un vector para expresar genes en células vegetales lo han revisado Sinkar y col., J. Biosci. (Bangalore) 11: 47-58, 1987. La transformación de células de insectos y la producción de polipéptidos exógenos en su interior la describen Guarino y col., en la Patente de Estados Unidos N° 5.162.222 y en la publicación WIPO WO 94/06463. Las células de insectos pueden infectarse con baculovirus recombinante, comúnmente derivados del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). Véanse, King, L. A. y Possee, R. D., The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Londres, Chapman & Hall; O'Reilly, D. R. y col., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Nueva York, Oxford University Press., 1994; y, Richardson, C. D., Ed., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995. Un segundo procedimiento para fabricar baculovirus recombinante zcytor17 utiliza un sistema basado en transposón descrito por Luckow (Luckow, V. A. y col., J Virol 67: 4566-79, 1993). Este sistema, que utiliza vectores de transferencia se comercializa en el kit Bac-to-Bac™ (Life Technologies, Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, pFastBac1™ (Life Technologies) que contiene un trasposón Tn7 para mover el ADN que codifica el polipéptido zcytor17 hacia un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande denominado "bácmido". Véanse, Hill-Perkins, M. S. y Possee, R. D., J Gen Virol 71: 971-

6, 1990; Bonning, B. C. y col., J Gen Virol 75: 1551-6, 1994; y Chazenbalk, G. D., y Rapoport, B., J Biol Chem 270: 1543-9, 1995. Asimismo, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión dentro de la fase con ADN que codifica un marcador de epítipo en el extremo C o N del polipéptido zcytor17 expresado, por ejemplo, un marcador de epítipo Glu-Glu (Grussenmeyer, T. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952-4, 1985). Usando una técnica conocida en la materia, un vector de transferencia que contiene zcytor17 se transforma en *E. coli*, y se seleccionan los bácmidos que contienen un gen lacZ interrumpido indicativo de baculovirus recombinante. El ADN bacmídico que contiene el genoma del baculovirus recombinante se aísla, usando técnicas comunes y se usa para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, por ejemplo, células Sf9. El virus recombinante que expresa zcytor17 se produce posteriormente. Las reservas víricas recombinantes se fabrican por procedimientos comúnmente usados en la técnica.

El virus recombinante se usa para infectar células huésped, normalmente una línea celular derivada de la oruga militar tardía, *Spodoptera frugiperda*. Véase, en general, Glick y Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D. C., 1994. Otra línea celular adecuada es la línea celular High FiveO™ (Invitrogen) derivada de *Trichoplusia ni* (Patente de Estados Unidos N° 5.300.435). Para cultivar y mantener las células se usa medio asérico disponible en el mercado. Los medios disponibles son Sf900 II™ (Life Technologies) o ESF 921™ (Expression Systems) para las células Sf9; y Ex-cello405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) o Express FiveO™ (Life Technologies) para las células *T. ni*. Los procedimientos usados se describen generalmente en manuales de laboratorio disponibles (King, L. A. y Possee, R. D., citado anteriormente.; O'Reilly, D. R. y col., citado anteriormente.; Richardson, C. D., citado anteriormente). Usando los procedimientos descritos en el presente documento, la purificación posterior del polipéptido zcytor17 puede conseguirse a partir del sobrenadante.

Las células fúngicas, incluyendo las células de levadura, también pueden usarse dentro de la presente invención. Las especies de levadura de partícula de interés en este sentido incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Pichia methanolica*. Los procedimientos para transformar células *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de los mismos los describen, por ejemplo, Kawasaki, en la Patente de Estados Unidos N° 4.599.311; Kawasaki y col., en la Patente de Estados Unidos N° 4.931.373; Brake, en la Patente de Estados Unidos N° 4.870.008; Welch y col., en la Patente de Estados Unidos N° 5.037.743; y Murray y col., en la Patente de Estados Unidos N° 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por el fenotipo determinado por el marcador de selección, comúnmente por resistencia al fármaco o por la capacidad de desarrollarse en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema vector preferido para uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema vector *POT1* desvelado por Kawasaki y col. (Patente de Estados Unidos N° 4.931.373), que permite que las células transformadas se seleccionen por desarrollo en medio que contiene glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para su uso en levadura incluye aquellos genes de enzimas glucolíticas (véanse, por ejemplo, Kawasaki, Patente de Estados Unidos N° 4.599.311; Kingsman y col., Patente de Estados Unidos N° 4.615.974; y Bitter, Patente de Estados Unidos N° 4.977.092) y genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse también las Patentes de Estados Unidos N° 4.990.446; 5.063.154; 5.139.936 y 4.661.454. En la técnica se conocen sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*. Véanse, por ejemplo Gleeson y col., J. Gen. Microbiol. 132: 3459-3465, 1986 y Cregg, Patente de Estados Unidos N° 4.882.279. Pueden utilizarse células de *Aspergillus* de acuerdo con los procedimientos de McKnight y col., en la Patente de Estados Unidos N° 4.935.349. Los procedimientos para transformar *Acromonium chrysogenum* los desvela Sumino y col., en la Patente de Estados Unidos N° 5.162.228. Los procedimientos para transformar *Neurospora* los desvela Lambowitz, en la Patente de Estados Unidos N° 4.486.533.

El uso de *Pichia methanolica* como huésped para la producción de proteínas recombinantes se desvela en las Publicaciones WIPO WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 y WO 98/02565. Las moléculas de ADN para su uso en la transformación de *P. methanolica* se prepararán como plásmidos circulares bicatenarios que preferentemente se linealizan antes de la transformación. Para la producción de polipéptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y terminador en el plásmido sean aquellos de un gen de *P. methanolica*, tal como un gen de utilización de alcohol de *P. methanolica* (*AUG1* o *AUG2*). Otros promotores útiles incluyen aquellos de los genes de dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD) y catalasa (CAT). Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma huésped, se prefiere tener todo el segmento de expresión del plásmido flanqueado en ambos extremos por las secuencias de ADN huésped. Un marcador de selección preferido para su uso en *Pichia methanolica* es un gen *ADE2* de *P. methanolica*, que codifica fosforribosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), el cual permite que las células huésped *ade2* se desarrollen en ausencia de adenina. Para procedimientos industriales a gran escala, en los que se desee minimizar el uso de metanol, se prefiere usar células huésped en las que ambos genes de utilización de metanol (*AUG1* y *AUG2*) estén deletados. Para la producción de proteínas segregadas, se prefieren las células huésped deficientes de genes de proteasas vacuolares (*PEP4* y *PRB1*). La electroporación se usa para facilitar la introducción de un plásmido, que contiene ADN que codifica un polipéptido de interés, en células de *P. methanolica*. Se prefiere transformar las células de *P. methanolica* por electroporación, usando un campo eléctrico pulsado exponencialmente decreciente, que tenga una intensidad de campo de 2,5 a 4,5 kV/cm, preferentemente aproximadamente 3,75 kV/cm y una constante de tiempo (t) de 1 a 40 milisegundos, más preferentemente aproximadamente 20 milisegundos.

- Las células huésped procariotas, incluyendo las cepas de las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus* y otros géneros, son también células huésped útiles dentro de la presente invención. Las técnicas para transformar estos huéspedes y expresar secuencias de ADN exógeno clonadas allí se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., anteriormente). Cuando se expresa un polipéptido zcytor17 en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede estar retenido en el citoplasma, normalmente como gránulos insolubles o puede ser dirigido al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se someten a lisis y los gránulos se recuperan y se desnaturalizan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado se puede volver a plegar y dimerizar diluyendo el desnaturalizante, tal como mediante diálisis contra una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguida de diálisis contra una solución salina tamponada. En el segundo caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional perturbando las células (mediante, por ejemplo, por ultrasonidos o choque osmótico) para liberar los contenidos del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando así la necesidad de desnaturalización y repliegue.
- Las células huésped transformadas o transfectadas se cultivan de acuerdo con procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes necesarios para el desarrollo de las células huésped seleccionadas. En la técnica se conoce diversos medios adecuados, que incluyen medios definidos y medios complejos y, en general, incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios también pueden contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, según sea necesario. El medio de desarrollo generalmente seleccionará células que contienen el ADN exógenamente añadido, por ejemplo, por selección de fármacos o deficiencia de un nutriente esencial que se complementa por el marcador de selección que porta el vector de expresión o cotransfectado a la célula huésped. Las células de *P. methanolicus* se cultivan en un medio que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y oligonutrientes adecuados, a una temperatura de aproximadamente 25 °C a 35 °C. Los cultivos líquidos se proporcionan con suficiente aireación por medios convencionales, tales como agitación de pequeños matraces o salpicadura de fermentadores. Un medio de cultivo preferido para *P. methanolicus* es YEPD (D-glucosa al 2 %, Peptona Bacto™ al 2 % (Difco Laboratories, Detroit, MI), extracto de levadura Bacto™ al 1 % (Difco Laboratories), adenina al 0,004 % y L-leucina al 0,006 %).
- Puede producirse un receptor de citocina multimérico zcytor17 (incluyendo dominios transmembrana e intracelulares) por una célula cultivada y la célula se usa para explorar ligandos para el receptor, incluyendo el ligando natural (SEC ID N°: 2), así como agonistas y antagonistas del ligando natural. Para resumir este planteamiento, un ADNc o gen que codifica el receptor se combina con otros elementos genéticos necesarios para su expresión (por ejemplo, un promotor de la transcripción), y el vector de expresión resultante se inserta en una célula huésped. Las células que expresan el ADN y producen el receptor funcional se seleccionan y se usan dentro de diversos sistemas de exploración.
- Las células de mamíferos adecuadas para su uso en la expresión de los nuevos receptores de la presente invención y transducción de una señal mediada por receptores, incluyen células que expresan una subunidad  $\beta$ , tal como gp130, y las células que co-expresan gp130 y el receptor LIF (Gearing y col., EMBO J. 10: 2839-2848, 1991; Gearing y col., Patente de Estados Unidos N° 5.284.755). En este sentido se prefiere generalmente a emplear una célula que sea sensible a otras citocinas que se unen a receptores en la misma subfamilia, tal como IL-6 o LIF, porque tales células contendrán la ruta (o rutas) de transducción de señal necesarias. Las células preferidas de este tipo incluyen células BaF3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot y col., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), la línea celular TF-1 humana (número ATCC CRL-2003) y la línea celular DA-1 (Branch y col., Blood 69: 1782, 1987; Broudy y col., Blood 75: 1622-1626, 1990). En la alternativa, células huésped adecuadas pueden modificarse por ingeniería genética para producir una subunidad  $\beta$  u otro componente celular necesario para la respuesta celular deseada. Por ejemplo, la línea celular murina BaF3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot y col., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), una línea celular de riñón de cría de hámster (BHK) o la línea celular CTLL-2 (ATCC TIB-214) puede transfectarse para expresar la subunidad gp130 de ratón o el receptor gp130 y LIF de ratón, además del zcytor17. Generalmente se prefiere usar una célula huésped y un receptor (o receptores) de la misma especie, sin embargo este planteamiento permite modificar genéticamente líneas celulares que expresan subunidades de receptores múltiples de cualquier especie, superando de esta manera posibles limitaciones que surgen de especificidad de especies. En la alternativa, especies homólogas del ADNc del receptor humano pueden clonarse y usarse dentro de líneas celulares de la misma especie, tal como un ADNc del receptor humano en la línea celular BaF3. Las líneas celulares que dependen de un factor de crecimiento hematopoyético, tal como IL-3, pueden modificarse por ingeniería genética de esta manera para volverse dependientes de un ligando de zcytor17 o anticuerpo anti-zcytor17.
- Las células que expresan zcytor17 funcional se usan con ensayos de exploración. En la técnica se conocen diversos ensayos adecuados. Estos ensayos se basan en la detección de una respuesta biológica en la célula diana. Un ensayo de este tipo es un ensayo de proliferación celular. Las células se cultivan en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo, y la proliferación celular se detecta, por ejemplo, midiendo la incorporación de timidina marcada con tritio o mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción o degradación metabólica de Alymar Blue™ (AccuMed, Chicago, IL) o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983). Un formato de ensayo alternativo usa células que se modifican por ingeniería



genética adicionalmente para expresar un gen indicador. El gen indicador se une a un elemento promotor que es sensible a la ruta asociada con el receptor, y el ensayo detecta la activación de la transcripción del gen indicador. Un elemento promotor preferido en ese sentido es un elemento de respuesta sérico, STAT o SRE (véase, por ejemplo, Shaw y col., *Cell* 56: 563-572, 1989). Un gen indicador de este tipo es un gen luciferasa (de Wet y col., *Mol. Cell. Biol.* 7: 725, 1987). La expresión del gen luciferasa se detecta por luminiscencia usando procedimientos conocidos en la materia (por ejemplo, Baumgartner y col., *J. Biol. Chem.* 269: 19094-29101, 1994; Schenborn y Goiffin, *Promega Notes* 41: 11, 1993). Los kits de ensayo de luciferasa se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, de Promega Corp., Madison, WI. Pueden usarse líneas celulares diana de este tipo para explorar bibliotecas de productos químicos, medios de cultivo acondicionados celulares, caldos fúngicos, muestras de suelo, muestras de agua y similares. Por ejemplo, un banco de muestras de medios acondicionados de células o tejidos pueden someterse a ensayo en una célula diana para identificar células que producen ligandos. Las células positivas se usan después para producir una genoteca de ADNc en un vector de expresión celular de mamíferos, que se divide en grupos, se transfectan en células huésped y se expresan. Las muestras de los medios de las células transfectadas se someten a ensayo después, con posterior división de grupos, retransfección, subcultivo y se vuelven a someter a ensayo de células positivas para aislar una línea celular clonal que exprese el ligando. Las muestras de medios acondicionados por tejidos de riñón, hígado, bazo, timo, otros tejidos linfoides o linfocitos T son fuentes preferidas de ligando para su uso en procedimientos de exploración.

La presente invención también proporciona un procedimiento para producir un receptor de citocina multimérico (como se define en las reivindicaciones). El procedimiento incluye cultivar una célula como se describe en el presente documento, y aislar el receptor de citocina multimérico producido por la célula.

La presente memoria descriptiva describe un procedimiento para detectar un ligando del receptor de citocina multimérico en una muestra de ensayo. El procedimiento incluye poner en contacto la muestra de ensayo con un receptor de citocina multimérico que comprenda un polipéptido que comprenda del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 o SEC ID N°: 109 (resto de aminoácido 33 al resto de aminoácido 240 de la SEC ID N°: 5) y al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I; y detectar la unión del receptor de citocina multimérico al ligando en la muestra de ensayo. La al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I puede incluir, por ejemplo, una parte de la SEC ID N°: 9 y/o una parte de la SEC ID N°: 7, tal como, por ejemplo, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 35 al resto de aminoácido 137 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 240 al resto de aminoácido 342 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 348 al resto de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 739 de la SEC ID N°: 7, y/o combinaciones de los mismos.

Un ligando natural para un receptor de citocina multimérico zcytor17 de la presente invención también puede identificarse mutagenizando una línea celular dependiente de citocina que exprese zcytor17 y cultivándola en condiciones que seleccionen crecimiento autocrino. Véase la publicación WIPO WO 95/21930. Dentro de un procedimiento típico, las células que expresan zcytor17 están mutagenizadas, tal como con EMS. Después, se deja que las células se recuperen en presencia de la citocina requerida, después se transfectan a un medio de cultivo que carece de citosina. Las células supervivientes se exploran para detectar producción de un ligando para el receptor de citocina multimérico zcytor17, tal como añadiendo al medio de cultivo un polipéptido receptor soluble que comprenda el dominio de unión a citocina zcytor17 y al menos una parte de un receptor de citocina de clase I, tal como el dominio de unión a citocina de OSMRbeta (SEC ID N°: 7) y/o WSX-1 (SEC ID N°: 9), como se describe en el presente documento para competir contra el ligando o ensayando medios acondicionados sobre células de tipo silvestre en comparación con células transfectadas que expresan el receptor de citocina multimérico zcytor17. Las líneas celulares preferidas para su uso dentro de este procedimiento incluyen células que se transfectan para expresar gp130 o gp130 en combinación con el receptor LIF. Las líneas celulares hospedadoras preferidas incluyen células CTLL-2 transfectadas (Gillis y Smith, *Nature* 268: 154-156, 1977) y células BaF3 transfectadas.

Además, puede usarse un procedimiento de detección de secreción empleando el receptor de citocina multimérico soluble zcytor17 para aislar un ligando de zcytor17, tal como la SEC ID N°: 2 (Aldrich, y col, *Cell* 87: 1161-1169, 1996). Una genoteca de expresión de ADNc preparada de una fuente de ligando conocida o supuesta se transfecta en células COS-7. El vector de la genoteca de ADNc generalmente tiene un origen SV40 para la amplificación en células COS-7 y un promotor de CMV para alta expresión. Las células COS-7 transfectadas se cultivan en una monocapa y después se fijan y permeabilizan. El receptor de citocina multimérico soluble zcytor17 etiquetado o marcado con biotina, descrito en el presente documento, se pone después en contacto con la capa celular y se deja unirse a las células en la monocapa que expresa una molécula anti-complementaria, es decir, un ligando de zcytor17. Una célula que expresa un ligando se unirá de esta manera con moléculas receptoras. Un anticuerpo anti-etiqueta (anti Ig, para fusiones Ig, M2 o anti-FLAG para fusiones etiquetadas con FLAG, estreptavidina, etiqueta anti-Glu-Glu y similares) que se conjuga con peroxidasa de rábano picante (HRP) se usa para visualizar estas células a las cuales se ha unido el receptor de citocina multimérico soluble zcytor17 etiquetado o marcado con biotina. La HRP cataliza la deposición de un reactivo de tiramida, por ejemplo, tiramida-FITC. Para esta detección puede usarse un kit disponible en el mercado (por ejemplo, el Kit Renaissance TSA-Direct™; NEN Life Science Products, Boston, MA). Las células que expresan el ligando del receptor de citocina multimérico zcytor17 se identificarán con microscopía fluorescente como células verdes y se recogerán para posterior clonación de ligando usando procedimientos de rescate de plásmidos, como se describe en Aldrich, y col, anteriormente, seguido de rondas

posteriores de ensayo de detección de secreción, o exploración convencional de grupos de genotecas de ADNc, hasta identificar clones sencillos.

5 Como un complejo receptor multimérico, la actividad del polipéptido zcytor17 puede medirse mediante un microfisiómetro biodetector basado en silicio que mide el índice de acidificación extracelular o la excreción de protones asociada con la unión al receptor y las siguientes respuestas celulares fisiológicas. Un dispositivo ilustrativo es el microfisiómetro Cytosensor™ fabricado por Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Con este procedimiento, puede medirse diversas respuestas celulares, tales como proliferación celular, transporte de iones, producción de energía, respuesta inflamatoria, activación reguladora y de receptores y similares. Véase, por ejemplo, McConnell, H. M. y col., Science 257: 1906-1912, 1992; Pitchford, S. y col., Meth. Enzymol. 228: 84-108, 1997; Arimilli, S. y col., J. Immunol. Meth. 212: 49-59, 1998; Van Liefde, I. Y col., Eur. J. Pharmacol. 346: 87-95, 1998. El microfisiómetro puede usarse para ensayar células eucariotas, procariotas adherentes o no adherentes. Midiendo los cambios de acidificación extracelular en el medio celular a lo largo del tiempo, el microfisiómetro mide directamente respuestas celulares frente a diversos estímulos, incluyendo agonistas, ligandos o antagonistas del polipéptido zcytor17. Preferentemente, el microfisiómetro se usa para medir respuestas de una célula eucariota que expresa zcytor17, en comparación con una célula eucariota de control que no expresa el polipéptido zcytor17. Las células eucariotas que expresan zcytor17 comprenden células en las que zcytor17 se han transfectado o infectado mediante un vector de adenovirus, y similar, como se describe en el presente documento, creando una célula que es sensible al estímulo modulando zcytor17 o son células que expresan de manera natural zcytor17, tales como células que expresan zcytor17 derivadas de tejido linfóide, bazo, timo o PBL (linfocitos de sangre periférica). Las diferencias, medidas por un aumento o una disminución en la acidificación extracelular, en la respuesta de células que expresan zcytor17, con respecto a un control, son una medición directa de respuestas celulares moduladas por zcytor17. Adicionalmente, tales respuestas moduladas por zcytor17 pueden ensayarse bajo diversos estímulos. Además, usando el microfisiómetro, se proporciona un procedimiento para identificar agonistas y antagonistas del receptor de citocina multimérico zcytor17, que comprende proporcionar células que expresen un receptor de citocina multimérico zcytor17, cultivar una primera parte de las células en ausencia de un compuesto de ensayo, cultivar una segunda parte de las células en presencia de un compuesto de ensayo y detectar un aumento o una disminución en una respuesta celular de la segunda parte de las células en comparación con la primera parte de las células. Usando este procedimiento, pueden identificarse rápidamente antagonistas y agonistas, incluyendo el ligando natural, para el receptor de citocina multimérico zcytor17.

Un receptor de citocina multimérico zcytor17 puede expresarse como una fusión con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, normalmente un fragmento F<sub>c</sub>, que contiene dos dominios de regiones constantes y carece de región variable. Los procedimientos para preparar tales fusiones se desvelan en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.155.027 y 5.567.584. Tales fusiones se segregan normalmente como moléculas multiméricas en las que las partes F<sub>c</sub> se enlazan entre sí por disulfuro y dos polipéptidos no Ig se disponen muy próximos entre sí. Las fusiones de este tipo pueden usarse, por ejemplo, para dimerización, aumento de estabilidad y semivida *in vivo*, para purificar el ligando por afinidad, como herramienta de ensayo *in vitro* o antagonista. Para su uso en ensayos, las quimeras se unen a un soporte mediante la región F<sub>c</sub> y se usan en un formato ELISA.

40 Ensayos adicionales descritos en el presente documento incluyen el uso de polipéptidos receptores híbridos. Estos polipéptidos híbridos se encuentran dentro de dos clases generales. Dentro de la primera clase, el dominio intracelular de zcytor17, que comprende aproximadamente los restos 544 (Lys) a 732 (Val) de la SEC ID Nº: 111, los restos 544 (Lys) a 649 (Ile) de la SEC ID Nº: 109, o los restos 557 (Lys) a 662 (Ile) de la SEC ID Nº: 5, o los restos 551 (Lys) a 662 (Cys) de la SEC ID Nº: 117 se une al dominio de unión a ligando de un segundo receptor. Se prefiere que el segundo receptor sea un receptor de citocina hematopoyético, tal como, por ejemplo, el receptor mpl (Souyri y col., Cell 63: 1137-1147, 1990). El receptor híbrido comprenderá adicionalmente un dominio transmembrana, que puede derivar de cualquier receptor. Una construcción de ADN que codifica el receptor híbrido se inserta después en una célula huésped. Las células que expresan el receptor híbrido se cultivan en presencia de un ligando para el dominio de unión y se someten a ensayan para detectar una respuesta. Este sistema proporciona un medio para analizar la transducción de señal mediada por zcytor17 usando al mismo tiempo ligandos fácilmente disponibles. Este sistema también puede usarse para determinar si líneas celulares particulares son capaces de responder a señales transducidas por zcytor17. Una segunda clase de polipéptidos receptores híbridos comprende el dominio extracelular (de unión a ligando) (aproximadamente los restos 20 (Ala) a 519 (Glu) de la SEC ID Nº: 111 y la SEC ID Nº: 109; aproximadamente los restos 33 (Ala) a 532 (Glu) de la SEC ID Nº: 5) o el dominio de unión a citocina de zcytor17 (aproximadamente los restos 20 (Ala) a 227 (Pro) de la SEC ID Nº: 111 y SEC ID Nº: 109; o aproximadamente los restos 33 (Ala) a 240 (Pro) de la SEC ID Nº: 5; aproximadamente los restos 46 (Val) a 533 (Glu) de la SEC ID Nº: 117; o aproximadamente los restos 46 (Val) a 533 (Trp) de la SEC ID Nº: 119) con un dominio citoplásmico de un segundo receptor, preferentemente un receptor de citocina y un dominio transmembrana. El dominio transmembrana puede derivar de cualquier receptor. Los receptores híbridos de esta segunda clase se expresan en células que se sabe que son capaces de responder a señales transducidas por el segundo receptor. Juntas, estas dos clases de receptores híbridos permiten el uso de un amplio espectro de tipos celulares dentro de los sistemas de ensayo basados en receptores.

65 La expresión de WSX-1 es la más fuerte en timo, bazo, PBL (linfocitos de sangre periférica) y ganglio linfático y también se observa una mayor expresión en linfocitos T activados. La distribución tisular para OSMRbeta se

describe como muy amplia. La distribución tisular de estos tres receptores sugiere que una diana para el zcytor17lig pronosticado consiste en células de linaje hematopoyético, en particular linfocitos T, monocitos/macrófagos y células progenitoras linfoides y células linfoides. Otras citocinas de cuatro hélices conocidas que actúan sobre las células linfoides incluyen IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15. Para una revisión de las citocinas de cuatro hélices, véanse Nicola y col.,  
 5 Advances in Protein Chemistry 52: 1-65, 1999 y Kelso, A., Immunol. Cell Biol. 76: 300-317, 1998.

Los medios acondicionados (MA) de células de sangre periférica humana estimuladas con PMA/Ionomicina seleccionadas para CD3+ soportaron el crecimiento de células BaF3 que expresaron el receptor zcytor17, el receptor OSMRbeta y WSX-1 y fueron dependientes de IL-3. Medios acondicionados de células que no fueron: 1)  
 10 estimuladas por PMA/Ionomicina; o que no fueron 2) seleccionadas para CD3 (con o sin estimulación con PMA/Ionomicina) no soportaron el crecimiento de células BaF3 que expresan células que expresan los receptores zcytor17, OSMRbeta y WSX-1 (BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta). Los experimentos de control demostraron que esta actividad proliferativa no fue atribuible a otros factores de crecimiento conocidos, y que la capacidad de dichos  
 15 medios acondicionados para estimular la proliferación de células que expresan los receptores zcytor17/WSX-1/OSMRbeta podría neutralizarse por una forma soluble del receptor zcytor17.

Los medios acondicionados de células seleccionadas para CD3+ activadas con PMA/Ionomicina también soportaron el crecimiento de células BaF3 que expresaron el receptor zcytor17 y el receptor OSMRbeta (zcytor17/OSMRbeta),  
 20 mientras que células BaF3 que expresan solamente el receptor zcytor17 y el receptor WSX-1 (zcytor17/WSX-1), o que contienen solamente el receptor OSMRbeta, no fueron estimuladas por estos medios acondicionados.

La proliferación de células BaF3 que expresan los receptores zcytor17/WSX-1/OSMRbeta expuestas a MA de células de sangre periférica humana estimuladas con PMA/Ionomicina seleccionadas para CD3+ se identificaron por  
 25 inspección visual de los cultivos y/o por ensayo de proliferación. En la técnica se conocen diversos ensayos de proliferación adecuados e incluyen ensayos para reducción de un tinte tal como AlamarBlue™ (AccuMed International, Inc. Westlake, Ohio), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983); 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-5-3-carboximetoxifenil-2H-tetrazolio; hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio; y cloruro de cianoditolil-tetrazolio (comercializados por Polysciences, Inc., Warrington, PA); ensayos de mitogénesis tal como la medición de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina;  
 30 ensayos de exclusión de tinte, que usan, por ejemplo, negro de naftaleno o azul de tripano; absorción de tinte usando diacetil fluoresceína y liberación de cromo. Véase, en general, Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3ª ed., Wiley-Liss, 1994.

Se preparó una genoteca de ADNc partir de células de sangre periférica humana primarias estimuladas con PMA e Ionomicina, seleccionadas para CD+3. La genoteca de ADNc de células de sangre periférica humana estimuladas  
 35 por PMA e Ionomicina, seleccionadas para CD3+ se dividió en grupos que contenían múltiples moléculas de ADNc y se transfectó a una línea celular huésped, por ejemplo, células BHK 570 (nº de acceso ATCC 10314). Las células huésped transfectadas se cultivaron en un medio que no contenía factores de crecimiento exógenos (por ejemplo FBS al 5 %) y se recogió medio acondicionado. Se ensayó la capacidad de los medios acondicionados de estimular la proliferación de células BaF3 transfectadas con los receptores zcytor17, WSX-1 y OSMRbeta. Se identificaron  
 40 conjuntos de ADNc que producían medio acondicionado que estimulaba células con receptores BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta. Este ADNc plasmídico combinado se electroporó en *E. coli*. El ADNc de colonias sencillas se aisló y se transfectó individualmente a células BHK 570. Se identificaron clones positivos mediante un resultado positivo del ensayo de proliferación de los receptores BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta y la actividad se confirmó por  
 45 neutralización de la proliferación, usando el receptor zcytor17 soluble.

En vista de la distribución tisular observada para el receptor de zcytor17, los agonistas (incluyendo el zcytor17lig natural/sustrato/cofactor/etc.) y/o antagonistas tienen un potencial enorme en ambas aplicaciones, *in vitro* e *in vivo*. Los compuestos identificados como agonistas de zcytor17lig son útiles para expansión, proliferación, activación,  
 50 diferenciación y/o inducción o inhibición de funciones celulares especializadas de las células implicadas en la homeostasis de hematopoyesis y función inmunitaria. Por ejemplo, el zcytor17lig y los compuestos agonistas son útiles como componentes de medios de cultivos celulares definido y pueden usarse en solitario o en combinación con otras citocinas y hormonas para reemplazar el suero comúnmente utilizado en cultivo de células. Los agonistas son, por tanto, útiles en promover específicamente el crecimiento y/o desarrollo de linfocitos T, linfocitos B,  
 55 monocitos/macrófagos, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos citotóxicos y otras células de los linajes linfoides y mieloides en cultivo.

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

Para purificar el ligando, también puede usarse una proteína de unión a zcytor17lig, tal como un receptor de citocina multimérico de la presente invención. El receptor de citocina multimérico se inmoviliza en un soporte sólido, tal como  
 65 esferas de agarosa, agarosa reticulada, vidrio, resinas celulósicas, resinas a base de sílice, poliestireno,

poliacrilamida reticulada o materiales similares que son estables en condiciones de uso. En la técnica se conocen procedimientos para unir polipéptidos a un soporte sólido e incluyen química de amina, activación de bromuro de cianógeno, activación de N-hidroxisuccinimida, activación de epóxido, activación de sulfhidrilo y activación de hidrazida. El medio resultante generalmente se configurará en forma de una columna y los fluidos que contienen el ligando se pasan a través de la columna una o más veces para permitir que el ligando se una al polipéptido receptor. Después el ligando se eluye usando cambios en la concentración salina, agentes caotrópicos (guanidina HCl) o pH para modificar la unión ligando - receptor.

Ventajosamente, puede emplearse un sistema de ensayo que use un receptor de unión al ligando (o un anticuerpo, un miembro de un par de complemento/anticomplemento) o su fragmento de unión, y un instrumento biodetector que puede obtenerse en el mercado (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Tal receptor, anticuerpo, miembro de un par de complemento/anticomplemento o fragmento se movilizan sobre la superficie de una microplaca receptora. El uso de este instrumento lo desvelan Karlsson, J. *Immunol. Methods* 145: 229-40 (1991) y Cunningham y Wells, J. *Mol. Biol.* 234: 554-63 (1993). Un receptor, anticuerpo, miembro o fragmento se fija covalentemente, usando química de amina o sulfhidrilo, a fibras de dextrano que se fijan a una película de oro dentro del flujo celular. Una muestra de ensayo se pasa a través de la célula. Si un ligando, epítipo o miembro opuesto del par de complemento/anticomplemento está presente en la muestra, se unirá al receptor, anticuerpo o miembro inmovilizado, respectivamente, produciendo un cambio en el índice de refracción del medio, que se detecta como un cambio en la resonancia de plasmón superficial de la película de oro. Este sistema permite la determinación de índices a intervalos, a partir de los cuales puede calcularse la afinidad de unión y evaluar la estequiometría de unión. Como alternativa, la unión ligando/receptor puede analizarse usando tecnología SELDI (TM) (Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA).

Los polipéptidos receptores de la unión al ligando también pueden usarse dentro de otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica. Dichos sistemas incluyen el análisis Scatchard para la determinación de afinidad de unión (véase Scatchard, *Ann. NY Acad Sci.* 51: 660-72 (1949)) y ensayos calorimétricos (Cunningham y col., *Science* 253: 545-48 (1991); y Cunningham y col., *Science* 245: 821-25 (1991)).

La presente invención también proporciona un anticuerpo (como se define en las reivindicaciones) que se une específicamente a un polipéptido o al menos a una parte de un receptor de citocina multimérico como se describe en el presente documento.

Los receptores de citocina multiméricos zcytor17 también pueden usarse para preparar anticuerpos que se unen a los epítopos, péptidos o polipéptidos de los mismos. El receptor de citocina multimérico o un fragmento del mismo sirven como antígeno (inmunógeno) para inocular un animal y provocar una respuesta inmunitaria. Un experto en la materia reconocería que los polipéptidos antigénicos, portadores de epítopos pueden contener una secuencia de al menos 6, preferentemente al menos 9, y más preferentemente al menos de 15 a aproximadamente 30 restos de aminoácidos contiguos de un polipéptido (o polipéptidos) del receptor de citocina multimérico, tal como zcytor17 (SEC ID N°: 111), OSMRbeta (SEC ID N°: 7) y/o WSX-1 (SEC ID N°: 9). Se incluyen los polipéptidos que comprenden una parte más grande de un receptor de citocina multimérico, es decir de 30 a 100 restos hasta la longitud total de la secuencia de aminoácidos. Los antígenos o epítopos inmunogénicos también pueden incluir marcadores adheridos, adyuvantes, transportadores y vehículos como se describe en el presente documento.

Pueden aislarse anticuerpos de una respuesta inmunitaria generados por inoculación de un animal con estos antígenos y purificarse como se describe en el presente documento. Los procedimientos para preparar y aislar anticuerpos policlonales y monoclonales se conocen bien en la materia. Véase, por ejemplo *Current Protocols in Immunology*, Cooligan, y col. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Hurrell, J. G. R., Ed., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982.

Como será evidente para un experto habitual en la materia, los anticuerpos policlonales pueden generarse a partir de la inoculación de diversos animales de sangre caliente tal como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas con un receptor de citocina multimérico o un fragmento del mismo. La inmunogenicidad de un receptor de citocina multimérico se puede aumentar usando un adyuvante, tal como alumbre (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los receptores de citocina multiméricos útiles para la inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tal como fusiones de zcytor17, OSMRbeta, y/o WSX-1, o una parte de los mismos con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El inmunógeno del polipéptido puede ser una molécula de longitud completa o una parte de la misma. Si la parte del polipéptido es "de tipo hapteno" tal parte puede estar ventajosamente unida o conectada a un vehículo macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (ASB) o toxoide tetánico) para inmunización.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados, anticuerpos monoclonales, y fragmentos de unión a antígeno, tales como fragmentos proteolíticos F(ab')<sub>2</sub> y Fab. Los fragmentos o anticuerpos intactos modificados mediante ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos, fragmentos Fv, anticuerpos de cadena sencilla y similares, así como polipéptidos y péptidos de unión a antígeno sintéticos, están también incluidos. Los anticuerpos no humanos pueden

humanizarse mediante injerto de CDR no humanas en regiones constantes y de entramado humanas, o mediante la incorporación de los dominios variables no humanos completos (opcionalmente "encubriéndolos" con una superficie de tipo humano mediante sustitución de residuos expuestos, siendo el resultado un anticuerpo "chapado"). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden conservar residuos no humanos dentro de los dominios de entramado de la región variable humana para mejorar las características de unión apropiadas. A través de anticuerpos de humanización puede aumentarse la vida media biológica, y se reduce el potencial de reacciones inmunitarias adversas tras la administración a seres humanos. Además, pueden producirse anticuerpos humanos en animales transgénicos no humanos que se han modificado mediante ingeniería genética para contener genes de inmunoglobulina humanos tal como se da a conocer en la publicación WIPO WO 98/24893. Se prefiere que los genes de inmunoglobulina endógenos en estos animales estén inactivados o se eliminan, tal como mediante recombinación homóloga.

Se considera que los anticuerpos son de unión específica si: 1) muestran un nivel umbral de actividad de unión, y 2) no experimentan reacción cruzada significativa con moléculas de polipéptido relacionadas. Un nivel umbral de unión se determina si los anticuerpos anti-receptor de citocina multimérico en este caso se unen a un receptor de citocina multimérico, péptido o epítipo con una afinidad al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión a proteína control (receptor de citocina no multimérico). Se prefiere que los anticuerpos muestren una afinidad de unión ( $K_a$ ) de  $10^6 M^{-1}$  o mayor, preferentemente  $10^7 M^{-1}$  o mayor, más preferentemente  $10^8 M^{-1}$  o mayor, y de la manera más preferente  $10^9 M^{-1}$  o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarse fácilmente por un experto común en la técnica, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672 (1949)).

Si se muestra que los anticuerpos anti-receptor de citocina multimérico no experimentan reacción cruzada significativa con moléculas de polipéptido relacionadas, por ejemplo, mediante el anticuerpo que detecta el receptor de citocina multimérico zcytor17 pero no polipéptidos relacionados conocidos usando un análisis de inmunotransferencia de tipo Western convencional (Ausubel y col., *ibidem*). Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos son aquéllos dados a conocer en la técnica anterior, tal como ortólogos y parálogos conocidos, y miembros conocidos similares de una familia de proteínas. La selección puede realizarse también usando receptor de citocina multimérico no humano, y polipéptidos mutantes de receptor de citocina multimérico. Además, los anticuerpos pueden "seleccionarse frente a" polipéptidos relacionados conocidos, para aislar una población que se une específicamente al receptor de citocina multimérico. Por ejemplo, los anticuerpos generados frente a receptor de citocina multimérico se adsorben a polipéptidos relacionados adheridos a la matriz insoluble; los anticuerpos específicos frente a receptor de citocina multimérico fluirán a través de la matriz en las condiciones de tampón apropiadas. La selección permite el aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales que no experimentan reacción cruzada con polipéptidos estrechamente relacionados conocidos (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, y col. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995). La selección y el aislamiento de anticuerpos específicos se conocen bien en la técnica. Véase, Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff y col., Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin y col., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984. La unión específica de anticuerpos anti-receptor de citocina multimérico puede detectarse mediante varios métodos en la técnica, y que se dan a conocer a continuación.

Pueden usarse varios ensayos conocidos por los expertos en la técnica para detectar anticuerpos que se unen a polipéptidos o proteínas de receptor de citocina multimérico. Ensayos a modo de ejemplo se describen en detalle en Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de tales ensayos incluyen: inmunoelectroforesis concurrente, radioinmunoanálisis, radioinmuno-precipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia puntual o ensayo de inmunotransferencia de tipo Western, ensayo de inhibición o de competición, y ensayo de tipo sándwich. Además, los anticuerpos pueden seleccionarse para unirse a polipéptido o proteína de receptor de citocina multimérico de tipo natural frente a mutante.

Dentro de otro aspecto la presente memoria descriptiva describe un anticuerpo producido mediante el procedimiento tal como se describió anteriormente, en el que el anticuerpo se une a al menos una parte de un receptor de citocina multimérico que comprende al menos una parte de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, o SEC ID N°: 5. En una realización, el anticuerpo dado a conocer anteriormente se une específicamente a un polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, o SEC ID N°: 5. En otra realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

Los anticuerpos frente a receptor de citocina multimérico pueden usarse para etiquetar células que expresan receptor de citocina multimérico; para aislar receptor de citocina multimérico mediante purificación por afinidad; para ensayos de diagnóstico para determinar los niveles en circulación de receptor de citocina multimérico; para detectar o cuantificar el receptor de citocina multimérico soluble como marcador de la patología o enfermedad subyacente; en procedimientos analíticos que emplean FACS; para seleccionar bibliotecas de expresión; para generar anticuerpos anti-idiotípicos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear la actividad de receptor de citocina multimérico *in vitro* y *in vivo*. Las etiquetas o marcas directas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas

magnéticas y similares; las etiquetas o marcas indirectas pueden caracterizarse por el uso de biotina-avidina u otras parejas de complemento/anti-complemento como intermedios. Los anticuerpos en el presente documento pueden conjugarse también directa o indirectamente para dar fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y usarse estos conjugados para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico *in vivo*. Además, los anticuerpos frente a receptor de citocina multimérico o fragmentos del mismo pueden usarse *in vitro* para detectar receptor de citocina multimérico desnaturalizado o fragmentos del mismo en ensayos, por ejemplo, inmunotransferencias de tipo Western u otros ensayos conocidos en la técnica.

Las moléculas detectables adecuadas pueden unirse directa o indirectamente al receptor de citocina multimérico o anticuerpo, e incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas pueden unirse directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo, e incluyen toxinas bacterianas o vegetales (por ejemplo, toxina diftérica, saporina, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y similares), así como radionúclidos terapéuticos, tales como yodo-131, renio-188 o itrio-90 (o bien directamente unidos al polipéptido o anticuerpo, o bien indirectamente unidos a través de un resto de quelación, por ejemplo). Los receptores de citocina multiméricos o anticuerpos pueden conjugarse también con fármacos citotóxicos, tales como adriamicina. Para la unión indirecta de una molécula detectable o citotóxica, la molécula detectable o citotóxica puede conjugarse con un miembro de una pareja complementario/anti-complementario, en la que el otro miembro se une a la parte de polipéptido o de anticuerpo. Para estos fines, biotina/estreptavidina es una pareja complementario/anti-complementario a modo de ejemplo.

Un receptor de citocina multimérico soluble puede actuar también como "antagonistas" de zcytor17lig para bloquear la unión a zcytor17lig y la transducción de señales *in vitro* e *in vivo*. Estas proteínas de anti-unión a zcytor17lig serían útiles para inhibir la actividad de zcytor17lig o la unión a proteína.

Las proteínas de fusión de polipéptido-toxina o proteínas de fusión de anticuerpo-toxina pueden usarse para la ablación o inhibición de tejido o células seleccionados como diana (por ejemplo, para tratar tejidos o células cancerosos). Como alternativa, si el polipéptido tiene múltiples dominios funcionales (es decir, un dominio de activación o un dominio de unión a receptor, más un dominio de selección como diana), una proteína de fusión que incluye sólo el dominio de selección como diana puede ser adecuada para dirigir una molécula detectable, una molécula citotóxica o una molécula complementaria a un tipo de célula o de tejido de interés. En los casos en los que el dominio sólo proteína de fusión incluye una molécula complementaria, la molécula anti-complementaria puede conjugarse con una molécula citotóxica o detectable. Tales proteínas de fusión de dominio-molécula complementaria representan por tanto un vehículo de selección como diana genérico para el suministro específico de célula/tejido de conjugados de molécula anti-complementaria-detectable/citotóxica genéricos.

Además, la inflamación es una respuesta protectora por un organismo para defenderse de un agente invasor. La inflamación es un acontecimiento en cascada que implica muchos mediadores celulares y humorales. Por un lado, la supresión de respuestas inflamatorias puede dejar a un huésped inmunocomprometido; sin embargo, si se deja sin comprobar, la inflamación puede llevar a complicaciones graves incluyendo enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino y similares), choque septicémico y fallo multiorgánico. Es importante destacar que estos diversos estados patológicos comparten mediadores inflamatorios comunes. Las enfermedades colectivas que se caracterizan por inflamación tienen un gran impacto en la morbimortalidad. Por lo tanto es evidente que los anticuerpos anti-inflamatorios y polipéptidos de unión, tales como los anticuerpos anti-zcytor17lig y polipéptidos de unión descritos en el presente documento, podrían tener un potencial terapéutico crucial para un enorme número de enfermedades humanas y animales, desde el asma y la alergia hasta la autoinmunidad y choque septicémico. Como tal, el uso de anticuerpos anti-zcytor17lig anti-inflamatorios y polipéptidos de unión descritos en el presente documento puede usarse terapéuticamente como antagonistas de zcytor17lig descritos en el presente documento, en particular en enfermedades tales como artritis, endotoxemia, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, enfermedad relacionada y similares.

### 1. Artritis

La artritis, incluyendo la osteoartritis, artritis reumatoide, articulaciones artríticas como resultado de una lesión, y similares, son estados inflamatorios comunes que se beneficiarían del uso terapéutico de anticuerpos anti-inflamatorios y polipéptidos de unión, tales como anticuerpos anti-zcytor17lig y polipéptidos de unión de la presente invención. Por ejemplo, la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica que afecta a todo el organismo y es una de las formas más comunes de artritis. Se caracteriza por la inflamación de la membrana que reviste la articulación, que provoca dolor, rigidez, calor, rojez y sudoración. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir hueso y cartílago. Como resultado de la artritis reumatoide, el revestimiento de la articulación, el sinovio, puede invadir y dañar el hueso y cartílago llevando al deterioro de la articulación y a dolor grave entre otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su forma y alineación, dando como resultado dolor y pérdida de movimiento.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad mediada por el sistema inmunitario que se caracteriza en particular por inflamación y posterior daño tisular llevando a una invalidez grave y a un aumento de mortalidad. Varias

citocinas se producen localmente en las articulaciones reumatoideas. Numerosos estudios han demostrado que EL-1 y TNF-alfa, dos citocinas pro-inflamatorias prototípicas, desempeñan un papel importante en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la destrucción articular progresiva. De hecho, la administración de inhibidores de TNF-alfa e IL-1 en pacientes con AR ha llevado a una drástica mejora de los signos clínicos y biológicos de la inflamación y a una reducción de los signos radiológicos de erosión ósea y destrucción de cartílago. Sin embargo, a pesar de estos resultados alentadores, un porcentaje significativo de pacientes no responden a estos agentes, lo que sugiere que otros mediadores están también implicados en la fisiopatología de la de artritis (Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2): 135-149, 2002). Uno de esos mediadores podría ser zcytor17lig, y como tal una molécula que se une a o que inhibe zcytor17lig, tal como anticuerpos anti-zcytor17lig o componentes de unión, podría servir como un agente terapéutico valioso para reducir la inflamación en la artritis reumatoide, y otras enfermedades artríticas.

Existen varios modelos animales para la artritis reumatoide conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica que se asemeja estrechamente a la artritis reumatoide humana. Puesto que la CIA comparte características inmunológicas y patológicas similares con la AR, esto la hace un modelo ideal para seleccionar posibles compuestos anti-inflamatorios humanos. El modelo de CIA es un modelo muy conocido en ratones que depende tanto de una respuesta inmunitaria como de una respuesta inflamatoria, para producirse. La respuesta inmunitaria comprende la interacción de células B y células T CD4+ en respuesta al colágeno, que se da como antígeno, y lleva a la producción de anticuerpos anti-colágeno. La fase inflamatoria es el resultado de respuestas tisulares de mediadores de inflamación, como consecuencia de que algunos de estos anticuerpos experimentan reacción cruzada con el colágeno nativo del ratón y activa la cascada del complemento. Una ventaja de usar el modelo de CIA es que se conocen los mecanismos básicos de la patogenia. Los epítomos de células T y de células B relevantes en el colágeno de tipo II se han identificado, y se han determinados varios parámetros inmunológicos (por ejemplo, hipersensibilidad de tipo retardado y anticuerpo anti-colágeno) e inflamatorios (por ejemplo, citocinas, quimiocinas, y enzimas de degradación de la matriz) relacionados con la artritis mediada por el sistema inmunitario, y por lo tanto pueden usarse para evaluar la eficacia de compuestos de prueba en el modelo de CIA (Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3:407-20, 1999; Williams y col., Immunol. 89:9784-788, 1992; Myers y col., Life Sci. 61:1861-78, 1997; y Wang y col., Immunol. 92:8955-959, 1995).

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

## 2. Endotoxemia

La endotoxemia es un estado grave que resulta comúnmente de agentes infecciosos tales como bacterias y otros agentes patológicos infecciosos, septicemia, síndrome de choque tóxico, o en pacientes inmunocomprometidos sometidos a infecciones oportunistas, y similares. La utilidad terapéutica de anticuerpos anti-inflamatorios y polipéptidos de unión, tales como anticuerpos anti-zcytor17lig y polipéptidos de unión de la presente invención, podría ayudar a prevenir y tratar la endotoxemia en seres humanos y animales. Otros posibles agentes terapéuticos incluyen polipéptidos zcytor17, polipéptidos de receptor heterodimérico y multimérico soluble, o anticuerpos anti-zcytor17lig o componentes de unión de la presente invención, y similares, podrían servir como un agente terapéutico valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos en la endotoxemia.

La endotoxemia inducida por lipopolisacárido (LPS) emplea muchos de los mediadores pro-inflamatorios que producen efectos patológicos en las enfermedades infecciosas y endotoxemia inducida por LPS en roedores es un modelo ampliamente usado y aceptable para estudiar los efectos farmacológicos de posibles agentes pro-inflamatorios o inmunomoduladores. El LPS, producido en bacterias Gram negativas, es un agente causante principal en la patogenia del choque septicémico (Glausner y col., Lancet 338:732, 1991). De hecho, un estado de tipo choque puede inducirse experimentalmente mediante una única inyección de LPS en animales. Las moléculas producidas por células que responden a LPS pueden seleccionar como diana patógenos directa o indirectamente. Aunque estas respuestas biológicas protegen al huésped contra patógenos invasores, también pueden causarles daño. Por lo tanto, la estimulación masiva de la inmunidad innata, que se produce como resultado de infección por bacterias Gram negativas grave, lleva a la producción en exceso de citocinas y otras moléculas, y el desarrollo de un síndrome mortal, síndrome de choque septicémico, que se caracteriza por fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada, y fallo mutliorgánico (Dumitru y col. Cell 103:1071-1083, 2000).

Estos efectos tóxicos de LPS están en su mayor parte relacionados con la activación de macrófagos llevando a la liberación de múltiples mediadores inflamatorios. Entre estos mediadores, TNF parece desempeñar un papel crucial, tal como se indica por la prevención de toxicidad de LPS mediante la administración de anticuerpos anti-TNF neutralizantes (Beutler y col., Science 229:869, 1985). Está bien establecido que llevar la inyección de LPS de *E. coli* en un ratón C57B1/6 dará como resultado aumentos significativos en IL-6, TNF-alfa, EL-1 en circulación, y proteínas de fase aguda (por ejemplo, SAA) aproximadamente 2 horas tras la inyección. La toxicidad de LPS parece estar mediada por estas citocinas como inmunización contra estos mediadores puede dar como resultado una disminución de la mortalidad (Beutler y col., Science 229:869, 1985). Las posibles estrategias de inmunointervención para la prevención y/o el tratamiento de choque septicémico incluyen AcM anti-TNF, antagonista de receptor de IL-1, LIF, IL-10, y G-CSF. Puesto que LPS induce la producción de factores pro-inflamatorios que posiblemente contribuyen a la patología de la endotoxemia, la neutralización de la actividad de zcytor17lig, SAA u otros factores pro-inflamatorios mediante el polipéptido zcytor17lig de antagonismo pueden usarse para reducir los síntomas de endotoxemia, tal como se observa en choque endotóxico. Otros posibles agentes terapéuticos incluyen polipéptidos zcytor17, polipéptidos de receptor heterodimérico y multimérico soluble, o anticuerpos anti-zcytor17lig o componentes de unión de la presente invención, y similares.

### 3 Enfermedad inflamatoria del intestino. EII

En los Estados Unidos aproximadamente 500.000 personas padecen la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) que puede afectar o bien al colon o bien al recto (colitis ulcerosa) o a ambos, intestino delgado e intestino grueso (enfermedad de Crohn). La patogenia de estas enfermedades no está clara, pero implican inflamación crónica de los tejidos afectados. Los posibles agentes terapéuticos incluyen polipéptidos zcytor17, polipéptidos de receptor heterodimérico y multimérico soluble, o anticuerpos anti-zcytor17lig o componentes de unión de la presente invención, y similares, podrían servir como un agente terapéutico valioso para reducir la inflamación y efectos patológicos en EII y enfermedades relacionadas.

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, denominado comúnmente el colon, caracterizada por la inflamación y ulceración de la mucosa o el revestimiento más interno del colon. Esta inflamación provoca que el colon se vacíe con frecuencia, dando como resultado diarrea. Los síntomas incluyen pérdida de consistencia de las heces y calambres abdominales asociados, fiebre y pérdida de peso. Aunque se desconoce la causa exacta de la CU, una investigación reciente sugiere que las defensas naturales del organismo están funcionando contra proteínas en el organismo que el organismo cree extrañas (una "reacción autoinmunitaria"). Quizás debido a que parecen proteínas bacterianas en el intestino, estas proteínas pueden o bien instigar o bien estimular el proceso inflamatorio que empieza a destruir el revestimiento del colon. A medida que se destruye el revestimiento del colon, se forman úlceras que liberan moco, pus y sangre. La enfermedad comienza habitualmente en la zona del recto y puede extenderse finalmente por todo el intestino grueso. Episodios repetidos de inflamación llevan al engrosamiento de la pared del intestino y el recto con tejido cicatricial. La muerte de tejido del colon o septicemia pueden producirse con enfermedad grave. Los síntomas de colitis ulcerosa varían en gravedad y su aparición puede ser gradual o repentina. Pueden provocarse ataques por muchos factores, incluyendo infecciones respiratorias o estrés.

Aunque actualmente no existe ninguna cura disponible para la CU, los tratamientos se centran en suprimir el proceso inflamatorio anómalo del revestimiento del colon. Los tratamientos que incluyen corticosteroides inmunosupresores (por ejemplo azatioprina, mercaptopurina, y metotrexato) y aminosalicilatos se encuentran disponibles para tratar la enfermedad. Sin embargo, el uso a largo plazo de inmunosupresores tales como corticosteroides y azatioprina puede dar como resultado efectos secundarios graves incluyendo adelgazamiento de huesos, cataratas, infección, y efectos hepáticos y de la médula ósea. En los pacientes en los que las terapias actuales no son satisfactorias, la cirugía es una opción. La cirugía implica la extirpación de todo el colon y el recto.

Existen varios modelos animales que pueden imitar parcialmente la colitis ulcerosa crónica. El modelo más ampliamente usado es el modelo de colitis inducido por ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico/etanol (TNBS), que induce inflamación crónica y ulceración en el colon. Cuando TNBS se introduce en el colon de ratones sensibles a través de instilación por vía intra-rectal, induce la respuesta inmunitaria mediada por células T en la mucosa del colon, llevando en este caso a una inflamación de la mucosa masiva caracterizada por la infiltración densa de células T y macrófagos a lo largo de toda la pared del intestino grueso. Además, este cuadro histopatológico va acompañado del cuadro clínico de pérdida de peso progresiva (eliminación), diarrea sangrante, prolapso rectal, y engrosamiento de la pared del intestino grueso (Neurath y col. Intern. Rev. Immunol. 19:51-62, 2000).

Otro modelo de colitis usa sulfato de dextrano sódico (DSS), que induce una colitis aguda que se manifiesta por diarrea sangrante, pérdida de peso, acortamiento del colon y ulceración de la mucosa con infiltración de neutrófilos. La colitis inducida por DSS se caracteriza histológicamente por la infiltración de células inflamatorias en la lámina propia, con hiperplasia linfoide, daño de cripta focal, y úlcera epitelial. Se cree que estos cambios se desarrollan debido a un efecto tóxico de DSS sobre el epitelio y mediante fagocitosis de células de lámina propia y producción de TNF-alfa e IFN-gamma. A pesar de su uso común, quedan por resolver varias cuestiones con respecto a los mecanismos de DSS sobre la relevancia para la enfermedad humana. DSS se considera un modelo independiente de células T debido a que se observa en animales deficientes en células T tales como SCID.



La administración de anticuerpos anti-zcytor17lig o componentes de unión, polipéptidos que comprenden zcytor17 solubles (incluyendo receptores heterodiméricos y multiméricos), tales como zcytor17-Fc4 u otras proteínas de fusión y solubles de zcytor17 a estos modelos de TNBS o DSS puede usarse para evaluar el uso de antagonistas de zcytor17lig para mejorar síntomas y alterar el transcurso de enfermedad gastrointestinal. zcytor17lig puede desempeñar un papel en la respuesta inflamatoria en la colitis, y la neutralización de la actividad de zcytor17lig mediante la administración de antagonistas de zcytor17lig es un posible enfoque terapéutico para la EII. Otros posibles agentes terapéuticos incluyen polipéptidos zcytor17, polipéptidos de receptor heterodimérico y multimérico soluble, o anticuerpos anti-zcytor17lig o componentes de unión de la presente invención, y similares.

#### 10 4. Psoriasis

La psoriasis es un estado crónico de la piel que afecta a más de siete millones de americanos. La psoriasis se produce cuando nuevas células dérmicas crecen de manera anómala, dando como resultado parches inflamados, hinchados y escamosos de piel en los que la vieja piel no se ha mudado suficientemente rápido. La psoriasis en placas, la forma más común, se caracteriza por parches inflamados de piel ("lesiones") coronados con escamas de color blanco plateado. La psoriasis puede limitarse a unas pocas placas o implicar zonas de moderadas a extensas de piel, apareciendo más comúnmente en el cuero cabelludo, rodillas, codos y tronco. Aunque es sumamente visible, la psoriasis no es una enfermedad contagiosa. La patogenia de las enfermedades implica inflamación crónica de los tejidos afectados. Los polipéptidos zcytor17, polipéptidos de receptor heterodimérico y multimérico soluble, o anticuerpos anti-zcytor17lig o componentes de unión de la presente invención, y similares, podrían servir como un agente terapéuticos valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos en psoriasis, otras enfermedades inflamatoria de la piel y alergias de la piel y de la mucosa, y enfermedades relacionadas.

La psoriasis es un trastorno inflamatorio mediado por células T de la piel que puede provocar una incomodidad considerable. Es una enfermedad para la que no existe ninguna cura y afecta a personas de todas las edades. La psoriasis afecta aproximadamente al dos por ciento de las poblaciones de Europa y de América del Norte. Aunque individuos con psoriasis leve pueden controlar con frecuencia su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes en todo el mundo requieren terapia inmunosupresora sistema o ultravioleta. Desafortunadamente, la inconveniencia y los riesgos de la radiación ultravioleta y las toxicidades de muchas terapias limitan su uso a largo plazo. Además, los pacientes tienen habitualmente reaparición de psoriasis, y en algunos casos rebote, poco después de detener la terapia inmunosupresora.

La diferenciación es un proceso progresivo y dinámico, que comienza con células madre pluripotentes y que acaba con células diferenciadas de manera terminal. Las células madre pluripotentes que pueden regenerarse sin compromiso a un linaje expresan un conjunto de marcadores de diferenciación que se pierden cuando se realiza compromiso a un linaje celular. Las células progenitoras expresan un conjunto de marcadores de diferenciación que pueden o no seguir expresándose a medida que las células avanzan hacia abajo en la ruta del linaje celular hacia la maduración. Los marcadores de diferenciación que se expresan exclusivamente por células maduras son habitualmente propiedades funcionales tales como productos celulares, enzimas para producir productos celulares, y receptores. La fase de diferenciación de la población celular se monitoriza mediante la identificación de marcadores presentes en la población celular.

Existen pruebas que sugieren que factores que estimulan tipos de células específicos hasta una ruta hacia la diferenciación terminal o desdiferenciación afecta a toda la población celular que se origina a partir de un precursor común o célula madre.

Un receptor de citocina multimérico de la presente invención puede ser útil para estimular la proliferación, activación, diferenciación y/o inducción o inhibición de la función celular especializada de células de la homeostasis implicada de la hematopoyesis y función inmunitaria. En particular, los receptores de citocina multiméricos tal como se describen en el presente documento son útiles para estimular la proliferación, activación, diferenciación, inducción o inhibición de funciones celulares especializadas de células de los linajes hematopoyéticos, incluyendo, pero sin limitarse a, células T, células B, monocitos/macrófagos, células NK, neutrófilos, células endoteliales, fibroblastos, eosinófilos, condrocitos, mastocitos, células de Langerhan, monocitos, y macrófagos, así como células epiteliales. Las células epiteliales incluyen, por ejemplo, ameloblastos, células principales, cromatóforos, células enterocromafines, células de tipo enterocromafines, células en copa, células granulosa, queratinocitos, células dendríticas, células de soporte del laberinto, melanocitos, células de Merkel, células de Paneth, células parietales, células de Sertoli, y similares.

La presente invención proporciona también un procedimiento *in vitro* para reducir las células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas de un mamífero. El procedimiento incluye cultivar células de médula ósea o células de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad eficaz de un receptor de citocina multimérico soluble (como se define en las reivindicaciones) para producir una disminución en el número de células linfoides en las células de médula ósea o de sangre periférica en comparación con las células de médula ósea o células de sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor de citocina multimérico. Las células hematopoyéticas y los progenitores de células hematopoyéticas pueden ser células linfoides, tales como células monocíticas, macrófagos, o células T.

La presente memoria descriptiva describe un procedimiento de inhibición de una respuesta inmunitaria en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno. El procedimiento incluye (a) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno presente en el mamífero; (b) administrar una composición que comprende un receptor de citocina multimérico soluble en un vehículo farmacéutico aceptable; (c) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno en el mamífero; y (d) comparar el nivel del antígeno o patógeno en la etapa (a) con el nivel de antígeno o de patógeno en la etapa (c), siendo un cambio en el nivel indicativo de la inhibición de una respuesta inmunitaria. El procedimiento puede incluir además (e) readministrar una composición que comprende un receptor de citocina multimérico en un vehículo farmacéutico aceptable; (f) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno en el mamífero; y (g) comparar el número del nivel de antígeno o de patógeno en la etapa (a) con el nivel de antígeno en la etapa (f), siendo un cambio en el nivel indicativo de la inhibición de una respuesta inmunitaria.

Como alternativa, el procedimiento puede incluir (a) determinar un nivel de un anticuerpo específico de antígeno o de patógeno; (b) administrar una composición que comprende un receptor de citocina multimérico soluble en un vehículo farmacéutico aceptable; (c) determinar un nivel tras la administración de anticuerpo específico de antígeno o de patógeno; (d) comparar el nivel de anticuerpo en la etapa (a) con el nivel de anticuerpo en la etapa (c), siendo una disminución en el nivel de anticuerpos indicativo de la inhibición de una respuesta inmunitaria.

zcytor17lig se aisló a partir de tejido que se sabe que tiene una función inmunológica importante y que contiene células que desempeñan un papel en el sistema inmunitario. zcytor17lig se expresa en células de sangre periférica activadas, seleccionadas CDS3+, y se ha mostrado que la expresión de zcytor17lig aumenta tras la activación de células T. Además, los resultados de experimentos descritos en la sección de ejemplos en el presente documento sugieren que un receptor de citocina multimérico de la presente invención puede tener un efecto sobre el crecimiento/expansión de monocitos/macrófagos, células T, células B, células NK y/o el estado diferenciado de monocitos/macrófagos, células T, células B, células NK o progenitores de estas células. Los factores que tanto estimulan la proliferación de progenitores hematopoyéticos como activan células maduras se conocen en general, sin embargo, la proliferación y la activación también pueden requerir factores de crecimiento adicionales. Por ejemplo, se ha mostrado que IL-7 y factor Steel (ligando c-kit) se requerían para la formación de colonias de progenitores de NK. IL-15 más IL-2 en combinación con IL-7 y factor Steel era más eficaz (Mrózek y col., Blood 87:2632-2640, 1996). Sin embargo, pueden ser necesarias citocinas no identificadas para la proliferación de subconjuntos específicos de células NK y/o progenitores de NK (Robertson y col., Blood 76:2451-2438, 1990). De manera similar, zcytor17lig puede actuar solo o en conjunto o sinergia con otras citocinas para potenciar el crecimiento, la expansión de proliferación y modificación de diferenciación de monocitos/macrófagos, células T, células B o células NK.

Los ensayos que miden la diferenciación incluyen, por ejemplo, la medición de marcadores celulares asociados con la expresión específica de fase de un tejido, actividad enzimática, actividad funcional o cambios morfológicos (Watt, FASEB, 5:281-284 (1991); Francis, Differentiation 57:63-75 (1994); y Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171 (1989)). Como alternativa, el propio polipéptido zcytor17lig puede servir como un marcador secretado o de superficie celular adicional asociado con la expresión específica de fase de un tejido. Como tal, la medición directa de polipéptido zcytor17lig, o su pérdida de expresión en un tejido a medida que se diferencia, puede servir como marcador para la diferenciación de tejidos.

De manera similar, la medición directa de polipéptido zcytor17lig, o su pérdida de expresión en un tejido puede determinarse en un tejido o en células a medida que experimentan progresión tumoral. Los aumentos en la invasividad y motilidad de las células, o la ganancia o pérdida de expresión de zcytor17lig en un estado precanceroso o canceroso, en comparación con tejido normal, pueden servir como diagnóstico para la transformación, invasión y metástasis en progresión tumoral. Como tal, el conocimiento de la fase de progresión de un tumor o metástasis ayudará al médico a elegir la terapia más apropiada, o la agresividad del tratamiento, para un paciente con cáncer individual dado. Los procedimientos de medición de la ganancia y pérdida de expresión (o bien de ARNm o bien proteína) se conocen bien en la técnica y se describen en el presente documento y pueden aplicarse a la expresión de zcytor17lig. Por ejemplo, la aparición o desaparición de polipéptidos que regulan la motilidad celular puede usarse para ayudar al diagnóstico y el pronóstico del cáncer de próstata (Banyard, J. y Zetter, B.R., Cancer and Metast. Rev. 17:449-458, 1999). Como efector de la motilidad celular, ganancia o pérdida de expresión de zcytor17lig puede servir como diagnóstico para cánceres linfoides, de células B, epiteliales, hematopoyéticos y otros cánceres.

Además, la actividad y el efecto de zcytor17lig sobre la progresión tumoral y metástasis puede medirse *in vivo*. Se han desarrollado varios modelos de ratón singénicos para estudiar la influencia de polipéptidos, compuestos u otros tratamientos sobre la progresión tumoral. En estos modelos, células tumorales que se pasan en cultivo se implantan en ratones de la misma raza que el donante de tumor. Las células se desarrollarán dando tumores que tienen características similares en los ratones receptores, y se producirá metástasis en algunos de los modelos. Los modelos de tumor apropiados para nuestros estudios incluyen el carcinoma de pulmón de Lewis (ATCC N° CRL-1642) y melanoma B16 (ATCC N° CRL-6323), entre otros. Éstos dos son líneas tumorales comúnmente usadas, singénicas con respecto al ratón C57BL6/J, que se cultivan y se manipulan fácilmente *in vitro*. Los tumores que resultan de la implantación cualquiera de estas líneas celulares pueden experimentar metástasis en el pulmón en

ratones C57BL6/J. El modelo de carcinoma de pulmón de Lewis se ha usado recientemente en ratones para identificar un inhibidor de la angiogénesis (O'Reilly MS, y col. Cell 79: 315-328,1994). Los ratones C57BL6/J se tratan con un agente experimental o bien a través de inyección diaria de proteína recombinante, agonista o antagonista o una inyección en una vez de adenovirus recombinante. Tres días tras este tratamiento, se implantan de  $10^5$  a  $10^6$  células bajo la piel dorsal. Como alternativa, las células en sí pueden infectarse con adenovirus recombinante, tal como uno que expresa zcytor17lig, antes de la implantación de modo que la proteína se sintetiza en el sitio del tumor o de manera intracelular, en lugar de sistémicamente. Los ratones desarrollan normalmente tumores visibles en el plazo de 5 días. Los tumores se dejan crecer durante un periodo de hasta 3 semanas, tiempo durante el que pueden alcanzar un tamaño de 1500 - 1800 mm<sup>3</sup> en el grupo tratado con control. El tamaño tumoral y el peso corporal se monitorizan cuidadosamente a lo largo del experimento. En el momento del sacrificio, se retira el tumor se retira el tumor y se pesa junto con los pulmones y el hígado. Se ha mostrado que el peso del pulmón está bastante correlacionado con la carga tumoral metastásica. Como medida adicional se cuentan las metástasis de la superficie pulmonar. El tumor, pulmones e hígado resecaados se preparan para el examen histopatológico, inmunohistoquímica, e hibridación *in situ*, usando procedimientos conocidos en la técnica y que se describen en el presente documento. La influencia del polipéptido expresado en cuestión, por ejemplo, zcytor17lig, sobre la capacidad del tumor para reclutar vasculatura y experimentar metástasis puede evaluarse así. Además, aparte del uso de adenovirus, las células implantadas pueden transfectarse de manera transitoria con zcytor17lig. El uso de transfectantes de zcytor17lig estables así como el uso de promotores inducibles para activar la expresión de zcytor17lig *in vivo* se conocen en la técnica y pueden usarse en este sistema para evaluar la inducción de zcytor17lig de metástasis. Además, medios condicionados con zcytor17lig o zcytor17lig purificado pueden inyectarse directamente para este modelo de ratón, y por lo tanto pueden usarse en este sistema. Para referencia general véase, O'Reilly MS, y col. Cell 79:315-328, 1994; y Rusciano D, y col. Murine Models of Liver Mestastasis. Invasión Mestastasis 14:349-361, 1995.

Un receptor de citocina multimérico soluble de la presente invención o anticuerpos frente al mismo pueden ser útiles en el tratamiento de tumorigénesis, y por lo tanto serían útiles en el tratamiento del cáncer. zcytor17lig se expresa en células T activadas, monocitos y macrófagos, y está unido a una región del cromosoma humano en la que las translocaciones son comunes en las leucemias. Además, se muestra que zcytor17lig actúa a través de un receptor de citocina, receptor de citocina multimérico zcytor17, que se expresa también en células T activadas, monocitos y macrófagos. La sobreestimulación de células T activadas, monocitos y macrófagos mediante zcytor17lig podría dar como resultado un estado patológico humano tal como un cáncer de células inmunitarias. Como tal, la identificación de la expresión de zcytor17lig, polipéptidos (por ejemplo, mediante anticuerpos anti-zcytor17lig, receptores de citocina multiméricos solubles de zcytor17 (por ejemplo, receptor de zcytor17, heterodímeros (por ejemplo, zcytor17/OSMRbeta, zcytor17/WSX-1), multímeros (por ejemplo, zcytor17/OSMRbeta/WSX-1)), u otros componentes de unión de zcytor17lig) pueden servir como un diagnóstico, y pueden servir como actividad proliferativa de antagonistas de zcytor17lig. El ligando podría administrarse en combinación con otros agentes ya en uso incluyendo tanto agentes quimioterápicos convencionales así como moduladores inmunitarios tales como interferón alfa. Se ha mostrado que los interferones alfa/beta son eficaces en el tratamiento de algunas leucemias y modelos de enfermedad animal, y los efectos inhibidores del crecimiento de interferón-alfa y zcytor17lig pueden ser aditivos.

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

La presente invención proporciona la reducción de la proliferación de monocitos/macrófagos neoplásicos en un mamífero con una neoplasia de monocitos/macrófagos usando una cantidad de una composición que incluye un receptor de citocina multimérico soluble o anticuerpo frente al mismo suficiente para reducir la proliferación de los monocitos/macrófagos neoplásicos.

La presente invención proporciona la inhibición de la activación o diferenciación de monocitos/macrófagos. Los monocitos son células diferenciadas de manera incompleta que migran a diversos tejidos en los que maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria mediante la presentación de antígeno en linfocitos y desempeñan un papel de apoyo como células auxiliares para linfocitos secretando numerosas citocinas. Los macrófagos pueden internalizar moléculas extracelulares y tras la activación tienen una capacidad aumentada para destruir microorganismos intracelulares y células tumorales. Los macrófagos activados también están implicados en la estimulación de inflamación aguda o local.

En otro aspecto, la presente invención proporciona la reducción de la proliferación de células B o T neoplásicas que comprende administrar a un mamífero con una neoplasia de células B o T una cantidad de una composición que incluye un receptor de citocina multimérico soluble suficiente para reducir la proliferación de los monocitos/macrófagos neoplásicos. Además, el antagonista de zcytor17lig puede ser una proteína de fusión de ligando/toxina.

Una toxina de fusión de receptor de citocina multimérico de zcytor17-saporina puede emplearse contra un conjunto

similar de leucemias y linfomas, ampliando la gama de leucemias que pueden tratarse con un antagonista de citocina. Por ejemplo, tales leucemias pueden ser aquéllas que sobreexpresan receptores de zcytor17 (por ejemplo, receptor zcytor17, heterodímeros (por ejemplo, zcytor17/OSMRbeta, zcytor17/WSX-1), multímeros (por ejemplo, zcytor17/OSMRbeta/WSX)). La activación mediada por toxinas de fusión del receptor de zcytor17, heterodímeros o multímeros de receptor de zcytor17 (por ejemplo, zcytor17/OSMbeta, zcytor17/WSX-1 o zcytor17/WSX-1/OSMR) proporciona dos medios independientes para inhibir el crecimiento de las células dianas, siendo el primero idéntico a los efectos observados por el ligando solo, y debiéndose el segundo al suministro de la toxina a través de la internalización del receptor. El patrón de expresión restringido a monocitos y linfocitos del receptor de zcytor17 sugiere que el conjugado de ligando-saporina puede tolerarse por los pacientes.

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

El análisis de tipo Northern de receptor WSX-1 reveló transcritos en todos los tejidos examinados, con niveles aumentados de expresión en bazo humano, timo, ganglio linfático, médula ósea, y leucocitos de sangre periférica. También, los niveles de expresión de WSX-1 aumentaron tras la activación de células T.

Se notifica que la expresión de OSMR es muy amplia (Mosley y col., JBC 271:32635-32643, 1996). Esta distribución de receptores de zcytor17, WSX-1, y OSMRbeta apoya un papel para zcytor17lig en respuestas inmunitarias, especialmente la expansión de células T tras la activación o un papel en la rama de monocitos/macrófagos del sistema inmunitario.

Por lo tanto, realizaciones particulares de la presente invención se refieren al uso de un receptor de citocina multimérico soluble, como se define en las reivindicaciones, por ejemplo zcytor17/WSX-1/OSMR, y heterodímeros de zcytor17/OSMR, como antagonistas en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunitarias, como se definen en las reivindicaciones, tales como pancreatitis, diabetes de tipo I (DMID), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, cáncer de colon y cáncer intestinal, diverticulosis, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, trasplante de órganos o de médula ósea; inflamación debida a traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad de injerto contra huésped; y en las que inhibición de inflamación, supresión inmunitaria, reducción de proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfocitos, macrófagos, células T (incluyendo células Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), supresión de respuesta inmunitaria frente a un patógeno o antígeno. Además la presencia de la expresión de zcytor17 en células inmunitarias activadas tales como células CD4+ y CD19+ activadas mostró que el receptor de zcytor17 puede estar implicado en reacciones de defensa inmunitaria del organismo contra invasores extraños: tales como microorganismos y residuo celular, y podría desempeñar un papel en las respuestas inmunitarias durante la inflamación y formación del cáncer. Como tal, los anticuerpos y componentes de unión de la presente invención que son agonistas o antagonistas con respecto a la función del receptor de zcytor17, tal como a un receptor de citocina multimérico de zcytor17 soluble, pueden usarse para modificar la respuesta inmunitaria y la inflamación.

La estructura de zcytor17lig y la expresión tisular sugieren un papel en el desarrollo de timocitos o hematopoyético temprano y la regulación de la respuesta inmunitaria o inflamación. Estos procesos implican la estimulación de la proliferación y diferenciación celular en respuesta a la unión de una o más citocinas a sus receptores afines. En vista de la distribución tisular observada para este zcytor17lig, los agonistas (incluyendo el/los receptor(es) natural(es)) y antagonistas tienen un enorme potencial en aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Los compuestos identificados como agonistas de zcytor17lig son útiles para la estimulación de la proliferación y el desarrollo de células diana *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los compuestos agonistas, zcytor17lig, o anticuerpos anti-zcytor17lig, son útiles como componentes de medios de cultivo celular definidos, y pueden usarse solos o en combinación con otras citocinas y hormonas para remplazar el suero que se usa comúnmente en el cultivo celular. Por lo tanto, los agonistas son útiles en la promoción específica del crecimiento y/o el desarrollo o la activación de monocitos, células T, células B, y otras células de los linajes linfocitos y mielocitos, y células hematopoyéticas en cultivo.

Las moléculas de la presente invención tienen un uso particular en la rama de monocitos/macrófagos del sistema inmunitario. Se conocen procedimientos que pueden evaluar tal actividad. Por ejemplo, el interferón gamma (IFN $\gamma$ ) es un activador potente de fagocitos mononucleares. Por ejemplo, un aumento en la expresión de zcytor17 tras la activación de células THP-1 (ATCC N<sup>o</sup> TIB-202) con interferón gamma podría sugerir que este receptor está implicado en la activación de monocitos. Los monocitos son células diferenciadas de manera incompleta que migran a diversos tejidos en los que maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria mediante la presentación de antígeno en linfocitos y desempeñan un papel de apoyo como células auxiliares en linfocitos mediante la secreción de numerosas citocinas. Los macrófagos pueden internalizar moléculas extracelulares y tras la activación tienen una capacidad aumentada para destruir microorganismos intracelulares y células tumorales. Los macrófagos activados están también implicados en la estimulación de la inflamación aguda o local. Además, se ha mostrado que la función de monocitos-macrófagos es

anómala en varios estados patológicos. Por ejemplo véase, Johnston, RB, New Eng. J. Med. 318:747-752, 1998.

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

Además, un experto en la técnica reconocería que los antagonistas de un receptor de citocina multimérico de zcytor17 son útiles. Por ejemplo, en lesiones ateroscleróticas, una de las primeras anomalías es la ubicación de monocitos/macrófagos en células endoteliales. Estas lesiones podrían prevenirse mediante el uso de antagonistas de zcytor17lig. Los receptores de citocina multiméricos solubles de zcytor17, tales como, por ejemplo, heterodímeros y trímeros, pueden usarse también como antagonistas del zcytor17lig. Además, la leucemia monoblástica está asociada con varias anomalías clínicas que reflejan la liberación de los productos biológicos del macrófago, los ejemplos incluyen altos niveles de lisozima en el suero y orina y fiebres altas. Además, tales leucemias presentan un aumento anómalo de células monocíticas. Estos efectos podrían prevenirse posiblemente mediante antagonistas de zcytor17lig, tal como se describe en el presente documento.

Usando procedimientos conocidos en la técnica, y que se dan a conocer en el presente documento, un experto podría evaluar fácilmente la actividad de un receptor de citocina multimérico de zcytor17 en los estados patológicos dados a conocer en el presente documento, inflamación, cáncer, o infección así como otros estados patológicos que implican células monocíticas. Además, ya que zcytor17lig se expresa de una manera específica de células T, macrófagos y monocitos, y estas enfermedades implican anomalías en células monocíticas, tales como proliferación, función, ubicación y activación celular, los polinucleótidos, polipéptidos, y anticuerpos de la presente invención pueden usarse como diagnósticos para detectar tales anomalías de células monocíticas, e indican la presencia de enfermedad. Tales procedimientos implican tomar una muestra biológica de un paciente, tal como sangre, saliva, o biopsia, y compararla con una muestra control normal. Pueden usarse procedimientos histológicos, citológicos, de citometría de flujo, bioquímicos y otros procedimientos para determinar los niveles relativos o la ubicación de zcytor17lig, o células que expresan zcytor17lig, es decir, monocitos, en la muestra del paciente en comparación con el control normal. Un cambio en el nivel (aumento o disminución) de expresión de zcytor17lig, o un cambio en el número o la ubicación de monocitos (por ejemplo, aumento o infiltración de células monocíticas en tejidos en los que no están normalmente presentes) en comparación con un control sería indicativo de enfermedad. Tales procedimientos diagnósticos pueden incluir también el uso de etiquetas radiométricas, fluorescentes y colorimétricas unidas a polinucleótidos, polipéptidos o anticuerpos de la presente invención. Tales procedimientos se conocen bien en la técnica y se dan a conocer en el presente documento.

Pueden usarse secuencias de aminoácidos que tienen actividad de zcytor17lig para modular el sistema inmunitario mediante la unión de receptor de citocina multimérico soluble de zcytor17, y por lo tanto, prevenir la unión de zcytor17lig con receptor de zcytor17lig endógeno. Los antagonistas de zcytor17lig, tales como un receptor de citocina multimérico de zcytor17, pueden usarse también para modular el sistema inmunitario mediante la inhibición de la unión del ligando Zcytor17 con el receptor de zcytor17lig endógeno. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva describe el uso de un receptor de citocina multimérico que puede usarse también para tratar a un sujeto que produce un exceso o bien de zcytor17lig o bien de receptor(es) que comprenden Zcytor17. Los sujetos adecuados incluyen mamíferos, tales como seres humanos o animales de veterinaria.

Se ha mostrado que zcytor17lig se expresa en células mononucleares activadas, y puede estar implicado en la regulación de la inflamación. Como tal, los polipéptidos de la presente invención pueden someterse a ensayo y usarse por su capacidad para modificar la inflamación, o pueden usarse como marcador para la inflamación. En la técnica se conocen procedimientos para determinar las cualidades pro-inflamatorias y anti-inflamatorias de zcytor17lig y se comentan en el presente documento. Además, puede estar implicado en la regulación por incremento de la producción de reactivos de fase aguda, tales como amiloide A del suero (SAA),  $\alpha$ 1-antiquimiotripsina, y haptoglobina, y que la expresión de ligando de receptor de zcytor17 puede aumentarse tras la inyección de lipopolisacárido (LPS) *in vivo* (que están implicados en la respuesta inflamatoria (Dumoutier, L. y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97:10144-10149 (2000)). La producción de proteínas de fase aguda, tales como SAA, se considera un mecanismo de supervivencia a corto plazo en el que la inflamación es beneficiosa; sin embargo, el

mantenimiento de proteínas de fase aguda durante periodos más largos contribuye a la inflamación crónica y puede ser perjudicial para la salud humana. Para la revisión, véase Uhlar, CM y Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265:501-523 (1999); y Baumann H. y Gauldie, J. Immunology Today 15:74-80 (1994). Además, la proteína de fase aguda SAA está implicada en patogenia de varias enfermedades inflamatorias crónicas, está implicada en aterosclerosis y artritis reumatoide, y es el precursor de la proteína amiloide A depositada en amiloidosis (Uhlar, CM y Whitehead, citado anteriormente). Por lo tanto, cuando un ligando tal como zcytor17lig que actúa como una molécula pro-inflamatoria e induce la producción de SAA, los antagonistas serían útiles en el tratamiento de enfermedad inflamatoria y otras enfermedades asociadas con proteínas de respuesta de fase aguda inducidas por el ligando. Tales antagonistas se proporcionan por la presente invención. Por ejemplo, un procedimiento de reducción de la inflamación comprende administrar a un mamífero con inflamación o que corre el riesgo de desarrollar inflamación una cantidad de una composición de un receptor de citocina multimérico soluble que es suficiente para reducir la inflamación. Además, un procedimiento de supresión de una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación puede comprender: (1) determinar un nivel de proteína amiloide A del suero; (2) administrar una composición que comprende un polipéptido de receptor de citocina multimérico soluble tal como se describe en el presente documento en un vehículo farmacéutico aceptable; (3) determinar un nivel tras la administración de proteína amiloide A del suero; (4) comparar el nivel de proteína amiloide A del suero en la etapa (1) con el nivel de proteína amiloide A del suero en la etapa (3), siendo una falta de aumento o una disminución en el nivel de proteína amiloide A del suero indicativo de la supresión de una respuesta inflamatoria.

Como zcytor17lig, el análisis de la distribución tisular del ARNm que corresponde a su ADNc de receptor de zcytor17 mostró que el nivel de ARNm era el más elevado en monocitos y células de próstata, y se eleva en monocitos activados, y células CD4+ activadas, células CD8+ activadas, y células CD3+ activadas. De hecho, el receptor de zcytor17 está también implicado en la inducción de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Por lo tanto, realizaciones particulares de la presente invención se refieren al uso de anticuerpos frente a zcytor17lig como antagonistas en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunitarias como se definen en las reivindicaciones, tales como pancreatitis, diabetes de tipo I (DMID), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, cáncer de colon y cáncer intestinal, diverticulosis, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, trasplante de órganos o de médula ósea; inflamación debida a traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad de injerto contra huésped; y en los que la inhibición de inflamación, supresión inmunitaria, reducción de proliferación de células hematopoyéticas, células inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, células T (incluyendo células Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), supresión de la respuesta inmunitaria frente a un patógeno o antígeno. Además la presencia de receptor de zcytor17 y expresión de zcytor17lig en células inmunitarias activadas tales como células CD3+ activadas, monocitos, células CD4+ y CD19+ mostró que el receptor de zcytor17 puede estar implicado en las reacciones de defensa inmunitaria del organismo contra invasores extraños: tales como microorganismos y residuo celular, y podría desempeñar un papel en las respuestas inmunitarias durante la inflamación y formación del cáncer. Como tal, zcytor17lig y anticuerpos frente a zcytor17lig de la presente invención que son agonistas o antagonistas de la función de receptor de zcytor17, pueden usarse para modificar la respuesta inmunitaria y la inflamación.

Además, los polipéptidos zcytor17lig que se unen a receptores de citocina multiméricos de zcytor17 y anticuerpos frente a los mismos son útiles para:

- 1) antagonizar o bloquear la señalización a través de un receptor de citocina multimérico de zcytor17 en el tratamiento de inflamación aguda, inflamación como resultado de traumatismo, lesión tisular, cirugía, septicemia o infección, y enfermedades inflamatorias crónicas tales como asma, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis crónica, esplenomegalia, artritis reumatoide, episodios inflamatorios agudos recurrentes (por ejemplo, tuberculosis), y tratamiento de amiloidosis, y aterosclerosis, enfermedad de Castleman, asma, y otras enfermedades asociadas con la inducción de respuesta de fase aguda.
- 2) antagonizar o bloquear la señalización a través del receptor de citocina multimérico de zcytor17 en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como DMID, esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia grave, artritis reumatoide, y EII para prevenir o inhibir la señalización en células inmunitarias (por ejemplo linfocitos, monocitos, leucocitos) a través de receptor de zcytor17 (Hughes C y col., J. Immunol 153: 3319-3325 (1994)). El asma, alergia y otra enfermedad atópica pueden tratarse con un AcM frente a, por ejemplo, receptores de citocina multiméricos de zcytor17 solubles o heterodímeros de zcytor17/CRF2-4, para inhibir la respuesta inmunitaria o para agotar las células ofensoras. El bloqueo o la inhibición de la señalización a través del receptor de citocina multimérico de zcytor17, usando los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, puede beneficiar también a enfermedades del páncreas, riñón, células de la pituitaria y neuronales. Puede beneficiar DMID, NIDDM, pancreatitis, y carcinoma pancreático. El receptor de citocina multimérico de zcytor17 puede servir como diana para terapia con AcM del cáncer en la que un AcM de antagonismo inhibe el crecimiento del cáncer y dirige la destrucción mediada por el sistema inmunitario. (Holliger P, y Hoogenboom, H Nature Biotech. 16: 1015-1016 (1998)). Los AcM frente a monómeros homodímeros, heterodímeros y multímeros de receptor soluble de zcytor17, pueden ser también útiles para tratar nefropatías tales como glomerulosclerosis, neuropatía membranosa, amiloidosis (que también afecta al riñón entre otros tejidos), arteriosclerosis renal, glomerulonefritis de varios orígenes, enfermedades fibroproliferativas del riñón, así como disfunción renal asociada con LES, DMID, diabetes de tipo II (NIDDM), tumores renales y otras enfermedades.

3) Agonizar o iniciar la señalización a través del receptor de citocina multimérico de zcytor17 en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como DMID, MS, LES, miastenia grave, artritis reumatoide, y EII. El zcytor17lig puede señalar linfocitos u otras células inmunitarias para diferenciar, alterar la proliferación, o cambiar la producción de citocinas o proteínas de superficie celular que mejoran la autoinmunidad. Específicamente, la modulación de una respuesta de células T auxiliares frente a un patrón alternativo de secreción de citocinas puede desviar una respuesta autoinmunitaria para mejorar la enfermedad (Smith JA y col., J. Immunol. 160:4841-4849 (1998)). De manera similar, zcytor17lig puede usarse para señalar, agotar y desviar células inmunitarias implicadas en asma, alergia y enfermedad atópica. La señalización a través de receptor de citocina multimérico de zcytor17 puede beneficiar también a enfermedades del páncreas, riñón, células de la pituitaria y neuronales. Puede beneficiar DMID, NIDDM, pancreatitis, y carcinoma pancreático. El receptor de citocina multimérico de zcytor17 puede servir como diana para terapia con AcM del cáncer pancreático en la que un AcM de señalización inhibe el crecimiento del cáncer y dirige la destrucción mediada por el sistema inmunitario (Tutt, AL y col., J Immunol. 161: 3175-3185 (1998)). De manera similar pueden tratarse leucemias específicas de células T, linfomas, discrasia de células plasmáticas (por ejemplo, mieloma múltiple), y carcinoma con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpo neutralizante) frente a receptores solubles que comprenden zcytor17 de la presente invención.

Los receptores de citocina multiméricos de zcytor17 solubles tal como se describe en el presente documento pueden usarse para neutralizar/bloquear la actividad de ligando de receptor de zcytor17 en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, enfermedad atópica, NIDDM, pancreatitis y disfunción renal tal como se describió anteriormente. Una forma soluble de receptor de citocina multimérico de zcytor17 puede usarse para promover una respuesta de anticuerpo mediada por células T y/o para promover la producción de IL-4 u otras citocinas mediante linfocitos u otras células inmunitarias.

Un receptor de citocina multimérico soluble de zcytor17 puede ser útil como antagonistas de zcytor17lig. Tales efectos antagonistas pueden lograrse mediante neutralización directa o unión de su ligando natural. Además de usos antagonistas, los receptores solubles pueden unirse a zcytor17lig y actuar como proteínas portadoras o de vehículo, con el fin de transportar zcytor17lig a diferentes tejidos, órganos, y células dentro del organismo. Como tal, los receptores solubles pueden fusionarse o acoplarse a moléculas, polipéptidos o restos químicos que dirigen el complejo de receptor soluble-ligando a un sitio específico, tal como un tejido, célula inmunitaria específica, monocitos, o tumor. Por ejemplo, en la infección aguda o algunos cánceres, el beneficio puede resultar de la inducción de la inflamación y proteínas de respuesta de fase aguda local. Por lo tanto, los receptores solubles descritos en el presente documento o anticuerpos frente a los mismos pueden usarse para dirigir específicamente la acción un ligando zcytor17lig pro-inflamatorio. Véase, Cosman, D. Cytokine 5: 95-106 (1993); y Fernandez-Botran, R. Exp. Opin. Invest. Drugs 9:497-513 (2000).

Además, los receptores de citocina multiméricos de zcytor17 solubles pueden usarse para estabilizar el zcytor17lig, para aumentar la biodisponibilidad, la longevidad terapéutica, y/o eficacia del ligando estabilizando el ligando frente a la degradación o el aclaramiento, o dirigiendo el ligando a un sitio de acción dentro del organismo. Por ejemplo, el complejo IL-6/IL-6R soluble que se produce de manera natural estabiliza IL-6 y puede señalar a través del receptor de gp130. Véase, Cosman, D. citado anteriormente, y Fernandez-Botran, R. citado anteriormente. Además, Zcytor17 puede combinarse con un ligando afín tal como su ligando para comprender un complejo de ligando/receptor soluble. Tales complejos pueden usarse para estimular respuestas de células que presentan una subunidad de receptor acompañante. La especificidad celular de complejos de receptor de citocina multimérico de zcytor17/zcytor17lig puede diferir de la observada para el ligando administrado solo. Además los complejos pueden tener distintas propiedades farmacocinéticas tales como afectar a la vida media, dosis/respuesta y especificidad de órgano o tejido. Los complejos de receptor de citocina multimérico de zcytor17/ligando pueden tener por lo tanto actividad agonista para potenciar una respuesta inmunitaria o estimular células mesangiales o para estimular células hepáticas. Como alternativa, sólo tejidos que expresan una subunidad de señalización que heterodimeriza con el complejo pueden verse afectados de manera análoga a la respuesta frente a complejos IL6/IL6R (Hirota H. y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 92:4862-4866 (1995); y Hirano, T. en Thomason, A. (Ed.) "The Cytokine Handbook", 3ª Ed., p. 208-209). Los complejos de receptor soluble/citocina para IL12 y CNTF presentan actividades similares.

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

Los polinucleótidos que codifican para un receptor de citocina multimérico de zcytor17 son útiles dentro de aplicaciones de terapia génica en las que se desea aumentar o inhibir la actividad de zcytor17lig. Si un mamífero tiene un gen de zcytor17 mutado o ausente, el gen de zcytor17 de la presente invención puede introducirse en las

células del mamífero. En una realización, se introduce un gen que codifica para un receptor de citocina multimérico de zcytor17 *in vivo* en un vector viral. Tales vectores incluyen un virus de ADN atenuado o defectuoso, tal como, pero sin limitarse a, virus del herpes simple (VHS), virus del papiloma, virus de Epstein Barr (VEB), adenovirus, virus adenoasociados (VAA), y similares. Se prefieren los virus defectuosos que carecen por completo o casi por completo de genes virales. Un virus defectuoso no es infeccioso tras la introducción en una célula. El uso de vectores virales defectuosos permite la administración a células en una zona específica, localizada, sin preocupar que el vector pueda infectar otras células. Los ejemplos de vectores particulares incluyen, pero no se limitan a, un vector defectuoso de virus del herpes simple 1 (VHS1) (Kaplitt y col., *Molec. Cell. Neurosci.* 2:320-30 (1991)); un vector atenuado de adenovirus, tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet y col., *J. Clin. Invest.* 90:626-30 (1992); y un vector defectuoso de virus adenoasociado (Samulski y col., *J. Virol.* 61: 3096-101 (1987); y Samulski y col., *J. Virol.* 63:3822-8 (1989)).

Un gen de zcytor17 de la presente invención pueden introducirse en un vector retroviral, por ejemplo, tal como se describe en Anderson y col., patente de los Estados Unidos Nº 5.399.346; Mann y col. *Cell* 33:153 (1983); Temin y col., patente de los Estados Unidos Nº 4.650.764; Temin y col., patente de los Estados Unidos Nº 4.980.289; Markowitz y col., *J. Virol.* 62:1120 (1988); Temin y col., patente de los Estados Unidos Nº 5.124.263; publicación de patente internacional Nº WO 95/07358, publicada el 16 de marzo de 1995 por Dougherty y col.; y Kuo y col., *Blood* 82:845 (1993). Como alternativa, el vector puede introducirse mediante lipofección *in vivo* usando liposomas. Pueden usarse lípidos catiónicos sintéticos para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica para un marcador (Felgner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7 (1987); Mackey y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8027-31 (1988)). El uso de lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos *in vivo* tiene ciertas ventajas prácticas. El direccionamiento molecular de liposomas a células específicas representa un área de beneficio. Más en particular, dirigir la transfección a células particulares representa un área de beneficio. Por ejemplo, dirigir la transfección a tipos de células particulares sería particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el sistema inmunitario, páncreas, hígado, riñón, y cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas para el fin del direccionamiento. Los péptidos seleccionados como diana (por ejemplo, hormonas o neurotransmisores), proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no peptídicas, pueden acoplarse a liposomas químicamente.

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

Puede usarse metodología antisentido para inhibir la transcripción de gen de receptor de citocina multimérico de zcytor17, tal como para inhibir la proliferación celular *in vivo*. Los polinucleótidos que son complementarios a un segmento de un polinucleótido que codifica para zcytor17 (por ejemplo, un polinucleótido tal como se expone en la SEC ID Nº: 110. SEC ID Nº: 108 o SEC ID Nº: 4) están diseñados para unirse a ARNm que codifica para zcytor17lig y para inhibir el traslado de tal ARNm. Tales polinucleótidos antisentido se usan para inhibir la expresión de genes que codifican para el polipéptido zcytor17lig en cultivo celular o en un sujeto.

Los ratones modificados mediante ingeniería genética para expresar el gen de zcytor17lig, denominados como "ratones transgénicos," y los ratones que presentan una ausencia completa de función de gen de zcytor17lig, denominados como "ratones desactivado," pueden generarse también (Snouwaert y col., *Science* 257:1083 (1992); Lowell y col., *Nature* 366:740-42 (1993); Capecchi, M.R., *Science* 244: 1288-1292 (1989); Palmiter, R.D. y col. *Annu Rev Genet.* 20: 465-499 (1986)). Por ejemplo, los ratones transgénicos que sobreexpresan zcytor17lig, o bien de manera ubicua o bien bajo un promotor restringido por tejido o específico de tejido pueden usarse para preguntar si la sobreexpresión provoca un fenotipo. Por ejemplo, la sobreexpresión de un polipéptido zcytor17lig de tipo natural, fragmento de polipéptido o un mutante del mismo, puede alterar los procesos celulares normales, dando como resultado un fenotipo que identifica un tejido en el que expresión de zcytor17lig es funcionalmente relevante y puede indicar una diana terapéutica para el zcytor17lig, sus agonistas o antagonistas. Por ejemplo, un ratón transgénico preferido para modificar mediante ingeniería genética es aquél que sobreexpresa el zcytor17lig (residuos de aminoácidos 23-164 de la SEC ID Nº: 2; o 24-163 de la SEC ID Nº: 11). Además, tal sobreexpresión puede dar como resultado un fenotipo que muestra similitud con enfermedades humanas. De manera similar, los ratones de zcytor17lig desactivados pueden usarse para determinar si zcytor17lig se requiere absolutamente *in vivo*. El fenotipo de ratones desactivados es predictivo de los efectos *in vivo* que un antagonista de zcytor17lig, tal como un receptor de citocina multimérico soluble de zcytor17, puede tener. El ADNc de zcytor17lig humano o de ratón descrito en el presente documento puede usarse para generar ratones desactivado. Estos ratones pueden emplearse para estudiar el gen de zcytor17lig y la proteína codificada de ese modo en un sistema *in vivo*, y pueden usarse como modelos *in vivo* para corresponder a enfermedades humanas. Además, la expresión de ratones transgénicos de polinucleótidos antisentido zcytor17lig o ribozimas dirigidas contra zcytor17lig, descrita en el presente documento, puede usarse de manera análoga a los ratones transgénicos descritos anteriormente. Asimismo, pueden llevarse a cabo estudios mediante la administración de proteína de zcytor17lig purificada.

La presente memoria descriptiva describe una composición que incluye una cantidad eficaz de un receptor de



citocina multimérico soluble que comprende un polipéptido que comprende del residuo de aminoácido 20 al residuo de aminoácido 543 de la SEC ID N°: 111 y al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El polipéptido puede estar comprendido por varios fragmentos o porciones del dominio extracelular de la SEC ID N°: 111, SEC ID N°: 109, y/o SEC ID N°: 5, tal como por ejemplo, del residuo de aminoácido 20 al residuo de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y del residuo de aminoácido 20 al residuo de aminoácido 519 de la SEC ID N°: 111. La al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I puede incluir, por ejemplo, una parte de la SEC ID N°: 9 y/o una parte de la SEC ID N°: 7, tal como, por ejemplo, del residuo de aminoácido 28 al residuo de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del residuo de aminoácido 35 al residuo de aminoácido 137 de la SEC ID N°: 7, del residuo de aminoácido 240 al residuo de aminoácido 342 de la SEC ID N°: 7, del residuo de aminoácido 348 al residuo de aminoácido 429 de la SEC ID N°: 7, del residuo de aminoácido 28 al residuo de aminoácido 739 de la SEC ID N°: 7, y/o combinaciones de los mismos. El receptor de citocina multimérico puede incluir además una etiqueta de afinidad tal como se describe en el presente documento.

La presente memoria descriptiva describe una composición de inhibición de células inmunitarias que incluye una cantidad eficaz de un receptor de citocina multimérico soluble que comprende un polipéptido que comprende del residuo de aminoácido 20 al residuo de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I; y un vehículo farmacéuticamente aceptable, inhibiendo el receptor de citocina multimérico soluble la proliferación de células inmunitarias.

La presente memoria descriptiva describe una composición de inhibición de células inflamatorias que incluye una cantidad eficaz de un receptor de citocina multimérico soluble que comprende un polipéptido que comprende del residuo de aminoácido 20 al residuo de aminoácido 227 de la SEC ID N°: 111 y al menos una parte de al menos un receptor de citocina de clase I; y un vehículo farmacéuticamente aceptable, inhibiendo el receptor de citocina multimérico soluble la proliferación de células inflamatorias.

Las pruebas experimentales sugieren un papel para zcytor17lig en la progresión de enfermedades que implican la piel o el epitelio de superficies internas, tales como, por ejemplo, intestino grueso, intestino delgado, páncreas, pulmón, próstata, útero, y similares. En primer lugar, tal como se da a conocer en el presente documento, los receptores de zcytor17, incluyendo tanto el receptor OSM beta y zcytor17, se expresan en varios tipos celulares ubicados en superficies epiteliales incluyendo líneas celulares derivadas del epitelio pulmonar, fibroblasto pulmonar, próstata, colon, mama, epitelio hepático, hueso y epitelio dérmico, fibroblasto óseo, y similares. Además, tal como se da a conocer en el presente documento, los ejemplos de cada uno de estos tipos celulares también respondían a la activación de zcytor17lig de un constructo indicador de STAT. Además, varias líneas celulares respondían a la estimulación con zcytor17lig produciendo niveles aumentados de IL-6, IL-8, MCP-1 (un factor quimiotáctico) tal como se describe en el presente documento. En su totalidad, estos datos sugieren un papel para zcytor17lig en enfermedades que implican el epitelio tales como, por ejemplo, dermatitis atópica; dermatitis; psoriasis; artritis psoriásica; eczema; gingivitis; enfermedad periodontal; enfermedades inflamatorias del intestino (EII) (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn); trastornos reproductivos, tales como, por ejemplo, displasia del cuello uterino, cáncer de cuello uterino; otras enfermedades de la piel como cánceres: sarcomas; carcinomas; melanoma, etc. es decir, no sólo enfermedades inflamatorias, puesto que el sistema inmunitario está implicado en activar/curar cánceres; enfermedades que implican disfunción de barrera, tal como, por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y síndrome del intestino irritable (SII); y enfermedades que implican el epitelio pulmonar, tal como asma, enfisema, y similares. Además, la liberación de citocinas IL-6, IL-8, y MCP-1 por células expuestas a zcytor17lig sugiere que zcytor17lig está implicado en la inflamación. Por lo tanto, la regulación de zcytor17lig puede ser útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias o cancerosas asociadas con los tejidos que expresan el receptor. Estas enfermedades incluyen, por ejemplo, prostatitis, hepatitis, osteoartritis, y similares. Zcytor17lig puede regular de manera positiva o negativa directa o indirectamente estas enfermedades. Por lo tanto, la administración de zcytor17lig puede usarse para tratar enfermedades tal como se describe en el presente documento directamente o con moléculas que inhiben la actividad de zcytor17lig incluyendo, por ejemplo, tanto anticuerpos monoclonales frente a zcytor17lig o anticuerpos monoclonales frente a zcytor17, o anticuerpos monoclonales que reconocen el complejo de receptor de OSM beta y zcytor17.

Los datos también sugieren que zcytor17lig puede estar implicado en la regulación de enfermedades mediadas por células T TH2. En primer lugar, zcytor17lig se forma por el subconjunto TH2 de células T activadas. Las células TH2 expresan más zcytor17lig en comparación con células TH1. Además, al menos dos celulares epiteliales de pulmón (SK-LU-1, A549) se estimularon para aumentar ARNm de receptor alfa-2 de IL13 en respuesta a la estimulación con ligando zcyto17 tal como se describe en el presente documento. Existe una asociación de la cadena de receptor alfa-2 de IL-13 y la tumorigenicidad de tumores pancreático y de mama humanos. Esto sugiere que zcytor17lig puede desempeñar un papel en la regulación de la tumorigenicidad de estos tipos de cánceres, así como otros cánceres. Por lo tanto, la administración de un antagonista de zcytor17lig o el uso directo de zcytor17lig puede ser útil en el tratamiento de estos tipos de cánceres, benignos o malignos y a diversos grados (grados I-IV) y estadios (por ejemplo, procedimientos de clasificación TNM o AJC) de desarrollo tumoral, en mamíferos, preferentemente seres humanos.

En la técnica se conoce bien que IL13 está implicada en la generación de células TH2 activadas y en enfermedades mediadas por TH2, tales como asma, dermatitis atópica, y similares. Zcytor17lig o antagonistas de zcytor17lig

pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades que implicaban células T TH2. Esto incluiría enfermedades tales como, por ejemplo, dermatitis atópica, asma, así como otras enfermedades que se agravan por células TH2 activadas. La implicación de zcytor17lig en enfermedades, tales como, por ejemplo, dermatitis atópica, está apoyada también por el fenotipo de los ratones transgénicos que sobreexpresan zcytor17lig y desarrollan síntomas de dermatitis atópica tal como se describe en el presente documento.

A pesar de la expresión diferencial de zcytor17lig por células TH2, existe aún cierta expresión de zcytor17lig en células TH1 y en células T CD8+. Por lo tanto, zcytor17lig o sus antagonistas pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades que implican modulación inmunitaria de células T activadas incluyendo, por ejemplo, infección viral, cánceres, rechazo de injerto, y similares.

Zcytor17lig puede estar implicado también en el desarrollo del cáncer. Existe expresión de los receptores de zcytor17 y receptor beta de OSM en osteosarcomas fibroblásticos óseos humanos, melanoma fibroblástico de piel humano, carcinoma epitelial de colon, adenocarcinoma, adenocarcinoma epitelial de mama, adenocarcinoma epitelial de próstata, y carcinoma y adenocarcinoma epitelial de pulmón. Por lo tanto, puede ser útil tratar tumores de origen epitelial o bien con zcytor17lig, fragmentos del mismo, o antagonistas de zcytor17lig que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, adenocarcinoma y melanoma. No obstante, zcytor17lig o un antagonista de zcytor17lig pueden usarse para tratar un cáncer, o para reducir uno o más síntomas de un cáncer, desde un cáncer que incluye pero no se limita a, carcinoma de células escamosas o epidermoide, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma papilar, cistoadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, adenoma bronquial, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células transicionales, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor mixto maligno de origen en glándulas salivares, tumor de Wilms, teratoma inmaduro, teratocarcinoma, y otros tumores que comprenden al menos algunas células de origen epitelial.

Generalmente, la dosificación de polipéptido zcytor17lig administrado (o proteína de fusión o análogo de Zcytor16) variará dependiendo de factores tales como la edad de paciente, el peso, la altura, el sexo, estado médico general e historia clínica previa. Normalmente, es deseable proporcionar al receptor una dosificación de polipéptido zcytor17lig que esté en el intervalo de desde aproximadamente 1 pg/kg hasta 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque también puede administrarse una dosificación inferior o superior según determinen las circunstancias. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente tales dosificaciones, y ajustes de las mismas, usando procedimientos conocidos en la técnica.

Administración de un agonista o antagonista de receptor multimérico de zcytor17 a un sujeto puede ser tópica, por inhalación, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, mediante perfusión a través de un catéter regional, o mediante inyección intralesional directa. Cuando se administran proteínas terapéuticas mediante inyección, la administración puede ser mediante infusión continua o mediante bolos únicos o múltiples bolos.

Las vías adicionales de administración incluyen la vía oral, membrana mucosa, pulmonar y transcutánea. La administración oral es adecuada para microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas proteínoides, microesferas de policianoacrilato, y sistemas a base de lípidos (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins", en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). La viabilidad de una administración intranasal se muestra a modo de ejemplo mediante un modo de administración de insulina de este tipo (véase, por ejemplo, Hinchcliffe e Ilium, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:199 (1999)). Pueden prepararse partículas secas o líquidas que comprenden agonista o antagonista de receptor multimérico de Zcytor17 e inhalarse con la ayuda de dispersores de polvo seco, generadores de aerosol líquido, o nebulizadores (por ejemplo, Pettit y Gombotz, *TIBTECH* 16:343 (1998); Patton y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:235 (1999)). Este enfoque se ilustra por el sistema de tratamiento de la diabetes AERX, que es un inhalador electrónico manual que suministra insulina aerosolizada en los pulmones. Estudios han mostrado que proteínas tan grandes como 48.000 kDa se han suministrado a través de la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonidos de baja frecuencia, lo que ilustra la viabilidad de la administración transcutánea (Mitragotri y col., *Science* 269:850 (1995)). La administración transdérmica usando electroporación proporciona otro medio para administrar una molécula que tiene actividad de unión a receptor multimérico de Zcytor17 (Potts y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:213 (1997)).

Una composición farmacéutica que comprende una proteína, un polipéptido, o un péptido que tiene actividad de unión de receptor multimérico de Zcytor17 puede formularse según procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante los cuales las proteínas terapéuticas se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición está en un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede tolerarse por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados se conocen bien por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Edición (Mack Publishing Company 1995).

Para fines de terapia, las moléculas que tienen actividad de unión de receptor multimérico de Zcytor17 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. Se dice que

una combinación de una proteína, un polipéptido, o un péptido que tiene actividad de unión de receptor multimérico de Zcytor17 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administra en una "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente usado para tratar la inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia al menos una parte de la respuesta inflamatoria.

Una composición farmacéutica que comprende Zcytor17lig (o proteína de fusión o análogo de Zcytor17lig) puede proporcionarse en forma líquida, en un aerosol, o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran mediante soluciones inyectables, aerosoles, gotas, soluciones topológicas y suspensiones orales. Las formas sólidas a modo de ejemplo incluyen cápsulas, comprimidos, y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra mediante bombas miniosmóticas e implantes (Bremer y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer y col., "Protein Delivery with Infusion Pumps," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey y col., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)). Otras formas sólidas incluyen cremas, pastas, otras aplicaciones topológicas, y similares.

Los liposomas proporcionan un medio para suministrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, o a través de administración oral, inhalación, o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimientos acuosos (véase, en general, Bakker-Woudenberg y col., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Supl. 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46:618 (1993), y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas son de composición similar a las membranas celulares y como resultado, los liposomas pueden administrarse de manera segura y son biodegradables. Dependiendo del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilaminares o multilaminares, y los liposomas pueden variar en tamaño con diámetros que oscilan desde 0,02  $\mu\text{m}$  hasta más de 10  $\mu\text{m}$ . Varios agentes pueden encapsularse en liposomas: partición de agentes hidrófobos en las bicapas y partición de agentes hidrófilos dentro del/de los espacio(s) acuosos internos (véase, por ejemplo, Machy y col., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987), y Ostro y col., *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576 (1989)). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño de los liposomas, el número de bicapas, la composición lipídica, así como la carga y las características superficiales de los liposomas.

Los liposomas pueden adsorberse prácticamente a cualquier tipo de célula y luego liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma absorbido puede experimentar endocitosis por células que son fagocíticas. La endocitosis va seguida de degradación intralisosómica de lípidos liposómicos y la liberación de los agentes encapsulados (Scherphof y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). Tras la administración intravenosa, pequeños liposomas (de 0,1 a 1,0  $\mu\text{m}$ ) se captan normalmente por células del sistema reticuloendotelial, ubicado principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas mayores de 3,0  $\mu\text{m}$  se depositan en el pulmón. Esta captación preferencial de menores liposomas por las células del sistema reticuloendotelial se ha usado para suministrar agentes quimioterápicos a macrófagos y a tumores del hígado.

El sistema reticuloendotelial puede eludirse mediante varios procedimientos incluyendo saturación con grandes dosis de partículas liposómicas, o inactivación de macrófagos selectiva mediante medios farmacológicos (Claassen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 802:428 (1984)). Además, se ha mostrado que la incorporación de fosfolípidos derivatizados con glicolípidos o polietilenglicol en membranas liposómicas da como resultado una captación significativamente reducida por el sistema reticuloendotelial (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Los liposomas pueden prepararse también para dirigirse a particular células u órganos variando la composición de fosfolípidos o insertando receptores o ligandos en los liposomas. Por ejemplo, los liposomas preparados con un alto contenido de un tensioactivo no iónico, se han usado para dirigirse al hígado (Hayakawa y col., patente japonesa 04-244,018; Kato y col., *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja,  $\alpha$ -tocoferol, y aceite de ricino hidrogenado etoxilado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla a vacío, y luego reconstruyendo la mezcla con agua. Se ha mostrado que una formulación liposómica de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) también se dirige al hígado (Shimizu y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:881 (1997)).

Como alternativa, diversos ligandos de transporte dirigido pueden unirse a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, carbohidratos, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas pueden modificarse con derivados de galactosil-lípidos de tipo ramificado para dirigirse a receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente sobre la superficie de células hepáticas (Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 14:287 (1997); Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.*, 20:259 (1997)). De forma similar, Wu y col., *Hepatology*, 27:772 (1998), han demostrado que el marcaje de liposomas con asialofetuína lleva a una vida media plasmática del liposoma más corta y a un gran aumento en la captación de liposomas

- 5 marcados con asialofetuína por los hepatocitos. Por otro lado, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galactosil-lípidos de tipo ramificado puede inhibirse mediante una preinyección de asialofetuína (Murahashi y col., Biol. Pharm. Bull., 20:259 (1997)). Los liposomas de albúmina de suero humana poliaconitilados proporcionan otro enfoque para el transporte dirigido de liposomas hasta las células hepáticas (Kamps y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:11681 (1997)). Además, Geho y col., patente de los Estados Unidos N° 4.603.044, describen un sistema de administración de vesículas de liposomas dirigidos a hepatocitos, que tiene especificidad por los receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.
- 10 En un enfoque más general para el transporte dirigido a tejidos, las células diana se premarcan con anticuerpos biotinilados específicos para un ligando expresado por la célula diana (Harasym y col., Adv. Drug Deliv. Rev., 32:99 (1998)). Después de la eliminación plasmática del anticuerpo libre se administran los liposomas conjugados con estreptavidina. En otro enfoque, los anticuerpos de transporte dirigido se unen directamente a los liposomas (Harasym y col., Adv. Drug Deliv. Rev., 32:99 (1998)).
- 15 Los polipéptidos que tienen actividad de unión a receptor multimérico de Zcytor1 pueden encapsularse dentro de liposomas usando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson y col., Infect. Immun., 31:1099 (1981); Anderson y col., Cancer Res., 50:1853 (1990); y Cohen y col., Biochim. Biophys. Acta, 1063:95 (1991); Alving y col., "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies", en Liposome Technology, 2ª edición, vol. III, Gregoriadis (ed.), p. 317 (CRC Press, 1993); Wassef y col., Meth. Enzymol., 149:124 (1987)). Como se indicó anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener varios componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen y col., Biochim. Biophys. Acta, 1150:9 (1993)).
- 20 Las microesferas de polímeros degradables se han diseñado para mantener unos elevados niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables tales como poli(láctido-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli(orto-ésteres), polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en los que las proteínas se atrapan en el polímero (Gombotz y Pettit, Bioconjugate Chem., 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery", en Drug Delivery Systems, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press, 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery", en Protein Delivery: Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press, 1997); Bartus y col., Science, 281:1161 (1998); Putney y Burke, Nature Biotechnology, 16:153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:548 (1998)). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también proporcionan vehículos para la administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref y col., Pharm. Biotechnol., 10:167 (1997)).
- 25 La presente memoria descriptiva describe polipéptidos químicamente modificados que tienen actividad de receptor multimérico de Zcytor17 de unión tal como los receptores solubles multiméricos o heterodiméricos de receptor multimérico de zcytor17, y antagonistas de receptor multimérico de Zcytor17, por ejemplo anticuerpos de receptor multimérico anti-zcytor17 o polipéptidos de unión, en los que un polipéptido está unido con un polímero, tal como se comentó anteriormente.
- 30 Otras formas farmacéuticas pueden idearse por los expertos en la técnica, tal como se muestra, por ejemplo, por Ansel y Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 5ª Edición (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición (Mack Publishing Company 1995), y por Ranade y Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996).
- 35 Como ilustración, las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse como un kit que comprende un envase que comprende un polipéptido con un dominio extracelular de receptor multimérico de Zcytor17, por ejemplo, receptores solubles multiméricos o heterodiméricos de receptor multimérico de zcytor17, o un antagonista de receptor multimérico de Zcytor17 (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante o fragmento de anticuerpo que se une a un polipéptido de receptor multimérico de Zcytor17). Los polipéptidos terapéuticos pueden proporcionarse en forma de una solución inyectable para dosis únicas o múltiples, o como un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Como alternativa, un kit de este tipo puede incluir un dispersor de polvo seco, generador de aerosol líquido, o nebulizador para la administración de un polipéptido terapéutico. Un kit de este tipo puede comprender además información escrita sobre indicaciones y el uso de la composición farmacéutica. Además, tal información
- 40 puede incluir una declaración de que la composición de receptor multimérico de Zcytor17 está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida hacia el receptor multimérico de Zcytor17.

## Ejemplos

### 60 Ejemplo 1

*Construcción de quimera de MPL-polipéptido de zcytor17: MPL Extracelular y TM*

*Dominio fusionado con el dominio de señalización intracelular de zcytor17*

65 El dominio extracelular en 5' del receptor MPL murino se aisló a partir de un plásmido que contenía el receptor MPL

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

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

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

El vector de expresión del receptor pZP-7 se digirió con EcoRI (BRL) y XbaI (BRL) según las instrucciones del fabricante, y se purificó en gel tal como se describió anteriormente. Este fragmento de vector se combinó con la quimera de PCR MPL-zcytor17 escindida con EcoRI y XbaI aislada anteriormente y el fragmento de MPL en 5' con EcoRI y BamHI aislado anteriormente en una reacción de ligación. La ligación se realizó usando ligasa de T4 (Epicentre Technologies), a temperatura ambiente durante 1 hora según las instrucciones del fabricante. Una muestra de la ligación se sometió a electroporación en células de *E. coli* electrocompetentes de DH10B ElectroMAX™ (25µF, 200Ω, 1,8V). Transformantes se sembraron en placa sobre placas de LB+ampicilina y se seleccionaron colonias individuales mediante miniprep (Qiagen) y digestión con EcoRI para buscar la quimera MPL-zcytor17. La digestión con EcoRI de clones correctos proporciona aproximadamente un fragmento de 2 kb. La confirmación de la secuencia de quimera MPL-zcytor17 se realizó mediante análisis de secuencia. El inserto era de aproximadamente 3,1 kb, y era de longitud completa.

## Ejemplo 2

### *Proliferación basada en la quimera MPL-zcytor17 en el ensayo BAF3 usando Alamar Blue*

#### *A. Construcción de células BaF3 que expresan la quimera MPL-zcytor17*

BaF3, una línea celular prelinfoide dependiente de interleucina-3 (IL-3) derivada de médula ósea de murino (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot y col., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), se mantuvo en medios completos (medio RPMI (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) complementado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 10 %, IL-3 de murino 1-2 ng/ml 3 (mL-3) (R & D, Minneapolis, MN), L-glutaMax-1™ 2 mM (Gibco BRL), piruvato de sodio 1 mM (Gibco BRL), y antibióticos de PSN (GIBCO BRL)). Antes de la electroporación, se preparó el ADN de plásmido pZP-7/MPL-zcytor17 y se purificó usando un kit Maxi Prep de Qiagen (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Las células BaF3 para la electroporación se lavaron dos veces en medios RPMI y luego se resuspendieron en medios RPMI a una densidad celular de 10<sup>7</sup> células/ml. Un ml de células BaF3 resuspendidas se mezcló con 30 µg de ADN del plásmido pZP-7/MPL-zcytor17 y se transfirió para separar las cámaras de electroporación desechables (GIBCO BRL). A células a temperatura ambiente se administraron choques de 5x0,1 ms a 800 voltios seguido por choques de 5x2 ms a 600 voltios suministrados mediante un aparato de electroporación (Cyto-Pulse). Como alternativa, las células se sometieron a electroporación con dos impulsos en serie (800 PFAD/300 V; seguido por 1180 PFAD/300 V) suministrados por un aparato de electroporación Cell-Porator (GibcoBRL). Las células sometidas a electroporación se transfirieron a 50 ml de medios completos y se colocaron en un incubador durante 15-24 horas (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %). Luego se añadió selección de Geneticin™ (Gibco) (G418 1 mg/ml) a las células en un frasco T-162 para aislar el conjunto resistente a G418. Conjuntos de las células BaF3 transfectadas, a continuación en el presente documento denominadas células BaF3/MPLzcytor17, se sometieron a ensayo para determinar la capacidad de señalización tal como se describe a continuación.

#### *B. Pruebas de la capacidad de señalización de las células BaF3/MPL-zcytor17 usando un ensayo de proliferación de*

*Alamar Blue*

Se centrifugaron células BaF3/MPL-zcytor17 y se lavaron en los medios completos, descritos anteriormente, pero sin mL-3 (a continuación en el presente documento denominado como "medios libres de mL-3"). Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para garantizar la eliminación de la mL-3. Luego se contaron las células en un hemocitómetro. Las células se sembraron en placa en formato de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando los medios libres de mL-3.

La proliferación de las células BaF3/MPL-zcytor17 se evaluó usando trombopoyetina de murino (mTPO) diluida con medios libres de mL-3 hasta concentraciones de 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,1 ng/ml, 1,5 ng/ml. Cien microlitros de la mTPO diluida se añadió a las células BaF3/MPL-zcytor17. El volumen de ensayo total era de 200 µl. Los controles negativos se pasaron en paralelo usando medios libres de mL-3 sólo, sin la adición de mTPO. Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 3 días momento en el que se añadió Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) a 20 µl/pocillo. Alamar Blue proporciona una lectura fluorimétrica basándose en la actividad metabólica de las células, y es por lo tanto una medición directa de la proliferación celular en comparación con un control negativo. Las placas se incubaron de nuevo a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas. Las placas se leyeron en el lector de placas Fmax™ (Molecular Devices Sunnyvale, CA) usando el programa SoftMax™ Pro, a longitudes de onda 544 (excitación) y 590 (emisión), o un lector de placas Wallac Victor 2 (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA).

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

**Ejemplo 3**

*Construcción de vector de expresión que expresa zcytor17 de longitud completa: pZp7pX/zcytor17*

*A. Clonación de ADNc de zcytor17 de longitud completa para la expresión:*

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

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

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

*B. Construcción de vector de expresión que expresa WSX-1 de longitud completa*

- Se aisló el receptor WSN-1 completo (SEC ID N°: 9) a partir de un plásmido que contenía el ADNc de receptor WSX-1 (SEC ID N°: 8) (patente de los Estados Unidos N° 5.925.735). ADN de plásmido hWSX-1/pBluescript SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA) se digirió con EcoRI y XhoI para generar un fragmento de 1075 pb, y también se digirió con XhoI y XbaI para generar un fragmento de 900 pb. Ambas digestiones se pasaron sobre un gel de agarosa al 1 % y se aislaron los fragmentos de WSX-1 escindidos.
- El vector de expresión del receptor pZp7Z se digirió con EcoRI y XbaI y se purificó en gel tal como se describió anteriormente. Este fragmento de vector se combinó con los dos fragmentos de zcytor17 escindidos aislados anteriormente en una reacción de ligación usando ligasa de T4 (BRL). La ligación se incubó a temperatura ambiente durante la noche. Una muestra de la ligación se sometió a electroporación en células de *E. coli* electrocompetentes de DH10B ElectroMAX™ (25µF, 200Ω, 2,3V). Se hicieron crecer seis colonias en cultivo y se preparó ADN de miniprep y se digirió para confirmar el inserto de longitud completa de WSX-1 correcto de 2,0 kb. El plásmido resultante es pZP7Z/WSX-1.

**Ejemplo 4**

- Proliferación basada en zcytor17 en ensayo de BAF3 usando Alamar Blue*

*A. Construcción de células BaF3 que expresan receptor de zcytor17, receptor WSX-1 y OSMR*

- Las células BaF3 que expresan el receptor de zcytor17 de longitud completa se construyeron tal como para el ejemplo 2A anterior, usando 30 µg del vector de expresión de zcytor17, descrito en el ejemplo 3A. Una excepción es que en lugar de selección con geneticina, se añadió puromicina (ClonTech) a las células transfectadas en un frasco T-162 para aislar el conjunto resistente a puromicina. Las células BaF3 que expresaban el ARNm de receptor de zcytor17 se diseñaron como BaF3/zcytor17. Para obtener clones, células BaF3/zcytor17 en un hemocitómetro y se sembraron en placa a 1 célula/pocillo, 0,5 células/pocillo, 0,1 células/pocillo, y 0,01 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Quince clones se aumentaron en frascos T75, y cinco clones se sometieron a ensayo para determinar la expresión de zcytor17. Se aisló el ARN total a partir de sedimentos celulares usando un kit de aislamiento de ARN total S.N.A.P.™ (InVitrogen). Se sintetizó ADNc de primera cadena usando el kit RT-PCR de primera cadena proSTAR™, y luego se realizó PCR con los cebadores específicos de zcytor17 ZC29,180 (SEC ID N°: 22) y ZC29,122 (SEC ID N°: 23) para seleccionar los clones para la expresión de zcytor17. Un clon, BaF3/zcytor17#15 se eligió para expandirse y transfectarse con el vector de expresión de WSX-1.

- Se construyeron células BaF3 que expresaban zcytor17 y WSX-1 de longitud completa tal como en el ejemplo 2A anterior, usando 30 µg del vector de expresión de WSX-1 WSX-1/pZp7Z (ejemplo 3B) para someter a electroporación las células BaF3/zcytor17#15. Una excepción es que en lugar de selección con geneticina, se añadieron 200 µg/ml de zeocina (InVitrogen) a las células transfectadas en un frasco T-162 para aislar el conjunto resistente a zeocina. Las células BaF3 que expresaban zcytor17 y WSX-1 se designaron BaF3/zcytor17/hWSX-1. Para obtener clones, conjuntos de células BaF3/zcytor17/hWSX-1 se sembraron en placa a la dilución limitante en placas de 96 pocillos. Los clones resultantes se expandieron y se aisló el ARN total usando un kit de aislamiento de ARN total S.N.A.P.™ (InVitrogen). Se sintetizó ADNc de primera cadena usando el kit de PCR de primera cadena proSTAR™, y luego se usó PCR con los cebadores específicos de WSX-1 ZC9791 (SEC ID N°: 24) y ZC9793 (SEC ID N°: 25) para seleccionar los clones para la expresión de WSX-1. Un clon, BaF3/zcytor17/hWSX-1#5 se eligió para expandirse y transfectarse con el vector de expresión de OSMRbeta.

- Se construyeron células BaF3 que expresaban zcytor17, WSX-1 y OSMRbeta de longitud completa tal como en el ejemplo 2A anterior, usando 30 µg del vector de expresión de OSMRbeta OSMR/pZp7NX descrito en el ejemplo 29 para someter a electroporación las células BaF3/zcytor17/hWSX-1#5. Las células BaF3 que expresaban ARNm de zcytor17, WSX-1, y OSMRbeta se designaron BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR. Para obtener clones, conjuntos de células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta se sembraron en placa a la dilución limitante en placas de 96 pocillos. Los clones individuales se expandieron y se aisló el ARN total usando un kit de aislamiento de ARN total S.N.A.P.™ (InVitrogen). Se sintetizó ADNc de primera cadena usando el kit RT-PCR de primera cadena proSTAR™, y luego se usó PCR con los cebadores específicos de OSMRbeta ZC40109 (SEC ID N°: 26) y ZC40112 (SEC ID N°: 27) para seleccionar los clones para la expresión de zcytor17, WSX-1 y OSMR. Un clon, BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR#5 se seleccionó y estas células se usaron para buscar zcytor17lig tal como se describe a continuación en los ejemplos 5 y 6.

- B. Construcción de células BaF3 que expresan receptor de zcytor17 y OSMR*

- Se construyeron células BaF3 que expresan el receptor de zcytor17 de longitud completa tal como en el ejemplo 2A anterior, usando 30 µg del vector de expresión de zcytor17, descrito en el ejemplo 3A. Una excepción es que en lugar de selección con geneticina, se añadieron 2 µg/ml de puromicina (ClonTech) a las células transfectadas en un

frasco T-162 para aislar el conjunto resistente a puromicina. Las células BaF3 que expresan el ARNm de receptor de zcytor17 se designaron como BaF3/zcytor17. Para obtener clones, conjuntos de células BaF3/zcytor17 se sembraron en placa a la dilución limitante en placas de 96 pocillos. Estos clones se expandieron en cultivo y se aisló el ARN total usando un kit de aislamiento de ARN total S.N.A.P.<sup>TM</sup> (InVitrogen). Se sintetizó ADNc de primera cadena usando el kit de RT-PCR de primera cadena proSTAR<sup>TM</sup>, y luego se usó PCR para seleccionar los clones para la expresión de zcytor17. Un clon, BaF3/zcytor17 #15 se eligió para expandirse y transfectarse con el vector de expresión de OSMRbeta.

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

## 15 Ejemplo 5

*Selección de zcytor17lig usando células BaF3/Zcytor17/WSX-1/OSMRbeta usando un ensayo de proliferación de Alamar Blue*

### 20 A. Activación de células CCRF-CEM y CCRF-HSB2 para someter a prueba la presencia de zcytor17lig

Se obtuvieron células CCRF-CEM y CCRF-HSB2 de ATCC y se estimularon en cultivo para producir medios condicionados para someter a prueba la presencia de actividad de zcytor17lig tal como se describe a continuación. Las células en suspensión se sembraron a  $2 \times 10^5$  células/ml o  $5 \times 10^5$  células/ml en medios RPMI-1640 complementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM (GibcoBRL), 1X PSN (GibcoBRL), y se activaron con Phorbol-12-miristato-13-acetato 10 ng/ml (PMA) (Calbiochem, San Diego, CA) y ionomicina<sup>TM</sup> 0,5 µg/ml (Calbiochem) durante 24 o 48 horas. El sobrenadante de las células estimuladas se usó para someter a ensayo la proliferación de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta tal como se describe a continuación.

*B. Selección de zcytor17lig usando células BaF3/Zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta usando un ensayo de proliferación de Alamar Blue*

Células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta se centrifugaron y se lavaron en medios libres de mL-3. Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para garantizar la eliminación de la mL-3. Luego se contaron las células en un hemocitómetro. Las células se sembraron en placa en formato de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando los medios libres de mL-3.

La proliferación de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta se evaluó usando medios condicionados de células CCRFCEM y CCRF-HSB2 activadas (véase el ejemplo 5A). Los medios condicionados se diluyeron con medios libres de mL-3 hasta concentraciones del 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,5 %, 0,75 % y del 0,375 %. Se añadieron 100 µl de los medios condicionados diluidos a las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta. El volumen de ensayo total es de 200 µl. Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 3-5 días momento en el que se añadió Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) a 20 µl/pocillo. Las placas se incubaron de nuevo a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas. Las placas se leyeron en el lector de placas Fmax<sup>TM</sup> (Molecular devices) tal como se describió anteriormente (ejemplo 2).

Los resultados confirmaron la respuesta proliferativa de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta frente a un factor presente en los medios condicionados con CCRF-CEM y CCRF-HSB2 activadas. La respuesta, tal como se midió, era de aproximadamente 10 veces superior al nivel inicial a la concentración del 25 %. Las células BaF3 no transfectadas no proliferaron en respuesta a este factor, ni tampoco las células BaF3 transfectadas con zcytor17 y WSX-1 (células BaF3/zcytor17/WSX-1), mostrando que este factor era específico de receptores Zcytor17/OSMRbeta o zcytor17/OSMRbeta/WSX-1. Además el receptor de zcytor17 disminuyó esta actividad proliferativa de zcytor17lig en las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta (véase el ejemplo 11). Se esperan resultados similares en células BaF3/zcytor17/OSMRbeta.

### C. Fuente primaria humana usada para aislar zcytor17lig

Cien mililitros de extracciones de sangre se extrajeron de cada uno de seis donantes. La sangre se extrajo usando 10X tubos de 10 ml vacutainer que contenían heparina. Se reunió la sangre de seis donantes (600 ml), diluida 1:1 en PBS, y se separó usando Ficoll-Paque® PLUS (Pharmacia Biotech). El rendimiento de células humanas primarias aisladas tras la separación sobre el gradiente de ficoll fue de  $1,2 \times 10^9$  células.

Las células se suspendieron en 9,6 ml de tampón MACS (PBS, EDTA al 0,5 %, EDTA 2 mM). Se retiraron 1,6 ml de suspensión celular y se añadieron 0,4 ml de microperlas CD3 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). La mezcla se incubó



durante 15 min. a 4 °C. Estas células marcadas con perlas CD3 se lavaron con 30 ml de tampón MACS, y luego se resuspendieron en 2 ml de tampón MACS.

5 Se preparó una columna VS+ (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. La columna VS+ se colocó luego en un campo magnético VarioMACS™ (Miltenyi). La columna se equilibró con 5 ml tampón MACS. Las células humanas primarias aisladas se aplicaron luego a la columna. Se dejaron pasar las células negativas para CD3 a su través. La columna se enjuagó con 9 ml (3 X 3 ml) de tampón MACS. La columna se retiró luego del imán y se colocó sobre un tubo falcon de 15 ml. Se eluyeron células CD3+ añadiendo 5 ml de tampón MACS a la columna y separaron por lavado las células unidas usando el émbolo proporcionado por el fabricante. La incubación de las células con las perlas magnéticas CD3, lavados, y etapas de columna VS+ (de incubación a elución) anteriores se repitieron cinco veces más. Las fracciones de CD3+ resultantes de las seis separaciones de la columna se reunieron. El rendimiento de las células humanas seleccionadas CD3+ fue de  $3 \times 10^8$  células en total.

15 Una muestra de las células humanas seleccionadas CD3+ reunidas se retiró para su tinción y separación en un separador de células activadas por fluorescencia (FACS) para evaluar su pureza. Las células seleccionadas CD3+ humanas fueron en un 91 % células CD3+.

20 Las células seleccionadas CD3+ humanas se activaron mediante incubación en RPMI + FBS al 5 % + PMA 10 ng/ml e ionomicina 0,5 µg/ml (Calbiochem) durante 13 horas 37 °C. El sobrenadante de estas células humanas seleccionadas CD3+ activadas se sometió a prueba para determinar la actividad de zcytor17lig tal como se describe a continuación. Además, las células humanas seleccionadas CD3+ activadas se usaron para preparar una biblioteca de ADNc, tal como se describe en el ejemplo 6, a continuación.

25 *D. Pruebas del sobrenadante de células humanas seleccionadas CD3+ activadas para determinar zcytor17lig usando células BaF3/Zcytor17/WSX-1/OSMRbeta y un ensayo de proliferación de Alamar Blue*

30 Células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta se centrifugaron y se lavaron en medios libres de mL-3. Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para garantizar la eliminación de la mL-3. Luego se contaron las células en un hemocitómetro. Las células se sembraron en placa en formato de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando los medios libres de mL-3.

35 La proliferación de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta se evaluó usando medios condicionados de células humanas seleccionadas CD3+ activadas (véase el ejemplo 5C) diluidos con medios libres de mL-3 hasta concentraciones del 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,5 %, 0,75 %, 0,375 % y del 0,187 %. Se añadieron 100 µl de los medios condicionados diluidos a las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta. El volumen de ensayo total era de 200 µl. Las placas de ensayo se incubaron y se sometieron a ensayo tal como se describe en el ejemplo 5B.

40 Los resultados confirmaron la respuesta proliferativa de las células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta frente a un factor presente en los medios condicionados con células humanas seleccionadas CD3+ activadas. La respuesta, tal como se midió, era aproximadamente 15 veces superior al nivel inicial a la concentración del 25 %. Las células BaF3 no transfectadas no proliferaron en respuesta a este factor, ni tampoco las células BaF3 transfectadas con zcytor17 y WSX-1 (células BaF3/zcytor17/WXS-1), mostrando que este factor es específico de receptores Zcytor17/OSMRbeta o zcytor17/OSMRbeta/WSX-1.

## 45 Ejemplo 6

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

50 La selección de una biblioteca de ADNc de células seleccionadas CD3+ activadas humanas primarias reveló un ADNc aislado que es un miembro novedoso de la familia de citocinas de haz de cuatro hélices. Este ADNc codificaba para el zcytor17lig. El ADNc se identificó mediante selección para determinar la actividad del zcytor17lig usando los receptores zcytor17/WSX-1/OSM.

55 *A. El vector para la construcción de biblioteca seleccionada CDS3+*

60 El vector para la construcción de biblioteca seleccionada CD3+ fue pZP7NX. El vector pZP7NX se construyó tal como sigue: Se retiró la región codificante para el marcador selectivo DHFR en el vector pZP7 mediante digestión de ADN con las enzimas de restricción NcoI y PstI (Boehringer Mannheim). El ADN digerido se pasó sobre gel de agarosa al 1 %, se cortó y se purificó en gel usando el kit de extracción en gel de Qiagen (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Un fragmento de ADN que representaba la región codificante del marcador selectivo zeocina se amplificó mediante el procedimiento de PCR con los cebadores ZC13,946 (SEC ID N°: 28) y ZC13,945 (SEC ID N°: 29), y pZeoSV2(+) como molde. Existen sitios de restricción PstI y BclI adicionales en el cebador ZC13,946 (SEC ID N°: 28), y sitios NcoI y SfuI adicionales en el cebador ZC13,945 (SEC ID N°: 29). El fragmento de PCR se cortó con enzimas de restricción PstI y NcoI y se clonó en el vector pZP7 preparado mediante escisión con las mismas dos enzimas y posterior purificación en gel. Este vector se denominó pZP7Z. Luego se retiró la región

codificante de zeocina mediante digestión de ADN del vector pZP7Z con las enzimas de restricción BclI y SfuI. El ADN digerido se pasó sobre gel de agarosa al 1 %, se cortó y se purificó en gel, y luego se ligó con un fragmento de ADN de región codificante de neomicina cortada del vector pZem228 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA; ATCC depósito N° 69446) con las mismas enzimas de restricción (BclI y SfuI).

5 Este nuevo vector se denominó pZP7N, en el que la región codificante para el marcador selectivo DHFR se sustituyó por la región codificante para un marcador selectivo de neomicina del vector pZem228. Un fragmento de relleno que incluye un sitio XhoI se añadió a pZP7N para crear un vector adecuado para la clonación de alta eficacia de ADNc; este nuevo vector se denominó pZP7NX. Para preparar el vector para ADNc, se digirieron 20 µg de pZP7NX con 20 unidades de EcoRI (Life Technologies Gaithersburg, MD) y 20 unidades de XhoI (Boehringer Mannheim Indianápolis, IN) durante 5 horas a 37 °C, luego 68 °C durante 15 minutos. La digestión se pasó luego sobre un gel de agarosa 1XTAE de bajo punto de fusión al 0,8 % gel para separar el relleno del vector. La banda del vector se cortó y se digirió con "beta-Agarase" (New England Biolabs, Beverly, MA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras la precipitación en etanol se resuspendió el vector digerido en agua hasta 45 ng/ml en preparación para ligación de biblioteca de ADNc seleccionado CD3+ descrita a continuación.

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

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

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

45 La síntesis de la segunda cadena se realizó en el ADNc de primera cadena en condiciones que promovían el cebado de primera cadena de la síntesis de la segunda cadena dando como resultado la formación de horquilla de ADN. La reacción de segunda cadena contenía 98 µl del ADNc de primera cadena, 30 µl de 5x tampón de polimerasa I (Tris: HCl 100 mM, pH 7,5, KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM), 2 µl de ditiotreitól 100 mM, 6 µl de una solución que contenía 10 mM de cada uno de desoxinucleótido trifosfato, 5 µl de b-NAD 5 mM, 1 µl de 3 U/µl de ADN ligasa de *E. coli* (New England Biolabs Inc.) y 4 µl de 10 U/µl de ADN polimerasa I de *E. coli* (New England Biolabs Inc.). La reacción se montó a temperatura ambiente y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos seguido por la adición de 4 µl de 3,8 U/µl de ARNasa H (Life Technologies). La reacción se incubó a 15 °C durante dos horas seguido por una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 10 µl de TRIS 1 M pH 7,4 a la reacción y se extrajeron dos veces con fenol/cloroformo y una vez con cloroformo, las fases orgánicas se extrajeron de nuevo luego con 50 µl de TE (TRIS 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM), se reunieron con la otra fase acuosa y se precipitaron en etanol en presencia de acetato de sodio 0,3 M. El sedimento se lavó con 100 µl de etanol al 70 % se secó al aire y se resuspendió en 40 µl de agua.

60 El ADN monocatenario de la estructura de horquilla se escindió usando nucleasa de judía mungo. La mezcla de reacción contenía 40 µl de ADNc de segunda cadena, 5 µl de 10x tampón de nucleasa de judía mungo (Life technologies), 5 µl de nucleasa de judía mungo (Pharmacia Biotech Corp.) diluidos hasta 1 U/µl en 1X tampón nucleasa de judía mungo. La reacción se incubó a 37 °C durante 45 minutos. La reacción se terminó mediante la adición de 10 µl de Tris: HCl 1 M, pH 7,4 seguido por extracciones secuenciales con fenol/cloroformo y cloroformo tal como se describió anteriormente. Tras las extracciones, el ADNc se precipitó en etanol en presencia de acetato de sodio 0,3 M. El sedimento se lavó con 100 µl de etanol al 70 % se secó al aire y se resuspendió en 38 µl de agua. Se hicieron romos los extremos del ADNc resuspendido con ADN polimerasa de T4. El ADNc, que se resuspendió

en 38 µl de agua, se mezcló con 12 µl de 5x tampón de ADN polimerasa de T4 (Tris:HCl 250 mM, pH 8,0, KCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM), 2 µl de ditioneitol 0,1 M, 6 µl de una solución que contenía 10 mM de cada uno de desoxinucleótido trifosfato y 2 µl de 1 U/µl ADN polimerasa de T4 (Boehringer Mannheim Corp.). Tras una incubación de 45 minutos a 15 °C, la reacción se terminó mediante la adición de 30 µl de TE seguido por extracciones secuenciales de fenol/cloroformo y cloroformo y se extrajo de nuevo con 20 µl de TE tal como se describió anteriormente. El ADN se precipitó en etanol en presencia de 2 µl de vehículo Pellet Paint™ (Novagen) y acetato de sodio 0,3 M y se resuspendió en 11 µl de agua.

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

Para facilitar la clonación direccional del ADNc en un vector de expresión, el ADNc se digirió con XhoI, dando como resultado un ADNc que tiene un extremo cohesivo de Eco RI en 5' y un extremo cohesivo de XhoI en 3'. El sitio de restricción XhoI en el extremo 3' del ADNc se ha introducido previamente usando el cebador ZC18698 (SEC ID N°: 31). La digestión con enzima de restricción se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía 35 µl de la mezcla de ligación descrita anteriormente, 6 µl de 10x tampón H (Boehringer Mannheim Corp.), 1 µl de BSA 2 mg/ml (Biolabs Corp.), 17 µl de agua y 1,0 µl de 40 U/µl de XhoI (Boehringer Mannheim). La digestión se llevó a cabo a 37 °C durante 1 hora. La reacción se terminó mediante incubación a 68 °C durante 15 minutos seguido por precipitación en etanol, lavado secado tal como se describió anteriormente y resuspensión en 30 µl de agua.

El ADNc resuspendido se calentó hasta 65 °C durante 5 minutos y se enfrió sobre hielo, se añadieron 4 µl de 5X de gel loading dye (Research Genetics Corp.), se cargó el ADNc en un gel de agarosa 1X TAE de bajo punto de fusión al 0,8 % (SEA PLAQUE GTG™ agarosa de bajo punto de fusión; FMC Corp.) y se sometió a electroforesis. Los adaptadores contaminantes y ADNc por debajo de 0,6 Kb de longitud se cortaron del gel. Los electrodos se invirtieron, se añadió agarosa fundida para llenar los pocillos, el tampón se cambió y el ADNc se sometió a electroforesis hasta que se concentró cerca del origen del carril. El área del gel que contenía el ADNc concentrado se cortó y se colocó en un tubo de microcentrífuga, y la agarosa se fundió calentando hasta 65 °C durante 15 minutos. Tras equilibrar la muestra hasta 45 °C, se añadieron 2 µl de 1 U/µl Beta-agarase I (Biolabs, Inc.), y se incubó la mezcla durante 90 min. a 45 °C para digerir la agarosa. Tras la incubación, se añadió 1 décimo del volumen de acetato de Na 3 M a la muestra, y se incubó la mezcla sobre hielo durante 15 minutos. La muestra se centrifugó a 14.000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar agarosa sin digerir, el ADNc se precipitó en etanol, se lavó en etanol al 70 %, se secó al aire y se resuspendió en 40 µl de agua.

Para determinar la relación óptima de ADNc con respecto a vector se ensamblaron varias ligaciones y se sometieron a electroporación. En resumen, se digirieron 2 µl de 5X tampón de ligasa de T4 (Life Technologies), 1 µl de ATP 10 mM, 1 µl de pZP7NX con EcoRI-XhoI, 1 µl de ADN ligasa de T4 diluido hasta 0,25 u/µl (Life Technologies) de agua hasta 10 µl y 0,5, 1,2 ó 3 µl de ADNc se mezclaron en 4 ligaciones separadas, se incubaron a 22 °C durante 4 horas, 68 °C durante 20 minutos, se precipitó en acetato de sodio-etanol, se lavó, se secó y se resuspendió en 10 µl. Un único microlitro de cada ligación se sometió a electroporación en 40 µl de bacterias electrocompetentes DH10b ElectroMax™ (Life Technologies) usando una cubeta de 0,1 cm (Biorad) y un controlador de impulsos Genepulser™ (Biorad) fijado a 2,5 KV, 251 F, 200 ohmios. Estas células se resuspendieron inmediatamente en 1 ml de caldo SOC (Manniaty y col. citado anteriormente) seguido por 500 µl de glicerol-SOC al 50 % como conservante. Estas "soluciones madre de glicerol" se congelaron en varias alícuotas a -70 °C. Se descongeló una alícuota de cada y se sembró en placa en serie sobre placas de agar LB complementado con ampicilina a 100 µg/ml. Los números de colonias indicaban que la relación óptima de ADNc de CD3+ con respecto a vector pZP7NX era de 1 µl con respecto a 45 ng; una ligación de este tipo proporcionó 4,5 millones de clones primarios.

Para el objetivo de seleccionar la biblioteca usando un ensayo de proliferación basado en BaF3 (ejemplo 5) se diluyeron soluciones madre de glicerol anteriores en cultivos líquidos de 100 ó 250 clones por conjunto en placas de microtitulación de pocillos profundos, se hicieron crecer 24 horas a 37 °C con agitación y se aisló el plásmido usando un kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Tal ADN se transfectó posteriormente en células BHK, se condicionaron los medios durante 72 horas, se recogió y se almacenó a -80 °C, y posteriormente se colocó en 5K células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta durante 72 horas tras lo cual se evaluó la proliferación usando un ensayo de fluorescencia de "Alamar blue" (ejemplo 5B y ejemplo 2B).

### Ejemplo 7

#### *Clonación de la expresión de zcytor17lig humano*

Las soluciones madre de glicerol de la biblioteca de células seleccionadas CD3+ humanas activadas (ejemplo 6) se

añadieron a Super Broth II™ (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) + ampicilina (amp) 0,1 mg/ml a una concentración de 250 células por 800 microlitros. Las *E. coli* se dejaron equilibrar durante 24 horas a temperatura ambiente. En el momento de la inoculación, se sembraron en placa 400 microlitros sobre placas de LB + amp para determinar el título real de la inoculación. Tras 24 horas se contaron las placas y luego se ajustó la concentración final de SuperBrothII™ + *E. coli* de modo que la concentración final era de 250 células por 1,2 ml. Se inocularon 2 litros tres veces para un total de 6 litros. Luego se sembraron en placa los medios en bloques de pocillos profundos de 96 pocillos (Qiagen). La siembra en placa se realizó en el canal 8 del dispensador Q-Fill2™ (Genetix, Christchurch, Dorset, UK). Las *E. coli* se hicieron crecer durante la noche a 37 °C agitando a 250 rotaciones/min. en un agitador multitier environment New Brunswick Scientific Innova 4900. Las *E. coli* se separaron por centrifugación de la solución a 3000 rpm, usando una centrífuga Beckman GS-6KR. Estos sedimentos de *E. coli* se congelaron a -20 °C o se usaron nuevos antes de someter a miniprep el ADN de plásmido. Cada sedimento contiene aproximadamente 250 clones de ADNc de la biblioteca de células seleccionadas CD3+ humanas.

Estos conjuntos de 250 clones de ADNc se sometieron luego a miniprep usando el kit QIAprep™ 96 Turbo Miniprep (Qiagen). Se eluyó el ADN de plásmido usando 125 µl de TE (Tris pH 8 10 mM, EDTA 1 mM). Este ADN de plásmido se usó luego para transfectar células BHK.

#### *Transfección de BHK*

Células BHK se sembraron en placa en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a una densidad de 12.000 células por pocillo en un volumen de 100 µl, por pocillo. El medio de cultivo fue DMEM (GibcoBRL), suero bovino fetal inactivado por calor al 5 %, L-glutamina 2 mM (GibcoBRL), 1X PSN (GibcoBRL), piruvato de Na 1 mM (GibcoBRL).

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

Una mezcla de ADN/Lipofectamine™ se preparó tal como sigue: se combinaron 2,2 µl de reactivo Lipofectamine™ (Gibco/BRL) con 102,8 µl de SFA a temperatura ambiente; luego se añadieron aproximadamente 5 µl del ADN de plásmido (200 ng/µl) a Lipofectamine™/SFA para formar la mezcla ADN/Lipofectamine™, que se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se retiró el SFA de las células BHK y las células se incubaron con 50 µl de la mezcla ADN/lipofectamine™ durante 5 horas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se añadieron cincuenta µl de la mezcla ADN/Lipofectamine™ a cada uno de dos pocillos de las células BHK, de modo que las transfecciones se realizaron por duplicado.

Después de que las células BHK se incubaron con la mezcla ADN/Lipofectamine™ durante 5 horas, se retiró la mezcla ADN/Lipofectamine™ y se añadieron 100 µl de medios de cultivo. Las células se incubaron durante la noche, se retiraron los medios y se reemplazaron con 100 µl de medios de cultivo. Tras cultivar las células durante 48-72 horas, se retiraron los medios condicionados, se congelaron a -80 °C durante un mínimo de 20 minutos, se descongelaron, y luego se sometieron a ensayo 50 µl en el ensayo de proliferación de Baf3, descrito en el ejemplo 5, para identificar conjuntos de 250 clones con actividad de ligando.

Veinte placas de 96 pocillos se seleccionaron en un único ensayo. Esto representaba aproximadamente 250 ADNc/pocillo o 480.000 de ADNc totales. De éstos, medios condicionados de aproximadamente 60 pocillos (que representa 250 ADNc por pocillo) resultaron positivos en el ensayo de proliferación. Uno de estos conjuntos positivos se eligió para descomponer y aislar un único ADNc que codificaría para el zcytor17lig. Éste fue el conjunto 62A12.

Para el conjunto 62A12, se usó 1 µl de ADN para transformar células DH10B de ElectroMax™ (Gibco/BRL) mediante electroporación. Los transformantes se sembraron en placa sobre placas de LB + amp (100 µg/ml) para dar colonias individuales. A partir del conjunto electroporado, se seleccionaron 672 colonias individuales picando en siete placas de 96 pocillos que contenían 1,2 ml de SuperBrothII™ por pocillo. Estas placas se enumeraron de #62.1 a #62.7. Éstas se cultivaron durante la noche y el ADN de plásmido se sometió a miniprep tal como anteriormente. Para las siete placas, se transfectó ADN de plásmido de las placas descompuestas en células BHK y se sometió a ensayo mediante proliferación tal como anteriormente, excepto porque las transfecciones no se realizaron por duplicado.

Se identificaron dos clones positivos 62.6C7 y 62.6E9 mediante la actividad de un total de 672 clones. El ADN de plásmido sometido a miniprep del clon 62.6E9 se secuenció y se obtuvo identificación de tanteo, pero se obtuvo una secuencia mixta de estos clones positivos. Para aislar adicionalmente el ADNc de zcytor17lig en un único clon, se usó 1 µl de ADN del conjunto 62.6E9 para electroporar células DH10B y los transformantes se sembraron en placa en placas de LB + amp (100 µg/ml) dando colonias individuales. Se secuenció ADN de plásmido sometido a miniprep de varias colonias dando la secuencia de ADN exacta. La secuencia de polinucleótido de zcytor17lig era de longitud completa (SEC ID N°: 1) y se muestra su secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N°: 2).

#### 65 Ejemplo 8

*Construcción de vectores de expresión de mamífero que expresan receptores solubles de zcytor17: zcytor17CEE, zcytor17CFLG, zcytor17CHIS y zcytor17-Fc4*

5 *A. Construcción de vector de expresión de mamífero de zcytor17 que contiene zcytor17CEE, zcytor17CFLG y zcytor17CHIS*

Se preparó un vector de expresión para la expresión del dominio extracelular soluble del polipéptido zcytor17, pZp9zcytor17CEE, estando diseñado el constructo para expresar un polipéptido zcytor17 compuesto por la metionina de iniciación predicha y truncado adyacente al dominio transmembrana predicho, y con una etiqueta Glu-Glu C-terminal (SEC ID N°: 32).

Se generó un producto de PCR de aproximadamente 1500 pb usando ZC29,451 (SEC ID N°: 33) y ZC29,124 (SEC ID N°: 34) como cebadores de PCR para añadir sitios de restricción EcoRI y BamHI. Se usó una biblioteca de ADNc propia de HPVS humano como molde y se realizó la amplificación por PCR tal como sigue: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1,5 minutos, luego 72 °C durante 7 minutos; 10 °C de remojo. La reacción de PCR se precipitó en etanol y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. El producto de PCR digerido se purificó en gel sobre un gel de agarosa al 1,0 % y se cortó la banda de aproximadamente 1500 pb. Esta banda se volvió a amplificar luego usando cebadores idénticos con el siguiente ciclo: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 3 minutos, luego 72 °C durante 7 minutos; 10 °C de remojo. La reacción de PCR se precipitó en etanol y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. El producto de PCR digerido se purificó en gel sobre un gel de agarosa al 1,0 % y se cortó la banda de aproximadamente 1500 pb. El ADN cortado se subclonó en el plásmido CEEpZp9 que se había cortado con EcoRI y BamHI, para generar plásmido con un receptor soluble con etiqueta C terminal GLU-GLU para zcytor17, zcytor17CEEpZp9. El dominio extracelular en el ADNc de zcytor17CEE en zcytor17CEEpZp9 tiene una mutación silenciosa que cambia la T por C en la posición 1705 de la SEC ID N°: 4 (que codifica para un residuo de Pro en el residuo 403 de la SEC ID N°: 5). Debido a que esta mutación es silenciosa, el ADNc de zcytor17 en zcytor17CEEpZp9 codifica para el polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N°: 5. Además, debido a que el constructo usado, una pareja de residuos Gly-Ser se inserta de manera C terminal con respecto al extremo del dominio extracelular soluble de zcytor17 y antes de la etiqueta de Glu-Glu C terminal (SEC ID N°: 32). Como tal, la etiqueta en el extremo C terminal del dominio extracelular de zcytor17, era una etiqueta de Glu-Glu tal como se muestra en (SEC ID N°: 17). El plásmido CEEpZp9 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de metalotioneína-1 de ratón, sitios de restricción múltiples para la inserción de secuencias codificantes, y un terminador de hormona del crecimiento humano. El plásmido tiene también un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador de SV40. Usando técnicas de biología molecular convencionales zcytor17CEEpZp9 se sometió a electroporación en células competentes DH10B (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) según las instrucciones de fabricante y se sembraron en placa sobre placas de LB que contenían ampicilina 100 µg/ml, y se incubaron durante la noche. Las colonias se seleccionaron mediante análisis de restricción, o PCR de ADN preparado a partir de colonias individuales. La secuencia de inserto de clones positivos se verificó mediante análisis de secuencia. Se realizó una preparación de plásmido a gran escala usando un kit QIAGEN® Maxi prep (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

Se usa el mismo proceso para preparar los receptores solubles de zcytor17 con una cola de his C terminal, compuesta por 6 residuos de His en una fila; y una etiqueta FLAG® C terminal (SEC ID N°: 36), zcytor17CFLAG. Para construir estos constructos, el vector mencionado anteriormente tiene o bien la cola de HIS o bien la etiqueta FLAG® en lugar de la etiqueta de glu-glu (por ejemplo, SEC ID N°: 17; SEC ID N°: 32 o SEC ID N°: 35).

50 *B. Construcción de la expresión de mamífero del receptor de zcytor17 humano soluble: zcytor17-Fc4*

Un vector de expresión, pEZE-2 hzcytor17/Fc4, se preparó para expresar una versión soluble con etiqueta de Fc4 C terminal de hzcytor17 (zcytor17-Fc4 humano) en células PF CHO. Las células PF CHO son una línea de células CHO propia adaptada para el crecimiento en medio libre de proteínas (medio ExCell 325 PF; JRH Biosciences). La línea de células CHO propia se derivaba originalmente de células CHO DG44 (G. Urlaub, J. Mitchell, E. Kas, L.A. Chasin, V.L. Funanage, T.T. Myoda y J.L. Hamlin, "The Effect Of Gamma Rays at the Dihydrofolate Reductase Locus: Deletions and Inversions", Somatic Cell y Molec. Genet., 12: 555-566 (1986). Un fragmento de ADNc de zcytor17 que incluye la secuencia de polinucleótido del dominio extracelular del receptor de zcytor17 se fusionó en marco con la secuencia de polinucleótido de Fc4 (SEC ID N°: 37) para generar una fusión de zcytor17-Fc4 (SEC ID N°: 38 y SEC ID N°: 39). El vector pEZE-2 es un vector de expresión de mamífero que contiene la secuencia de polinucleótido de Fc4 y un sitio de clonación que permite la rápida construcción de fusiones de Fc4 C terminales usando técnicas de biología molecular convencionales.

Un fragmento de 1566 pares de bases se generó mediante PCR, conteniendo el dominio extracelular de zcytor17 humano y los dos primeros aminoácidos de Fc4 (Glu y Pro) con sitios FseI y BglII codificados en los extremos 5' y 3', respectivamente. Este fragmento de PCR se generó usando los cebadores ZC29,157 (SEC ID N°: 40) y ZC29,150 (SEC ID N°: 41) mediante amplificación a partir de un plásmido que contenía el dominio extracelular de zcytor17

humano (pZp9zcytor17CEE) (ejemplo 8). Las condiciones de reacción de PCR fueron las siguientes: 25 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 1 minuto, y 72 °C durante 2 minutos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos; seguido por 4 °C de remojo. El fragmento se digirió con las endonucleasas de restricción Fsel y BgIII y posteriormente se purificó mediante electroforesis en gel al 1 % y purificación de banda usando el kit de extracción en gel QiaQuick (Qiagen). El ADN purificado resultante se ligó durante 5 horas a temperatura ambiente en un vector pEZE-2 previamente digerido con Fsel y BgIII que contenían Fc4 3' de los sitios Fsel y BgIII.

Dos µl de la mezcla de ligación se sometieron a electroporación en 37 µl de *E. coli* electrocompetentes DH10B (Gibco) según las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se diluyeron en 400 µl de medios LB y se sembraron en placa sobre placas de LB que contenían ampicilina 100 µg/ml. Los clones se analizaron mediante digestiones de restricción y los clones positivos se enviaron para la secuenciación de ADN para confirmar la secuencia del constructo de fusión. 1 µl de un clon positivo se transformó en 37 µl de *E. coli* electrocompetentes DH10B y se rayaron sobre una placa de LB/amp. Se picó una única colonia de esta placa rayada para iniciar un cultivo de 250 ml de LB/amp que luego se hizo crecer durante la noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. Este cultivo se usó para generar 750 µg de ADN purificado usando un kit Qiagen plasmid Maxi (Qiagen).

### Ejemplo 9

#### *Transfección y expresión de polipéptidos de receptor soluble de zcytor17*

Células BHK 570 (ATCC N° CRL-10314), DG-44 CHO, u otras células de mamífero se siembran en placa a aproximadamente 1,2X10<sup>6</sup> células/pocillo (placa de 6 pocillos) en 800 µl de medio libre de suero (SF) apropiado (por ejemplo, DMEM, Gibco/BRL High Glucose) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Las células se transfectaron con plásmidos de expresión que contenían zcytor17CEE, zcytor17CFLG, zcytor17CHIS o zcytor17-Fc4 (ejemplo 8), usando Lipofectin™ (Gibco BRL), en medio libre de suero (SF) según las instrucciones del fabricante. Clones individuales que expresan los receptores solubles se aíslan, se seleccionan y se hacen crecer en medios de cultivo celular, y se purifican usando técnicas convencionales.

#### *A. Expresión de mamífero de receptor zcytor17CEE humano*

Células BHK 570 (ATCC NO: CRL-10314) se sembraron en placa en frascos de cultivo tisular T-75 y se dejó que crecieran hasta aproximadamente del 50 al 70 % de confluencia a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, en medios DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL High Glucose, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), suero bovino fetal al 5 %, L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenea, KS), piruvato de sodio 1 mM (Gibco BRL)). Las células se transfectaron luego con el plásmido que contenía zcytor17CEE (ejemplo 8) usando Lipofectamine™ (Gibco BRL), en formulación de medio libre de suero (SF) (DMEM, transferrina 10 mg/ml, insulina 5 mg/ml, fetuina 2 mg/ml, L-glutamina al 1 % y piruvato de sodio al 1 %). Diez µg del ADN de plásmido pZp9zcytor17CEE (ejemplo 8) se diluyeron en un tubo de 15 ml hasta un volumen final total de 500 µl con medios SF. Se mezclaron 50 µl de Lipofectamine con 450 µl de medio SF. La mezcla de Lipofectamine se añadió a la mezcla de ADN y se dejó incubar durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Cuatro ml de medios SF se añadieron a la mezcla de ADN:Lipofectamine. Las células se enjuagaron una vez 5 ml de medios SF, se aspiraron, y se añadió la mezcla de ADN:Lipofectamine. Las células se incubaron a 37 °C durante cinco horas, y luego se añadieron 5 ml de medios DMEM/FBS al 10 %. El frasco se incubó a 37 °C durante la noche tiempo tras el que las células se separaron en los medios de selección (medios DMEM/FBS anteriores con la adición de metotrexato 1 µM o metotrexato 10 µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) en placas de 150 mm a 1:2, 1:10, y 1:50. Aproximadamente 10 días tras la transfección, se tripsinizó una placa de 150 mm de colonias resistentes a metotrexato 1 µM, se reunieron las células, y se volvieron a sembrar en placa la mitad de las células en metotrexato 10 µM; para amplificar adicionalmente la expresión de la proteína zcytor17CEE. Una muestra de medios condicionados de este conjunto de células amplificadas se sometió a prueba para determinar los niveles de expresión usando SDS-PAGE y análisis de tipo Western.

#### *B. Expresión de mamífero de receptor zcytor17Fc4 humano soluble*

Cinco duplicados de 200 µg de ADN de plásmido pEZE-2hzcytor17Fc4 (ejemplo 8) se alinearon mediante digestión de restricción con FspI, una enzima de restricción que corta una vez dentro del vector y no perturba genes necesarios para la expresión. Se añadieron 200 µg de ADN genómico de células CHO a cada duplicado como ADN portador y luego se precipitó el ADN mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2,2 volúmenes de etanol seguido por una incubación en hielo de 15 minutos y microcentrifugación a 4 °C. Los sedimentos de ADN resultantes se lavaron en etanol al 70 % y se secaron al aire antes de resuspenderse en 100 µl de medios de crecimiento de no selección de CHO libres de proteína (PF) (PF CHO Ex Cell 325 21 g/l-glutamina 200 mM (Gibco)/ piruvato de sodio 100 mM (Gibco)/1x HT Supplement (Gibco). Diez millones de células PF CHO passage 61 se añadieron al ADN en 600 µl de medios de crecimiento de no selección de CHO PF y luego se sometieron a electroporación en un sistema de electroporación Gene Pulser II (BioRad) usando capacitancia de 950 PF y 300 Kv usando una cubeta de electroporación Gene Pulser de 0,4 cm de hueco (BioRad). Los 5 duplicados de las células sometidas a electroporación se reunieron y se seleccionaron directamente en medios -HT (PF CHO Ex Cell 325 21 g/l-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato de sodio 100 mM (Gibco). Las células se seleccionaron durante

15 días en medios -HT antes de pasarse a  $4 \times 10^5$  ml en selección de MTX 50 nm. Ocho días más tarde las células se sembraron a  $3,5 \times 10^5$  células/ml en selección de MTX 200 nM. Tras una semana, las células se sembraron a  $4 \times 10^5$  células/ml en selección de MTX 1  $\mu$ M. Tras dos semanas a MTX 1  $\mu$ M, las células se sembraron a  $1 \times 10^6$  células/ml en 50 ml para generar medio condicionado. Los medios condicionados durante 72 horas resultantes se analizaron mediante exploración de inmunotransferencias de tipo Western con un anticuerpo generado frente a Ig humana. Las células produjeron proteína zcytor17/Fc4 a aproximadamente 1 mg/l.

#### C. Expresión de mamífero a mayor escala de receptor zcytor17-Fc4 humano soluble

10 Doscientos microgramos de ADN de plásmido pEZE-2hzcytor17Fc4 (ejemplo 8) se alinearon mediante digestión de restricción con Fspl, una enzima de restricción que corta una vez dentro del vector pEZE-2 y que no perturba los genes necesarios para la expresión. Se añadieron 200  $\mu$ g de ADN genómico de CHO (preparado *in situ*) como ADN portador y luego se precipitó el ADN mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol seguido por microcentrifugación a temperatura ambiente. Se prepararon cinco duplicados de sedimentos de ADN y se transformaron. El sedimento de ADN resultante se lavó en etanol al 70 % y se secó al aire antes de resuspenderse en 100  $\mu$ l de medios de crecimiento de no selección de CHO PF (PF CHO Ex Cell 325 21 g/l-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato de sodio 100 mM (Gibco)/1x HT Supplement (Gibco). Diez millones de células PF CHO se añadieron al ADN en 600  $\mu$ l de medios de crecimiento de no selección de CHO PF y luego se sometieron a electroporación en un sistema de electroporación Gene Pulser II (BioRad) usando capacitancia de 950 PF y 300 voltios usando una cubeta de electroporación de 0,4 cm de hueco Gene Pulser (BioRad). Las células sometidas a electroporación se reunieron y se pusieron directamente en la selección en medios -HT (PF CHO Ex Cell 325 21 g/l-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato de sodio 100 mM (Gibco). Las células se seleccionaron durante 14 días en medios -HT antes de pasarse a  $4 \times 10^5$ /ml en selección de MTX 50 nm. Las células se amplificaron hasta MTX 200 nM y luego hasta MTX 1  $\mu$ M. Los conjuntos de -HT, 50 nM, y 1  $\mu$ M se sembraron a  $1 \times 10^6$  c/ml durante 48 horas, y los medios condicionados resultantes se analizaron mediante exploración de inmunotransferencias de tipo Western con un anticuerpo generado contra Ig humana.

#### Ejemplo 10

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

##### A. Expresión de mamífero transitoria y purificación de receptor zcytor17-Fc4 humano soluble

35 ADN de plásmido pEZE-2hzcytor17Fc4 (ejemplo 11B) se introdujo en 40 maxi placas de células BHK usando Lipofectamine (Gibco BRL) tal como se describe en el presente documento y según las instrucciones del fabricante. Se dejó que las células se recuperaran durante la noche, luego se enjuagaron y se volvieron a alimentar con medio libre de suero (SL7V4, preparado *in situ*). Tras 72 horas, los medios se recogieron y se filtraron, y las células se volvieron a alimentar con medio libre de suero. Tras 72 horas, los medios se recogieron de nuevo y se filtraron.

40 Los medios condicionados libres de suero (lotes 2 x 1,5 l) de células BHK transfectadas de manera transitoria se bombearon sobre una columna de proteína A-agarosa de 1,5 ml en Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M. La columna se lavó extensamente con este tampón y luego se eluyó la proteína unida con 1 ml de glicina 0,2 M, pH 2,5, NaCl 0,5 M. La proteína eluida se recogió en 0,1 ml de Tris 2 M, pH 8,5.

45 Se recogieron alícuotas para electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y se dializó zcytor17-Fc a granel durante la noche frente a PBS. El receptor soluble se esterilizó por filtración y se colocó en alícuotas a -80 °C.

##### B. Purificación de zcytor17-Fc4

50 Se produjo zcytor17 con etiqueta de Fc4 carboxilo terminal recombinante (ejemplo 8 y ejemplo 9) a partir de células CHO transfectadas. La transfección de CHO se realizó usando procedimientos conocidos en la técnica. Aproximadamente cinco litros de medios condicionados se recogieron y se esterizaron por filtración usando filtros Nalgene de 0,2  $\mu$ m.

55 Se purificó proteína a partir de los medios filtrados mediante una combinación de cromatografía de afinidad de proteína A Poros 50 (PerSeptive Biosystems, 1-5559-01, Framingham, MA) y columna de cromatografía de exclusión en gel Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). El medio de cultivo se cargó directamente en una columna de afinidad de proteína A de 10x70 mm (volumen de lecho de 5,5 ml) a un flujo de aproximadamente 3-10 ml/minuto. Tras lavar la columna para diez volúmenes de columna de PBS, se eluyó la proteína unida mediante cinco volúmenes de columna de glicina 0,1 M, pH 3,0 a 10 ml/minuto). Fracciones de 2 ml cada una se recogieron en tubos que contenían 100  $\mu$ l de Tris 2,0 M, pH 8,0, con el fin de neutralizar las proteínas eluidas. Se analizaron muestras de la columna de afinidad mediante SDS-PAGE con tinción con coomassie y se sometieron a transferencia de tipo Western para determinar la presencia de zcytor17-Fc4 usando Ig-HRP humano. Las fracciones que contenían zcytor17-Fc4 se reunieron y se concentraron hasta 1-2 ml usando el concentrador Biomax-30 (Millipore), y se cargaron en una columna de filtración en gel de 20x580 mm Superdex 200. Las

fracciones que contenían zcytor17-Fc4 purificado se reunieron, se filtraron a través de filtro de 0,2 µm, se separaron en alícuotas de 100 µl cada una, y se congelaron a -80 °C. La concentración de la proteína purificada final se determinó mediante ensayo de BCA (Pierce, Rockford, IL).

#### 5 C. Análisis de SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western de zcytor17/Fc4

Se analizó zcytor17-Fc4 recombinante mediante SDS-PAGE (Nupage 4-12 %, Invitrogen, Carlsbad, CA) con procedimiento de tinción con coomassie e inmunotransferencia de tipo Western usando Ig-HRP humano. O bien los medios condicionados o bien la proteína purificada se sometió a electroforesis usando un Invitrogen Novex's Xcell II mini-cell, y se transfirió a nitrocelulosa (0,2 mm; Invitrogen, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente usando el módulo de transferencia Novex's Xcell II con agitación según las instrucciones proporcionadas en el manual del instrumento. La transferencia se realizó a 500 mA durante una hora en un tampón que contenía base Tris 25 mM, glicina 200 mM, y metanol al 20 %. Los filtros se bloquearon luego con leche en polvo desnatada al 10 % en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. La nitrocelulosa se enjuagó rápidamente, luego se añadió el anticuerpo Ig-HRP humano (1:2000) en PBS que contenía leche en polvo desnatada al 2,5 %. Las transferencias se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente, o durante la noche a 4 °C, con agitación suave. Tras la incubación, las transferencias se lavaron tres veces durante 10 minutos cada una en PBS, luego se enjuagaron rápidamente en H<sub>2</sub>O. Las transferencias se revelaron usando reactivos de sustrato quimioluminiscente comercialmente disponibles (reactivos Super-Signal® ULTRA 1 y 2 mezclados 1:1; reactivos obtenidos de Pierce, Rockford, IL), y la señal se capturó usando el software Lumi-Imager's Lumi Analyst 3.0 (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) durante tiempos de exposición que oscilaban entre 10 segundos y 5 minutos o según sea necesario.

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

#### Ejemplo 11

*Ensayo usando receptor soluble de zcytor17 receptor soluble zcytor17-Fc4 en ensayo de inhibición competitivo*

Células BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRbeta o células BaF3/zcytor17/OSMRbeta se centrifugaron y se lavaron en medios libres de mL-3. Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para garantizar la eliminación de la mL-3. Luego se contaron las células en un hemocitómetro. Las células se sembraron en placa en formato de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando los medios libres de mL-3.

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

Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 3-5 días momento en el que se añadió Alamar Blue (Accumed) a 20 µl/pocillo. Las placas se incubaron de nuevo a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 16-24 horas. Las placas se leyeron en el lector de placas Fmax™ (Molecular Devices) tal como se describe en el ejemplo 2. Los resultados demostraron la inhibición parcial del crecimiento celular con el receptor soluble zcytor17-Fc4 a 10 µg/ml, lo que confirma que el factor en cada muestra era específico del receptor de zcytor17.

Las curvas de valoración, diluyendo el receptor soluble, o heterodímeros y trímeros de receptor soluble que comprenden el receptor de zcytor17 (por ejemplo, zcytor17/OSMR, zcytor17/WSX-1, o zcytor17/OSMR/WSX-1, u otras subunidades de receptor de citocina de clase I) se realizan también usando el ensayo indicado anteriormente para determinar si los receptores de zcytor17 pueden inhibir completamente el crecimiento, por ejemplo, a concentraciones bajas o fisiológicas.

#### Ejemplo 12

*Ensayo de trampa de secreción*

Se usa un ensayo de trampa de secreción para someter a prueba la unión del zcytor17lig a receptores que comprenden el receptor de zcytor17, tal como el receptor de zcytor17 o heterodímeros y trímeros de receptor que comprenden receptor de zcytor17 (por ejemplo, zcytor17/OSMR, zcytor17/WSX-1, o zcytor17/OSMR/WSX-1, u otras subunidades de receptor de citocina de clase I). ADN de plásmido de zcytor17lig se transfecta en células COS, y se usa para evaluar la unión del zcytor17lig a receptores que comprenden el receptor de zcytor17 mediante trampa de secreción tal como se describe a continuación.

#### 65 A. Transfecciones de células COS



La transfección de células COS se realiza tal como sigue: mezclar aproximadamente 800 ng de ADNc de zcytor17lig y 5 µl de Lipofectamine™ en 92 µl de medios DMEM libres de suero (55 mg de piruvato de sodio, 146 mg de L-glutamina, 5 mg de transferrina, 2,5 mg de insulina, 1 µg de selenio y 5 mg de fetuina en 500 ml de DMEM), incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego añadir 400 µl de medios DMEM libres de suero. Añadir esta  
 5 mezcla de 500 µl en 1,5x10<sup>5</sup> células COS/pocillo sembradas en placa sobre placa de cultivo tisular de 12 pocillos e incubar durante 5 horas a 37 °C. Añadir 500 µl de medios DMED FBS al 20 % (100 ml de FBS, 55 mg de piruvato de sodio y 146 mg de L-glutamina en 500 ml de DMEM) e incubar durante la noche.

#### B. Ensayo de trampa de secreción

La trampa de secreción se realiza tal como sigue: los medios se eliminan por enjuague de las células con PBS y luego se fija durante 15 minutos con formaldehído al 1,8 % en PBS. Las células se lavan luego con TNT (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, y Tween-20 al 0,05 % en H<sub>2</sub>O), y se permea con Triton-X al 0,1 % en PBS durante 15 minutos, y se lava de nuevo con TNT. Las células se bloquean durante 1 hora con TNB (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y reactivo de bloqueo al 0,5 % (NEN Renaissance TSA-Direct Kit) en H<sub>2</sub>O), y se lavaron de nuevo con TNT. Si se usa la proteína de receptor biotinilada, las células se bloquean durante incubaciones de 15 minutos con avidina y luego biotina (Vector Labs) lavando entremedias con TNT. Dependiendo de qué receptor soluble se usa, las células se incuban durante 1 hora en TNB con: (A) soluble receptor proteína de fusión zcytor17-Fc4 de receptor soluble de zcytor17 1-3 µg/ml (ejemplo 10); (B) proteína de receptor soluble zcytor17/OSMRbeta 1-3 µg/ml; (C) proteína de receptor soluble zcytor17/WSX-1 1-3 µg/ml; o (D) proteína de receptor soluble zcytor17/OSMR/WSX-1 1-3 µg/ml. Las células se lavan luego con TNT. Dependiendo de qué receptor soluble se use (por ejemplo, si está marcado con una etiqueta de Fc4 (SEC ID N°: 37), etiqueta FLAG C terminal (SEC ID N°: 36), o etiqueta CEE (SEC ID N°: 32; SEC ID N°: 35)), las células se incuban durante una hora más con: (A) Ig-HRP de cabra anti-ser humano diluido 1:200 (específico de Fc); (B) M2-HRP diluido 1:1000; (C) anticuerpo-HRP anti-GluGlu diluido 1:1000; o (D) estreptavidina-HRP (NEN kit) en TNB diluido 1:300, por ejemplo. Se lavan las células de nuevo con TNT.

Se detecta unión positiva con reactivo de tiramida fluoresceína diluido 1:50 en tampón de dilución (kit NEN) y se incubó durante 4-6 minutos, y se lavaron con TNT. Las células se conservan con medios Vectashield (Vector Labs Burlingame, CA) diluido 1:5 en TNT. Las células se visualizan usando un filtro de FITC en el microscopio de fluorescencia.

#### Ejemplo 13

##### Asignación cromosómica y colocación de la secuencia génica para el zcytor17lig

La secuencia génica de zcytor17lig se mapeó con el cromosoma humano 12 usando la versión comercialmente disponible del "Stanford G3 Radiation Hybrid Mapping Panel" (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). El "Stanford G3 RH Panel" contiene ADN de cada uno de 83 clones híbridos de radiación del genoma humano completo, más dos ADN control (el donante RM y el receptor A3). Un servidor WWW disponible al público (por ejemplo, Stanford University) permite la ubicación cromosómica de marcadores y genes.

Para el mapeo de la secuencia génica de zcytor17lig con el "Stanford G3 RH Panel", se establecieron reacciones de 20 µl en una placa de microtitulación de 96 pocillos compatible para PCR (Stratagene, La Jolla, CA) y se usaron en un ciclador térmico "RoboCycler Gradient 96" (Stratagene). Cada una de las 95 reacciones de PCR consistía en 2 µl de 10X tampón de reacción de PCR (Qiagen, Inc., Valencia, CA), 1,6 µl de mezcla de dNTPs (2,5 mM cada uno, PERKIN-ELMER, Foster City, CA), 1 µl de cebador sentido, ZC41,458 (SEC ID N°: 42), 1 µl de cebador antisentido, ZC41,457 (SEC ID N°: 43), 2 µl de "RediLoad" (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL), 0,1 µl de HotStarTaq ADN Polimerasa de Qiagen (5 unidades/µl), 25 ng de ADN de un clon híbrido individual o control y agua destilada para un volumen total de 20 µl. Las reacciones se recubren con una cantidad igual de aceite mineral y se sellan. Las condiciones del ciclador de PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 1 ciclo de 15 minutos a 95 °C, 35 ciclos de una desnaturalización de 45 segundos a 95 °C, hibridación de 1 minuto a 53 °C y 1 minuto y 15 segundos de extensión a 72 °C, seguido por una extensión final de 1 ciclo de 7 minutos a 72 °C. Las reacciones se separaron mediante electroforesis sobre un gel de agarosa al 2 % (EM Science, Gibbstown, NJ) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Los resultados mostraron unión de la secuencia génica de zcytor17lig con el cromosoma 12 marcador SHGC-83339 con una puntuación LOD de >11 y a una distancia de 17 cR\_10000 desde el marcador. Este marcador sitúa al gen de zcytor17lig en la región cromosómica 12q24.31.

#### Ejemplo 14

##### Identificación y clonación de zcytor17lig murino

##### A. Identificación de zcytor17lig murino de longitud completa

Usando la secuencia peptídica humana de zcytor17lig (SEC ID N°: 2) para consultar una base de datos de ADN propia, se identificó un ADNc murino, número de registro de Genbank AK005939, como una posible secuencia parcial para el zcytor17lig murino. La secuencia de ADNc AK005939 se usó para consultar una base de datos que contenía fragmentos genómicos murinos. Un cóntigo genómico del zcytor17lig murino se ensambló (SEC ID N°: 76).  
 5 La predicción del potencial codificante en este fragmento genómico con el programa Genscan reveló una secuencia de ADNc probable, con la misma estructura génica que el zcytor17lig humano. Una secuencia de ADNc murino se representa en la SEC ID N°: 10, y la secuencia de polipéptido correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 11.

#### *B. Clonación de zcytor17lig de ratón a partir de una biblioteca de ADNc de testículos de ratón mediante PCR*

10 Basándose en la secuencia genómica (SEC ID N°: 76), se diseñaron dos cebadores de PCR y se usaron para identificar una fuente de ADNc de zcytor17lig de ratón mediante PCR. Estos cebadores ZC41498 (SEC ID N°: 86) y ZC41496 (SEC ID N°: 87) se diseñaron en las regiones sin traducir en 5' y 3' putativas de las secuencias de ratón (SEC ID N°: 76 y SEC ID N°: 10). Se seleccionaron varias fuentes de ADNc mediante PCR, incluyendo ADNc  
 15 Marathon-ready zClontech) y alícuotas de bibliotecas de ADNc preparadas localmente. Los productos se visualizaron sobre geles de agarosa al 1 %. Las bandas del tamaño esperado se observaron en reacciones usando un molde de biblioteca de ADNc de testículos de ratón. Estas reacciones de PCR se realizaron con éxito en volúmenes de aproximadamente 50 µl con o sin DMSO al 10 %, usando pfu turbo polimerasa (Stratagene) según las recomendaciones del fabricante; con una aplicación adicional de una cera hot-start empleando hot start 50s (Molecular Bioproducts, Inc. San Diego, CA). El termociclado por PCR se realizó con un único ciclo de 94 °C durante  
 20 4 min; seguido por 40 ciclos de 94 °C: 30 segundos, 48 °C: 30 segundos, 72 °C: 50 segundos; con extensión adicional final a 72 °C durante 7 minutos. Las dos reacciones de PCR se reunieron y se purificaron usando agarosa de bajo punto de fusión y enzima de digestión de agarosa Gelase (Epicenter, Inc. Madison, WI) según las recomendaciones del fabricante.

25 La determinación de la secuencia de ADN de estos productos de PCR reveló un ADNc murino de secuencia de zcytor17 (SEC ID N°: 90) que comprendía un ORF idéntico a la SEC ID N°: 10, lo que confirmaba que la SEC ID N°: 10 codificaba para el polipéptido zcytor17lig de ratón. Luego se usaron los cebadores de PCR, ZC41583 (SEC ID N°: 88) y ZC41584 (SEC ID N°: 89) para añadir sitios de restricción Fsel y Ascl y una secuencia Kozak parcial al marco de lectura abierto de mcytor17lig y codón de terminación (SEC ID N°: 92). Se usó un termociclador Robocycler 40 (Stratagene) para realizar un gradiente de temperatura de temperaturas de hibridación y ciclos tal como sigue. Se aplicó pfu turbo polimerasa (Stratagene) tal como se describió anteriormente, pero sólo en DMSO al 10 %. La ciclación se realizó con un único ciclo de 94 °C durante 4 min; seguido por 20 ciclos de 94 °C: 30 segundos,  
 30 gradiente de 65 °C a 51 °C: 30 segundos, 72 °C: 1 minuto; y una única extensión a 72 °C durante 7 minutos. El molde para esta segunda reacción de termociclado fue 1 µl del producto de PCR mcytor17lig purificado en gel inicial anterior. El producto de PCR resultante de las tres reacciones a las temperaturas más bajas se reunieron y se purificaron en gel usando el procedimiento de Gelase (Epicenter) descrito anteriormente. Este mzytor17lig purificado se digirió con Fsel y Ascl y se ligó en un vector pZP7X modificado para tener sitios Fsel y Ascl en su sitio de clonación. El plásmido pZP7X es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que  
 40 tiene el promotor de metalotioneína-1 (MT-1) de ratón, sitios de restricción múltiples para la inserción de secuencias codificantes, y un terminador de hormona del crecimiento humano. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador selectivo de mamífero que tiene un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de DHFR, y el terminador de SV40. La secuencia de ADNc murino clonada se representa en la SEC ID N°: 90, y la secuencia de polipéptido correspondiente se muestra en la SEC ID  
 45 N°: 91 (que es idéntica a la SEC ID N°: 11).

#### **Ejemplo 15**

##### *Aislamiento de clon de ADNc de zcytor17lig de ratón a partir de una biblioteca de bazo de ratón activado*

##### *A. Fuente primaria de murino usada para aislar zcytor17lig de ratón*

50 Se extrajeron bazos de ratón de ratones Balb/C, y se aplastaron entre portaobjetos de extremos esmerilados para crear una suspensión celular. Se espera que el rendimiento de células de ratón primarias aisladas sea de be aproximadamente  $6,4 \times 10^8$  células antes de la selección descrita a continuación.

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

65 Se prepara una columna VS+ (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. La columna VS+ se coloca luego en un campo magnético VarioMACS™ (Miltenyi). La columna se equilibra con 5 ml de tampón MACS. Las células de ratón primarias aisladas se aplican luego a la columna. Las células negativas para CD90 se dejan pasar a su través. La columna se enjuaga con 9 ml (3 X 3 ml) de tampón MACS. La columna se retira luego del imán y se coloca sobre un tubo falcon de 15 ml. Las células CD90+ se eluyen añadiendo 5 ml de tampón MACS a la columna y se eliminan

por lavado las células unidas usando el émbolo proporcionado por el fabricante. La incubación de las células con las perlas magnéticas CD90, lavados, y etapas de la columna VS+ (de incubación a elución) anteriores se repiten una vez más. Las fracciones CD90+ resultantes de las 2 separaciones de la columna se reúnen. Se espera que el rendimiento de células de bazo de ratón seleccionadas CD90+ sea de aproximadamente  $1 \times 10^8$  células totales.

5 Una muestra de las células de ratón seleccionadas CD90+ reunidas se retira para tinción y se separaron en un separador de células activadas por fluorescencia (FACS) para evaluar su pureza. Se usa un anticuerpo de hámster anti-ratón CD3ε conjugado con PE (PharMingen) para la tinción y separación de las células seleccionadas CD90+. Las células seleccionadas CD90+ de ratón deben ser aproximadamente un 93 % de células CD3+, lo que sugiere que las células son al 93 % células T.

10 Las células seleccionadas CD90+ de murino se activan incubando  $3 \times 10^6$  células/ml en RPMI + FBS al 5 % + PMA 10 ng/ml e ionomicina 0,5 µg/ml (Calbiochem) durante la noche a 37 °C. El sobrenadante de estas células de ratón seleccionadas CD90+ activadas se somete a prueba para determinar la actividad de zcytor17lig tal como se describe a continuación. Además, las células de ratón seleccionadas CD90+ activadas se usan para preparar una biblioteca de ADNc, tal como se describe en el ejemplo 16, a continuación.

### Ejemplo 16

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

La selección de una biblioteca de ADNc de células seleccionadas CD90+ activadas de ratón primarias puede revelar el ADNc aislado que es un miembro novedoso de la familia de citocinas de haz de cuatro hélices que codificaría para el ortólogo de ratón del zcytor17lig humano. El ADNc se identifica mediante selección de hibridación.

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

El vector, pZP7N se usa para la construcción de biblioteca seleccionada CD3+ (véase el ejemplo 6A)

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

Aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  células seleccionadas CD90+ de ratón primarias estimuladas en ionomicina/PMA (ejemplo 15) se aíslan mediante centrifugación. El ARN total se aísla a partir del sedimento celular, y se convierte en ADNc bicatenario tal como se describe en el ejemplo 6B. Este ADN se transfecta posteriormente en células BHK, al como se describe en el ejemplo 6B, y la proliferación se somete a ensayo usando un ensayo de fluorescencia de "Alamar blue" (ejemplo 2B).

40 Para el objetivo de seleccionar la biblioteca mediante clonación con trampa de secreción, se necesita una forma amplificada compleja de la biblioteca para transfectar células COS-7. Se siembran 4,8 millones de clones sobre 110 placas de LB-agar de 15 cm complementadas con ampicilina 100 µg/ml, metilicina 10 µg/ml. Tras hacer crecer las placas durante la noche a 37 °C se recogen las bacterias mediante raspado y se sedimentan. El ADN de plásmido se extrae de las bacterias sedimentadas usando Nucleobond-giga™ (Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este plásmido se usa luego para transfectar células COS-7 en portaobjetos y se selecciona usando la técnica de trampa de secreción descrita anteriormente (ejemplo 17).

45 *C. Selección la biblioteca de ADNc de ratón activada*

Se siembran en placa aproximadamente  $5 \times 10^5$  clones sobre 10 placas LB/Amp Maxi. Las colonias se recogen, se desnaturalizan y se reticulan usando el procedimiento convencional (Sambrook, J. y col. citado anteriormente). Cincuenta nanogramos del fragmento RACE en 5' de 300 pb (ejemplo 14) se marcan con  $^{32}\text{P}$  usando el kit de marcaje de cebador aleatorio Prime-Itr RmT (Stratagene). Los 10 filtros se hibridan con esta sonda marcada a 65 °C durante la noche usando solución de hibridación ExpressHyb™ (Clontech). Los filtros se lavan luego secuencialmente a 60 °C durante 1 hora tres veces con 0,2xSSC (NaCl 30 mM, citrato de sodio 3 mM, pH 7,0), SDS al 0,1 %; y luego a 65 °C durante 1 hora. Los filtros se exponen a - 80 °C durante la noche, y se revelan con película de rayos X. Se sacan tapones de agar que contienen las colonias positivas, y los clones se siembran en placa sobre placas de LB/Amp de 10 cm. Las colonias se recogen en filtro luego y se hibridan de nuevo siguiente el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se aíslan clones de ADN individuales y se secuencian usando procedimientos convencionales, para identificar el ADNc de ratón.

### 60 Ejemplo 17

*El zcytor17lig de ratón no se une con receptor soluble de zcytor17 humano en el ensayo de trampa de secreción*

65 El ADN para el clon de ratón mzcycor17lig/pZP7 se transfectó en células COS, y la unión de receptores solubles que comprenden zcytor17 (receptor soluble humano de zcytor17 zcytor17-Fc4 (ejemplo 10), o heterodímeros de receptor soluble (zcytor17/WSX-1 o BaF3/zcytor17/OSMRbeta), a las células COS transfectadas se sometieron a prueba

mediante un ensayo de trampa de secreción (ejemplo 12). El ensayo confirmó que el zcytor17lig de ratón no se une al receptor soluble de zcytor17 humano.

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

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

15 Los resultados indican que el zcytor17lig de ratón no se unía con receptor soluble de zcytor17 humano (o heterodímeros de receptor soluble que comprenden zcytor17 tal como se describe en el presente documento).

### Ejemplo 18

20 *Expresión de zcytor17lig de ratón en células de mamífero*

*Expresión de mamífero de zcytor17lig de ratón*

25 Se sembraron en placa células BHK 570 (ATCC N°: CRL-10314) en placas de cultivo tisular de 10 cm y se dejaron crecer hasta aproximadamente el 20 % de confluencia durante la noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, en medios DMEM/FBS (DMEM, medios Gibco/BRL High Glucose; Gibco BRL, Gaithersburg, MD), suero bovino fetal al 5 % (Hyclone, Logan, UT), L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenexa, KS), piruvato de sodio 1 mM (Gibco BRL). Las células se transfectaron luego con el plásmido mzcycotor17lig/pZP7X (ejemplo 14) usando un kit de transfección de Lipofectamine (GibcoBRL) estable de mamífero según las instrucciones del fabricante.

30 Un día tras la transfección, las células se separaron 1:10 y 1:20 en los medios de selección (medios DMEM/FBS con la adición de metotrexato 1 µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)) en placas de 150 mm. Los medios en las células se remplazaron por medios de selección nuevos en el día 5 tras la transfección. Aproximadamente 10 días tras la transfección, se tripsinizaron las colonias resistentes a metotrexato y las células se reunieron y se sembraron en placa en frascos de cultivo a gran escala. Una vez las células se hicieron crecer hasta aproximadamente el 90 % de confluencia, se enjuagaron con PBS tres veces, y se cultivaron con medios ESTEP2 libres de suero (DMEM (Gibco BRL), medios condicionados con piruvato de Na 0,11 g/l, NaHCO<sub>3</sub> 3,7 g/l, insulina 2,5 mg/l, transferrina 5 mg/l, pH 7,0). Los medios condicionados se recogieron tres días más tarde, y se pusieron en un ensayo de proliferación de BaF3 usando Alamar Blue, que se describe en el ejemplo 19 a continuación.

### 40 Ejemplo 19

*El zcytor17lig de ratón no activa el receptor de zcytor17 humano en el ensayo de BaF3 usando Alamar Blue*

45 La proliferación de células BaF3/zcytor17, BaF3/zcytor17/OSMRbeta y BaF3/zcytor17/WSX-1 (ejemplo 4, y 5B) se evaluó usando medios condicionados libres de sueros a partir de células BHK que expresan zcytor17lig de ratón (ejemplo 18). Las células BaF3/Zcytor17, BaF3/zcytor17/OSMRbeta y BaF3/zcytor17/WSX-1 se centrifugaron, se lavaron y se sembraron en placa en medios libres de mL-3 tal como se describe en el ejemplo 5B. Medios condicionados a partir de células BHK que expresan zcytor17lig de ratón (ejemplo 18) se diluyeron con medios libres de mL-3 hasta concentraciones del 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,5 %, 0,75 % y del 0,375 %. El ensayo de proliferación se realizó tal como en el ejemplo 5B. Los resultados de este ensayo fueron negativos, lo que indica que el zcytor17lig de ratón no activa los complejos de receptor de zcytor17 humano, zcytor17/OSMRbeta, o zcytor17/WSX-1 receptor.

### 55 Ejemplo 20

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

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

60 El plásmido KZ134 se construyó con los oligonucleótidos complementarios ZC12,749 (SEC ID N°: 44) y ZC12,748 (SEC ID N°: 45) que contienen elementos de unión al factor de transcripción STAT de 4 genes, que incluye un elemento inducible pro c-fos Sis modificado (m67SIE, o hSIE) (Sadowski, H. y col., Science 261:1739-1744, 1993), el p21 SIE1 del gen p21 WAF1 (Chin, Y. y col., Science 272:719-722, 1996), el elemento de respuesta de glándula mamaria del gen de β-caseína (Schmitt-Ney, M. y col., Mol. Cell. Biol. 11:3745-3755, 1991), y un elemento inducible de STAT del gen Fcg RI, (Seidel, H. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:3041-3045, 1995). Estos oligonucleótidos

contienen extremos compatibles de Asp718-XhoI y se ligaron usando procedimientos convencionales, en un vector indicador de luciferasa de luciérnaga receptor con un promotor c-fos (Poulsen, L.K. y col., J. Biol. Chem. 273:6229-6232, 1998) se digirieron con las mismas enzimas y que contenían un marcador seleccionable de neomicina. El plásmido KZ134 se usó para transfectar de manera estable células BaF3, usando procedimientos de transfección y selección convencionales, para preparar la línea celular BaF3/KZ134.

Una línea celular de indicador de BaF3/KZ134 estable, que expresa el receptor de zcytor17 de longitud completa o receptor zcytor17/OSMRbeta se construyó tal como en el ejemplo 4. Los clones se diluyeron, se sembraron en placa y se seleccionaron usando técnicas convencionales. Los clones se seleccionaron mediante ensayo de luciferasa (véase el ejemplo 20B, a continuación) usando los medios condicionados con zcytor17lig humano o proteína zcytor17lig purificada (véase el ejemplo 35, a continuación) como inductor. Los clones con la mayor respuesta de luciferasa (a través de luciferasa de STAT) y el nivel inicial más bajo se seleccionaron. Se seleccionaron líneas celulares de transfectantes. Las líneas celulares se denominaron BaF3/KZ134/zcytor17 o BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta dependiendo de los receptores transfectados en la línea celular.

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

*B. El zcytor17lig humano activa el receptor de zcytor17 humano en el ensayo de luciferasa de BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta o BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta*

Células BaF3/KZ134/zcytor17 y BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta se centrifugaron y se lavaron en medios libres de mL-3. Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para garantizar la eliminación de mL-3. Luego se contaron las células en un hemocitómetro. Las células se sembraron en placa en formato de 96 pocillos a aproximadamente 30.000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando los medios libres de mL-3. Se usó el mismo procedimiento para células BaF3/KZ134 no transfectadas para su uso como control en el ensayo posterior. Las células BHK/KZ134/zcytor17 o BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta se sembraron en placa en formato de 96 pocillos a 15.000 células por pocillo en medios 100 µl de medios. Las BHK/KZ134 originales se usaron como control.

La activación con STAT de las células BaF3/KZ134/Zcytor17, BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta, BHK/KZ134/zcytor17, o BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta se evaluó usando (1) medios condicionados a partir de células BHK570 transfectadas con el zcytor17lig humano (ejemplo 7), (2) medios condicionados a partir de células BHK570 transfectadas con el zcytor17lig de ratón (ejemplo 18), (3) zcytor17lig humano purificado (ejemplo 35), o (4) medios libres de mL-3 para medir la respuesta del control sólo a los medios. Los medios condicionados se diluyeron con medios libres de mL-3 RPMI hasta concentraciones del 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,5 %, 0,75 % y del 0,375 %. El zcytor17lig humano purificado se diluyó hasta una concentración de 1200, 600, 300, 150, 75, 37,5, 18,75, o 9,4 pM. Se añadieron 100 µl de los medios condicionados diluidos o proteína a las células BaF3/KZ134/Zcytor17, BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta, BHK/KZ134/zcytor17, o BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta. El ensayo usando los medios condicionados se realizó en paralelo en células BaF3/KZ134 o BHK/KZ134 no transfectadas como control. El volumen de ensayo total era de 200 µl. Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas momento en el que las células BaF3 se sedimentaron mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 min., y los medios se aspiraron y se añadieron 25 µl de tampón de lisis (Promega). Para las líneas celulares BHK, la etapa de centrifugación no era necesaria ya que las células son adherentes. Tras 10 minutos a temperatura ambiente, las placas se midieron para determinar la activación del constructo indicador de STAT mediante su lectura en un luminómetro (Labsystems Luminoskan, modelo RS) que añadió 40 µl de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega) a una integración de cinco segundos.

Los resultados de este ensayo confirmaron que la respuesta de indicador de STAT de las células BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRbeta y BHK/KZ134/zcytor17/OSMRbeta al zcytor17lig humano en comparación con o bien las células BaF3/KZ134/Zcytor17, las células BHK/KZ134/zcytor17 o bien las células control BaF3/KZ134 o BHK/KZ134 no transfectadas, mostró que la respuesta estaba mediada por los receptores zcytor17/OSMRbeta. Los resultados también mostraron que el zcytor17lig de ratón no activa en ensayo de indicador de STAT a través del complejo de receptor humano.

### **Ejemplo 21**

*El zcytor17lig de ratón es activo en el ensayo de médula ósea de ratón*

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

Se obtiene aspirado (médula) de fémur de ratón de ratones Balb/C o C57BL/6 macho de 6-10 semanas de edad. La médula se lava luego con RPMI+FBS al 10 % (JRH, Lenexa KS; Hyclone, Logan UT) y se suspende en RPMI+FBS al 10 % como una suspensión celular de médula completa. La suspensión celular de médula completa se somete

luego a un gradiente de densidad (Nycoprep, 1,077, Animal; Gibco BRL) para enriquecer en células de baja densidad, principalmente mononucleares, tal como sigue: La suspensión celular de médula completa (aproximadamente 8 ml) se pipeta cuidadosamente encima de una solución en gradiente de Nycoprep de aproximadamente 5 ml en un tubo cónico de 15 ml, y luego se centrifuga a 600X g durante 20 minutos. La capa de interfase, que contiene las células mononucleares de baja densidad se retira luego, se lava con RPMI+FBS al 10 % en exceso y se sedimenta mediante centrifugación a 400X g durante 5-10 minutos. Este sedimento se resuspende en RPMI +FBS al 10 % y se siembra en placa en un frasco de T-75 a aproximadamente 10<sup>6</sup> células/ml, y se incuba a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante aproximadamente 2 horas. Las células en suspensión resultantes son células de médula no adherentes de baja densidad (NA LD).

#### B. Ensayo de 96 pocillos

Se siembran en placa células de médula de ratón NA LD a de 25.000 a 45.000 células/pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos en RPMI + FBS al 10 % + factor de células madre murino (mSCF) 1 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), más medio condicionado al 5 % de uno de los siguientes: (1) células BHK 570 que expresan zcytor17lig de ratón (ejemplo 18), (2) células BHK 570 que expresan zcytor17lig humano (ejemplo 7), o (3) células BHK 570 control que contienen vector y que no expresan ningún ligando. Estas células se someten luego a varios tratamientos con citocina para someter a prueba la expansión o diferenciación de células hematopoyéticas de la médula. Para las pruebas, las células de médula de ratón NA LD se someten a interleucina-15 humana (hIL-15) (R&D Systems), o una de un panel de otras citocinas (R&D Systems). La dilución en serie de hIL-15, o las otras citocinas, se someten a prueba, con dilución en serie de 2 veces desde una concentración de aproximadamente 50 ng/ml hasta aproximadamente 0,5 ng/ml. Tras 8 a 12 días se puntuaron los ensayos de 96 pocillos para la proliferación celular mediante el ensayo de Alamar blue tal como se describe en el ejemplo 5B.

#### C. Resultados del ensayo de médula de ratón NA LD de 96 pocillos

Los medios condicionados a partir de las células BHK que expresan zcytor17lig tanto de ratón como humano pueden promover la expansión de una población de células hematopoyéticas o bien solas o bien en sinergia con otras citocinas en la médula de ratón NA LD en comparación con el medio condicionado con BHK control. La población de células hematopoyéticas expandidas por el zcytor17lig de ratón con o sin otras citocinas, y aquellas células hematopoyéticas expandidas por el zcytor17lig humano con o sin otras citocinas, se propagan adicionalmente en cultivo celular. Estas células hematopoyéticas se tiñen con un anticuerpo anti-Pan células NK marcado con ficoeritrina (PharMingen) y se someten a análisis de citometría de flujo, que demostró que las células expandidas se teñían positivamente para este marcador de linfocitos citolíticos naturales (NK). De manera similar, otros marcadores hematopoyéticos específicos pueden usarse para determinar la expansión de, por ejemplo, células T CD4+ o CD8+, otras poblaciones de células T, células B, y otros marcadores de células inmunitarias.

El mismo ensayo de 96 pocillos se realiza usando células de médula humana nuevas adquiridas de Poietic Technologies, Gaithersburg, MD. De nuevo, un resultado positivo muestra que zcytor17lig solo o en sinergia con otras citocinas, el zcytor17lig de ratón y humano pueden expandir una población de células hematopoyéticas que se tiñe positivamente para marcadores celulares específicos tal como se describió anteriormente.

### Ejemplo 22

#### Constructos para generar ratones transgénicos con zcytor17lig

##### A. Constructo para expresar zcytor17lig humano a partir del promotor MT-1

Se diseñan oligonucleótidos para generar un fragmento de PCR que contiene una secuencia Kozak consenso y la región codificante de zcytor17lig humano. Estos oligonucleótidos se diseñan con un sitio FseI en el extremo 5' y un sitio Ascl en el extremo 3' para facilitar la clonación en (a) pMT12-8, un vector transgénico convencional de los inventores de la presente invención, o (b) pKF051, un vector transgénico linfoide-específico (ejemplo 22B).

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

Aproximadamente un microlitro de cada reacción de ligación se somete a electroporación en células competentes DH10B ElectroMax™ (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante y se siembra en placa

sobre placas de LB que contienen ampicilina 100 µg/ml, y se incubaba durante la noche. Las colonias se pican y se hacen crecer en medios LB que contienen ampicilina 100 µg/ml. Se prepara ADN de miniprep a partir de los clones picados y se selecciona para el inserto humano de zcytor17lig mediante digestión de restricción con EcoRI solo, o FseI y Ascl combinados, y posterior electroforesis en gel de agarosa. Se realizan Maxipreps del pMT-zcytor17lig humano correcto. Un fragmento Sall que contiene secuencias flanqueantes en 5' y 3', el promotor MT-1, el intrón de insulina II de rata, ADNc de zcytor17lig humano y la secuencia de poli A de la hGH se prepara para usarse para su microinyección en ovocitos murinos fertilizados. La microinyección y producción de ratones transgénicos se producen tal como se describe en Hogan, B. y col. *Manipulating the Mouse Embryo*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1994.

#### B. Constructo para la expresión de zcytor17lig humano a partir de promotor EPLCK linfoide-específico

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

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

Aproximadamente un microlitro de cada reacción de ligación se somete a electroporación, se siembra en placa, se pican los clones y se selecciona para el inserto de zcytor17lig humano mediante digestión de restricción tal como se describió anteriormente. Un clon correcto de pKFO51-zcytor17lig se verifica mediante secuenciación, y se realiza un maxiprep de este clon. Un fragmento NotI, que contiene el promotor proximal Ick y potenciador de inmunoglobulina µ (EPLCK), ADNc de zcytor17lig, y el gen de hGH mutado se prepara para usarse para su microinyección en ovocitos murinos fertilizados.

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

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

Los productos de PCR secuenciados para el ADN revelaron una secuencia de ADNc de zcytor17 murino (SEC ID N°: 90) que comprendía un ORF idéntico a la SEC ID N°: 10, confirmando que la SEC ID N°: 10 codificaba para el polipéptido zcytor17lig de ratón. Los cebadores de PCR, ZC41583 (SEC ID N°: 88) y ZC41584 (SEC ID N°: 89), se usaron luego para añadir sitios de restricción FseI y Ascl y una secuencia Kozak parcial al marco de lectura abierto de mcytor17lig y codón de terminación (SEC ID N°: 92). Se usó un termociclador Robocycler 40 (Stratagene) para realizar un gradiente de temperatura de temperaturas de hibridación y ciclación tal como sigue. Se aplicó pfu turbo polimerasa (Stratagene) tal como se describió anteriormente, pero sólo en DMSO al 10 %. La ciclación se realizó con un único ciclo de 94 °C durante 4 min; seguido por 20 ciclos de 94 °C: 30 segundos, gradiente de 65 °C a 51 °C: 30 segundos, 72 °C: 1 minuto; y una única extensión a 72 °C durante 7 minutos. El molde para esta segunda reacción de termociclado era 1 µl del producto de PCR mcytor17lig purificado en gel inicial, anterior. El producto de PCR resultante de las tres reacciones de menor temperatura se reunieron y se purificaron en gel usando el procedimiento de Gelase (Epicenter) descrito anteriormente. Este fragmento purificado se digirió luego con FseI y Ascl y se ligó en un vector pZP7X modificado para tener sitios FseI y Ascl en su sitio de clonación. Éste se envió a secuenciación para confirmar la secuencia correcta. La secuencia de ADNc murino clonada se representa en la SEC ID N°: 90, y la secuencia de polipéptido correspondiente se muestra en la SEC ID N°: 91 (que es idéntica a la SEC ID N°: 11).

El fragmento de ADN aislado, de tamaño correcto digerido con FseI y Ascl (Boehringer-Mannheim) se subclonó en un plásmido que contenía el promotor EF1alfa previamente digerido con FseI y Ascl. Se realizaron maxipreps del EF1alfa zcytor17lig de ratón correcto. El casete de expresión contiene el promotor EF1alfa (con un sitio FseI

delecionado), el intrón de EF1alfa, el sitio de tipo SUR IRES para facilitar la expresión, un polilígador flanqueado con sitios de insulina II de rata en el extremo 5' que añade sitios FseI PmeI AscI para la inserción del clon deseado, y la secuencia de poli A de la hormona del crecimiento humana (hGH). Un fragmento NotI de 7,5 kb que contenía el casete de expresión del promotor EF1alfa y zcytor17lig de ratón se preparó para usarse para su microinyección en ovocitos murinos fertilizados. El plásmido EF1alfa se obtuvo de Louis-Marie del Laboratoire de Differentiation Cellulaire, tal como se describe en Taboit-Dameron y col., 1999, Transgenic Research 8:223-235.

#### D. Constructo para la expresión de zcytor17lig de ratón a partir del promotor EPLCK linfoide-específico

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

El fragmento de ADN de zcytor17lig aislado, de tamaño correcto usado en los constructos de EF1alfa, digerido con FseI y AscI (Boehringer-Mannheim), se subclonó en un plásmido que contenía pKFO51, un vector transgénico linfoide-específico. El vector transgénico pKFO51 se deriva de p1026X (Iritani, B.M., y col., EMBO J. 16:7019-31, 1997) y contiene el promotor proximal lck específico de células T, el potenciador de la cadena pesada de inmunoglobulina  $\mu$  específico de células B/T, un polilígador para la inserción del clon deseado, y un gen de hGH mutado que codifica para una proteína de hormona del crecimiento inactiva (que proporciona intrones en 3' y una señal de poliadenilación). Un fragmento NotI de 6,5 kb, que contenía el promotor proximal lck y potenciador de inmunoglobulina  $\mu$  (EPLCK), ADNc de zcytor17lig de ratón, y el gen de hGH mutado se preparó para usarse para su microinyección en ovocitos murinos fertilizados (ejemplo 41).

### Ejemplo 23

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

##### A. Construcción de zCyt17Lig-CEE/pZMP21

Un plásmido de expresión que contiene todo o parte de un polinucleótido que codifica para zcytor17lig humano se construyó a través de recombinación homóloga. El plásmido se denominó zCyt17Lig-CEE/pZMP21.

La construcción de zCyt17Lig-CEE/pZMP21 se logró generando un fragmento zCyt17Lig-CEE (SEC ID N°: 95) usando amplificación por PCR. El molde de ADN usado para la producción del fragmento zCyt17Lig-CEE fue zCyt17Lig/pZP7nx. Los cebadores usados para la producción del fragmento zCyt17Lig-CEE fueron: (1) ZC41607 (SEC ID N°: 97) (secuencia sentido), que incluye desde el extremo 5' hasta el extremo 3': 28 pb de la secuencia flanqueante de vector (5' del inserto) y 21 pb correspondientes a la secuencia en 5' de zCyt17Lig; y (2) ZC41605 (SEC ID N°: 98) (secuencia antisentido), que incluye desde el extremo 5' hasta el extremo 3': 37 pb de la secuencia flanqueante de vector (3' del inserto), 3 pb del codón de parada, 21 pb que codifican para una etiqueta EE C terminal, y 21 pb correspondientes al extremo 3' de la secuencia de zCyt17Lig. El fragmento que resulta de la amplificación por PCR anterior es una copia del zCyt17Lig de molde con la adición de una etiqueta EE C terminal, proporcionando un producto final zCyt17Lig-CEE.

Las reacciones de PCR se realizaron del siguiente modo: A un volumen final de 100  $\mu$ l final se añadió: 10  $\mu$ l de tampón de reacción de la Taq polimerasa 10x con MgCl 15mM (Gibco), 1  $\mu$ l de Taq AND polimerasa (5 unidades/PI, Gibco), 3  $\mu$ l de dNTP 10mM, 78  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O, 3  $\mu$ l de una reserva 20 pmol/ $\mu$ l del cebador ZC41607 (SEC ID N° 97) 3  $\mu$ l de una reserva 20 pmol/ $\mu$ l del cebador ZC41605 (SEC ID N° 98) y 2  $\mu$ l de una reserva 0,13  $\mu$ g/ $\mu$ l de ADN molde zCyt17lig. A la mezcla se añadió un volumen igual hasta 50  $\mu$ l de aceite mineral. La reacción se calentó hasta 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 1 minuto; 55 °C durante 2 minutos; 72 °C durante 3 minutos; seguido de una ampliación de 10 minutos a 72 °C y mantenida a 4 °C hasta la recolección de la reacción.

El plásmido pZMP21 se sometió a digestión con la enzima de restricción BglIII, se limpió con un kit de purificación QiaQuick PCR (Qiagen) usando un protocolo de microcentrifuga, y se usó para recombinación con el fragmento de PCR. El plásmido pZMP21 se construyó a partir de pZMP20, que se construyó a partir de pZP9 (depositado en la Colección Americana de cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y con designación N° 98668), tomando los elementos genéticos de levadura de pRS316 (depositado en la Colección Americana de cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y con designación N° 77145), un elemento IRES de poliovirus y el dominio extracelular de CD8, truncado en el extremo carboxiterminal del dominio transmembrana. pZMP21 es un vector de expresión en mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de MPSV, el intrón del péptido señal de inmunoglobulina, múltiples sitios de restricción para insertar secuencias de codificación, un codón de terminación y un terminador de la hormona de crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor de SV40, un potenciador y un origen de replicación, un gen de DHFR, el terminador de SV40, así como las secuencias URA3 y CEN-ARS requeridas para la selección y replicación en *S. cerevisiae*.

Cincuenta microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) se combinaron de forma independiente con



- 100 ng de plásmido cortado, 5 µl de la mezcla de PCR descrita anteriormente y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/ADN se sometió a electropulsación a 0,75 Kv (5 Kv/CM), ∞ ohmios, 25 µF. Cada cubeta tenía 600 µl de sorbitol 1,2M añadido y la levadura se sembró en un alícuota de 100 µl y un alícuota de 300 µl sobre dos placas de URA-D y se incubaron a 30 °C. Después de aproximadamente 72 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una única placa se resuspendieron en 1 ml de H<sub>2</sub>O y se agitaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 500 µl de tampón de lisis ( Triton X-100 al 2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, tris 10 mM, a pH, EDTA 1 mM). Los 500 µl de la mezcla de lisis se añadieron a un tubo Eppendorf que contiene 300 µl de perlas de vidrio de 600 µm lavadas con ácido y 300 µl de fenol-cloroformo, se agitaron durante intervalos de 1 minuto dos o tres veces, seguido de una centrifugación de 5 minutos en una centrífuga de Eppendorf a velocidad máxima. Trescientos microlitros de la fase acuosa se transfirieron a un tubo fresco y el ADN se precipitó con 600 µl de etanol (EtOH) al 100 %, seguido de centrifugación durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento de ADN se lavó después con 500 µl de EtOH al 70 %, seguido de centrifugación durante 1 minuto a 4°C. El sedimento de ADN se resuspendió en 30 µl de H<sub>2</sub>O.
- La transformación de las células electrocompetentes de *E. coli* (MC1061) se realizó con 5 µl de la preparación de ADN de levadura y 50 µl de células MC1061. Las células se sometieron a electropulsación a 2,0 kV, 25 µF y 400 ohmios (Ω). Tras la electroporación, se añadieron 600 µl de SOC (Bacto' Triptona al 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM). Las células de *E.coli* sometidas a electroporación se sembraron en un alícuota de 200 µl y de 50 µl en dos placas de LB AMP (caldo LB (Lennox), Bacto Agar al 1,8 % (Difco), 100 mg/l de ampicilina). Las placas se incubaron boca abajo durante aproximadamente 24 horas a 37 °C. Las colonias resistentes a ampicilina se seleccionaron de forma aleatoria y se sometieron a análisis de la secuencia del inserto. El ADN del plásmido a gran escala se aisló a partir de un clon de secuencia confirmada usando el kit Qiagen Maxi (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

#### 25 *B. Expresión en mamíferos de zcytor17lig humano*

- La proteína zCyt17Lig de longitud completa se produjo en células BHK transfeccionados con zCyt17Lig-CEE/pZMP21 (Ejemplo 23A). Las células BHK 570 (ATCC CRL-10314) se sembraron en matraces de cultivo tisular T75 y se dejaron crecer hasta una confluencia de aproximadamente 50 a 70 % a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, en medio de crecimiento (SL7V4, FBS al 5 %, pen/estrep al 1 %). Después, las células se transfeccionaron con zCyt17Lig-CEE/pZMP21 mediante transfección mediada por liposomas (usando Lipofectamine™; Life Technologies) en medio (SL7V4) sin suero (SF). El plásmido (16 µg) se diluyó en tubos de 1,5 ml hasta un volumen final total de 640 µl con medio SF. Treinta y cinco microlitros de la mezcla lipídica se mezcló con 605 µl de medio SF y la mezcla resultante se dejó incubar aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Después, a la mezcla ADN:lípido se añadieron cinco mililitros de medio SF. Las células se aclararon una vez con 10 ml de PBS, se decantó el PBS y se añadió la mezcla ADN:lípido. Las células se incuban a 37 °C durante cinco horas, después, a cada placa se añadieron 15 ml de medio (SL7V4, FBS al 5 %, pen/estrep al 1 %). Las placas se incubaron a 37 °C durante la noche y la mezcla de ADN:lípido se sustituyó con medios de selección ( SL7V4, FBS al 5 %, pen/estrep al 1 %, metotrexato 1µM) al día siguiente. Aproximadamente 10 días después de la transfección se realizó la digestión con tripsina de las colonias resistentes a metotrexato del matraz de transfección T75 y las células se combinaron y se sembraron en un matraz T-162 y se transfirieron a un cultivo a gran escala.

### Ejemplo 24

#### 45 *Expresión del receptor soluble zcytor17 en E.coli*

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

- Mediante recombinación homóloga se construyó un plásmido de expresión que contiene un polinucleótido que codifica un receptor soluble de zcytor17 condensado en el extremo C a la proteína de unión a maltosa (MBP). El polipéptido de fusión contiene una porción de MBP de aproximadamente 388 aminoácidos en N-terminal condensada a cualquiera de los receptores solubles de zcytor17 descritos en el presente documento. Usando PCR, como se describe en el presente documento, se aisló un fragmento de ADNc de zcytor17 (SEC ID N° 4). Se usaron dos cebadores en la producción del fragmento zcytor17 en una reacción de PCR estándar. (1) uno que contiene aproximadamente 40 pb del vector que flanquea la secuencia y aproximadamente 25 pb correspondientes al extremo amino del zcytor17 y (2) otro que contiene aproximadamente 40 pb del extremo 3' correspondiente a la secuencia del vector flanqueante y aproximadamente 25 pb correspondiente al extremo carboxilo del zcytor17. Dos µl de la reacción de PCR de 100 µl se pasaron por un gel de agarosa al 1,0 % con tampón 1 x TBE para análisis y se observó el fragmento esperado aproximadamente. La reacción de PCR restante se combinó con el segundo tubo de PCR y precipitó con 400 µl de etanol absoluto. El ADN precipitado usado para recombinar en un vector receptor pTAP170 cortado con SmaI para producir la construcción que codifica la fusión MBP-zcytor17 como se describe más adelante en el presente documento.

- El plásmido pTAP170 se obtuvo de los plásmidos pRS316 y pMAL-c2. El plásmido pRS316 es un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae* (Hieter P. y Sikorski, R., Genetics 122:19-27, 1989). pMAL-C2 (NEB) es un plásmido de expresión en *E. coli*. Porta el promotor tac que dirige MalE (gen que codifica la MBP), seguido de una cola de His,

un sitio de escisión de la trombina, un sitio de clonación y el terminador *rrmB*. El vector pTAP170 se construyó usando recombinación homóloga de levaduras. 100ng de pMAL-c2 cortado con EcoR1 se recombinó con 1 µg de pRS316 cortado con Pvu1, 1 µg de ligador y 1 µg de pRS316 cortado con Sca1/EcoR1. El ligador consistió en los oligos zc19,372 (SEC ID N° 172) (100 pmol): zc19,351 (SEC ID N° 173) (1 pmol): zc19,352 (SEC ID N° 174) (1 pmol) y zc19,371 (SEC ID N° 175) (100 pmol) combinados en una reacción de PCR. Las condiciones fueron las siguientes: 10 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos; seguido por empapado a 4 °C. Los productos de la PCR se concentraron mediante precipitación en etanol al 100 %.

Cien microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) se combinaron con 10 µl de una mezcla que contiene aproximadamente 1 µg del inserto *zcytor17* humano y 100 ng del vector pTAP170 cortado con SmaI y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/ADN se sometió a electropulsación a 0,75 Kv (5 Kv/CM), ∞ ohmios, 25 µF. A cada cubeta se añadieron 600 µl de sorbitol 1,2 M. Después, la levadura se sembró en dos alícuotas de 300 µl sobre dos placas URA-D y se incubaron a 30 °C.

Tras aproximadamente 48 horas, se escogieron los transformantes de levadura Ura+ de una única placa, se aisló el ADN y se transformó en células *E. coli* electrocompetentes (p. ej., MC1061, Casadaban y col. *J. Mol. Biol.* 138, 179-207) y se sembraron en placas con 25 µg/l de MM/CA +KAN (Pryor and Leiting, *Protein Expression and Purification* 10:309-319, 1997) usando los procedimientos estándar. Las células se cultivaron en MM/CA con 25 µg/ml de kanomicina durante dos horas, en agitación, a 37 °C. Un ml del cultivo se indujo con IPTG 1 mM. De dos a cuatro horas después, los 250 µl de cada cultivo se mezclaron con 250 µl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 250 µl de tampón de Thorner con βME al 5 % (urea 8M, Tris 100 Mm, pH 7,0, glicerol al 10 %, EDTA 2 mM, SDS al 5 %). Las muestras se agitaron en vórtex durante un minuto y se calentaron hasta 65 °C durante 10 minutos. Se cargaron 20 µl por calle en un gel de PAGE 4 %-12 % (NOVEX). Los geles se pasaron en tampón 1XMES. Los clones positivos se denominaron pCMH01 y se sometieron a análisis de secuencia.

Se usó un microlitro de ADN de secuenciación para transformar la cepa BL21. Las células se sometieron a electropulsación a 2,0 kV, 25 µF y 400 ohmios. Tras la electroporación, 0,6 ml de MM/CA con 25 µg/l de kanomicina. Las células se cultivaron en MM/CA y se indujeron con IPTG como se ha descrito anteriormente. Los clones positivos se usaron para que crecieran para purificación de proteínas de la proteína de fusión *huzcytor17/MBP-6H* usando técnicas estándar.

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

A menos que se indique lo contrario, todas las operaciones se realizaron a 4 °C. El procedimiento siguiente se usó para la purificación del polipéptido del receptor soluble de *huzcytor17/MBP-6H* recombinante. Las células de *E. Coli* que contienen la construcción pCMH01 y que expresan el polipéptido del receptor soluble de *huzcytor17/MBP-6H* se construyeron usando procedimientos de biología molecular estándar y se cultivaron en SuperBroth II (12 g/l Casien, 24 g/l de extracto de levadura, 11,4 g/l de fosfato dipotásico, 1,7 g/l de fosfato monopotásico; Becton Dickinson, Cockeysville, MD). Las células resultantes se recolectaron y congelaron en glicerol al 0,5 %. Para la purificación de proteínas se usaron veinte gramos de las células congeladas.

Las células descongeladas se resuspendieron en 500 ml de tampón de equilibrado de Amilosa (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0). Para lisar las células se usó un sistema de rotura de células en prensa francesa (Constant Systems Ltd., Warwick, Reino Unido) fijando la temperatura a -7°C a 10°C y 30 K PSI. En las células resuspendidas se comprobó la rotura mediante lecturas de la A<sub>600</sub> antes y después de ciclar a través de la Prensa Francesa. La suspensión de células lisadas se sedimentó a 10.000 G durante 30 minutos. El sobrenadante se recolectó del sedimento residual para purificación de proteínas.

Veinticinco mililitros de la resina Amilosa (New England Biolabs, Beverly, MA) se vertieron en una columna de cristal Bio-Rad de 2,5 cm de D x 10 cm de altura. La columna se empaquetó y equilibró por gravedad con 10 volúmenes de columna (CV) del tampón de equilibrado de Amilosa. El sobrenadante celular recolectado se cargó de forma discontinua en la resina Amilosa, durante la noche con balanceo. La resina cargada se devolvió a la columna de cristal, se lavó con 10 VC de tampón de equilibrado Amilosa y se eluyó por gravedad con -2 VC de tampón de elución de Amilosa (tampón de equilibrado de Amilosa, maltosa 10 mM, Fluka Biochemical, Suiza). Se recogieron diez fracciones de 5 ml sobre el perfil de elución y se analizó la absorbancia a 280 y 320 nm. La resina Amilosa se regeneró con 1 VC de H<sub>2</sub>O destilada, 5 VC de SDS al 0,1 % (p/v) (Sigma), 5 VC de H<sub>2</sub>O destilada, 5 CV de tampón de equilibrado Amilosa y, por último, 1 CV de tampón de almacenamiento Amilosa (tampón de equilibrado de Amilosa, azida sódica al 0,02 % (p/v)). La resina regenerada se almacenó a 4 °C.

Las fracciones del perfil de elución de interés se combinaron y dializaron en una cámara de diálisis de 10K (Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemical) contra 4 cambios de 4l de PBS a pH 7,4 (Sigma) durante un periodo de tiempo de 8 horas. Tras la diálisis, el material recolectado representaba el polipéptido *huzcytor17/MBP-6H* purificado. El polipéptido *huzcytor17/MBP-6H* purificado se esterilizó mediante filtración y se analizó mediante tinción con azul de Coomassie en SDS-PAGE para un producto de peso molecular adecuado. Mediante análisis BCA se determinó que la concentración del polipéptido *huzcytor17/MBP-6H* era 0,76 mg/ml.

El polipéptido huzcytor17/MBP-6H purificado se formuló adecuadamente para la inmunización de conejos y se envió a R & R Research and Development (Stanwood, WA) para la producción de anticuerpos policlonales (Ejemplo 25, más adelante).

## 5 Ejemplo 25

### *Anticuerpo policlonal del receptor zcytor17 humano*

#### *A. Preparación y Purificación*

10 Los anticuerpos policlonales se prepararon inmunizando 2 conejos hembra blancos New Zealand con la proteína recombinante purificada huzcytor17/MBP-6H (Ejemplo 24). A cada conejo se administró una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 200 µg de proteína purificada en adyuvante completo de Freund, seguido de inyecciones IP de refuerzo de 100 µg de proteína en adyuvante incompleto de Freund cada tres semanas. De siete a diez días después de la administración de la segunda inyección de refuerzo (3 inyecciones totales), se extrajo sangre de los animales y se obtuvo el suero. Después, se administró refuerzo a los animales y se extrajo sangre cada tres semanas.

20 El suero de conejo específico de huzcytor17/MBP-6H se pre-adsorbió de anticuerpos anti-MBP usando una columna de proteínas CNBr-SEPHAROSE 4B (Farmacia LKB) que se preparó usando 10 mg de la proteína de fusión-MBP recombinante purificada no hespérica por gramo de CNBr-SEFAROSA. Los anticuerpos policlonales específicos de huzcytor17/MBP-6H se purificaron por afinidad a partir del suero de conejo pre-adsorbido usando una columna de proteínas CNBr-SEFAROSA 4B (Farmacia LKB) que se preparó usando 10 mg de la proteína recombinante purificada de antígeno específico de huzcytor17/MBP-6H. Tras la purificación, los anticuerpos policlonales se dializaron con 4 cambios de 20 veces el volumen de anticuerpo de PBS en un periodo de tiempo de al menos 8 horas. Los anticuerpos específicos de zcytor17 humanos se caracterizaron mediante ELISA usando 500 ng/ml de la proteína recombinante purificada huzcytor17/MBP-6H como diana del anticuerpo. El límite inferior de detección (LID) del anticuerpo purificado por afinidad antihuzcytor17/MBP-6H de conejo es 500 pg/ml en su antígeno recombinante purificado específico huzcytor17/MBP6H.

#### *B. SDS-PAGE y análisis de transferencia de tipo Western de anticuerpo ZcytoR17 MBP-6H anti-humano de conejo*

35 El anticuerpo ZcytoR17 MBP-6H anti-humano de conejo se analizó mediante SDS-PAGE (NuPage 4-12 %, Invitrogen, Carlsbad, CA) con el procedimiento de tinción con coomassie y transferencia de tipo Western usando IgG anti-conejo de cabra-HRP. Toda proteína purificada (200-25 ng) o medio acondicionado que contiene zcytor17 se sometió a electroforesis usando una mini-celda Invitrogen Novex's Xcell II y se transfirió a nitrocelulosa (0,2 mm, Invitrogen, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente usando el módulo de transferencia Xcell de Novex con agitación siguiendo las instrucciones proporcionados en el manual del instrumento. La transferencia se realizó a 300 mA durante una hora en un tampón que contiene basa Tris 25 mM, glicina 200 mM y metanol al 20 %. Después, el filtro se bloqueó con tampón Western A (interno, Tris 50 mM, a pH 7,4, EDTA 5 mM, pH 8,0, Igepal CA-630 al 0,05 %, NaCl 150 mM y gelatina al 0,25 %) durante la noche con balanceo suave a 4 °C. La nitrocelulosa se aclaró rápidamente, después, se añadió zcytoR17 MBP-6H anti-humano de conejo (1:1000) en tampón Western A. La transferencia se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente con balanceo suave. La transferencia se aclaró 3 veces durante 5 minutos cada vez en Western A, después se añadió anticuerpo IgG anti-conejo de cabra-HRP (1:1000) en tampón Western A. La transferencia se incubó durante 1,25 horas a temperatura ambiente con balanceo suave. La transferencia se aclaró 3 veces durante 5 minutos cada vez en Western A, después se aclaró rápidamente en H<sub>2</sub>O. La transferencia se desarrolló usando reactivos de sustrato quimioluminiscente comercialmente disponibles (reactivos de detección de transferencia Western ECL 1 y 2 mezclados 1:1; reactivos obtenidos en Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) y la transferencia se expuso a una película de rayos X durante hasta 15 minutos.

50 El zcytoR17 MBP-6H anti-humano de conejo pudo detectar zcytor17 humano presente en medio acondicionado, así como proteína purificada zcytor17 en forma de una banda a 120 kDa en condiciones reductoras.

## 55 Ejemplo 26

### *Distribución tisular de zcytor17 de ratón en paneles tisulares usando PCR*

60 Un panel de ADNc de tejidos murinos se sometió a detección selectiva de la expresión de zcytor17 de ratón usando PCR. El panel se realizó de forma interna y contenía 94 ADNc maratón y muestras de ADNc de varios tejidos y líneas celulares murinos normales y cancerosas se muestran en la Tabla 6, más adelante. Los ADNc procedían de bibliotecas internas o ADNc maratón de preparaciones de ARN internas, ARN de Clontech o ARN de Invitrogen. Los ADNc maratón de ratón se prepararon usando el kit marathon-Ready™ (Clontech, Palo Alto, CA) y el CC se analizó con los cebadores del receptor de transferrina de ratón ZC10,651 (SEC ID N° 46) y ZC10,565 (SEC ID N° 47) y después se diluyeron basándose en la intensidad de la banda de transferrina. Para garantizar la calidad de las muestras amplificadas en biblioteca en el panel se realizaron tres ensayos de control de calidad (CC): (1) Para

evaluar la calidad del ARN usado para las bibliotecas, los ADNc internos se analizaron según el tamaño medio del inserto mediante PCR con oligos vectores que eran específicos de las secuencias del vector para una biblioteca de ADNc individual; (2) La estandarización de la concentración del ADNc en las muestras del panel se consiguió usando procedimientos de PCR estándar para amplificar la alfa tubulina de longitud completa o el ADNc de G3PDH usando un oligo vector en 5': ZC14,063 (SEC ID N° 48) y el oligo cebador específico de la alfa tubulina en 3' ZC17,574 (SEC ID N° 49) o el oligo cebador específico de 3' G3PDH ZC17,600 (SEC ID N° 50); y (3) se envió una muestra para secuenciar para comprobar la posible contaminación con AND ribosómico o mitocondrial. El panel se fijó en un formato de 96 pocillos que incluyó una muestra control para ADN genómico de ratón (Clontech, Palo Alto, CA). Cada pocillo contenía aproximadamente ,2-100 pg/μl de ADNc. La PCR se fijó usando oligos ZC38,065 (SEC ID N° 51) y ZC38,068 (SEC ID N° 52), TaKaRa Ex Taq™ (TAKARA Shuzo Co LTD, Biomedicals Group, Japón) y pigmento Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). La amplificación se llevó a cabo del siguiente modo: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; 5 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 30 segundos; 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, seguido de 1 ciclo a 72 °C durante 5 minutos. Aproximadamente 10 μl del producto de reacción de la PCR se sometieron a electroforesis estándar en gel de agarosa usando un gel de agarosa al 4 %. El tamaño correcto previsto del fragmento de ADN se observó en cerebro, células CD90+, dendríticas, embriones, MEWt#2, línea celular de próstata-Tivak, glándula salivar, piel y testículos.

El fragmento de ADN para piel y testículos se escindió y purificó usando el kit Gel Extraction (Qiagen, Chatsworth, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se confirmaron mediante secuenciación para mostrar que, de hecho, eran zcytor17 de ratón.

Tabla 6

Tejido/Línea celular	Nº de muestras	Tejido/Línea celular	Nº de muestras
229	1		
7F2	1		
Adipositos-amplificado	1		
aTC1,9	1		
Cerebro	4		
CCC4	1		
CD90+ Amplificado	1		
OC10B	1		
Dendrítica	1		
De embrión	1		
Corazón	2		
Riñón	3		
Hígado	2		
Pulmón	2		
MEWt#2	1		
P388D1	1		
Páncreas	1		
Placenta	2		
Línea celular de próstata-Jakotay	1		
Línea celular de próstata-Nelix	1		
Línea celular de próstata-Paris	1		
Línea celular de próstata-Torres	1		
Línea celular de próstata-Tuvak	1		
Glándula salival	2		
Músculo esquelético	1		
Piel	2		
Intestino delgado	1		
Músculo liso	2		
Bazo	2		
Estómago	1		
Testículos	3		
Timo	1		

25 **Ejemplo 27: Expresión de Zcytor17 humano en varios tejidos usando RT/PCR cuantitativo en tiempo real**

A. Cebadores y sondas para Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17lig humanos para RT-PCR cuantitativa y convencional

30 La RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7900 PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) se ha descrito anteriormente (véase, Heid, C.A. y col., Genome Research 6:986-994, 1996; Gibson, U.E.M. y col., Genome Research 6:995-1001, 1996; Sundaresan, S. y col., Endocrinology

139:4756-4764, 1998). Este procedimiento incorpora el uso de una sonda específica de gen que contiene pigmentos fluorescentes tanto indicador como inactivador. Cuando la sonda está intacta se anula la emisión del pigmento indicador debido a la estrecha proximidad del pigmento inactivador. Durante la extensión de PCR usando cebadores adicionales directos e inversos específicos de gen, la sonda se escinde mediante la actividad de 5' nucleasa de la Taq polimerasa, que libera el pigmento indicador de la sonda y tiene como resultado un incremento de la emisión de fluorescencia.

Los cebadores y las sondas usados para análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real de la expresión de Zcytor17, OSMRbeta and Zcytor17ligand humanos se diseñaron usando el software de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores para Zcytor17 humano se diseñaron saltando las áreas en la unión intrón-exón para eliminar la posible amplificación de ADN genómico. El cebador directo ZC37,877 (SEC ID N1 53) y el cebador inverso, ZC37,876 (SEC ID N° 54) se usaron en una reacción de PCR a una concentración de 200 nM para sintetizar un producto de 73 pb. La correspondiente sonda de Zcytor17 TaqMan®, designada ZC37,776 (SEC ID N° 55) se sintetizó y se marcó mediante PE Applied Biosystems y se usó en cada reacción de PCR a una concentración de 200 nM. La sonda ZC37,776 (SEC ID N° 55) se marcó en el extremo 5' con un pigmento fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un pigmento inactivador fluorescente (6-carboxi-tetrametilrodamina) (TAMRA) (Epoch Biosciences, Bothell, WA).

Los cebadores para OSMRbeta humano se diseñaron saltando las áreas en la unión intrón-exón para eliminar la posible amplificación de ADN genómico. El cebador directo ZC43,891 (SEC ID N° 137) y el cebador inverso, ZC43,900 (SEC ID N° 138) se usaron en una reacción de PCR (más adelante) a una concentración de 200 nM. La correspondiente sonda de OSMRbeta TaqMan®, designada ZC43,896 (SEC ID N° 139) se sintetizó y se marcó mediante PE Applied Biosystems y se usó en cada reacción de PCR a una concentración de 200 nM. La sonda ZC43,896 (SEC ID N° 139) se marcó en el extremo 5' con un pigmento fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un pigmento inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences).

Los cebadores para Zcytor17ligand humano se diseñaron saltando las áreas en la unión intrón-exón para eliminar la posible amplificación de ADN genómico. El cebador directo ZC43,280 (SEC ID N° 140) y el cebador inverso, ZC43,281 (SEC ID N° 141) se usaron en una reacción de PCR (más adelante) a una concentración de aproximadamente 200 nM. La correspondiente sonda de Zcytor17ligand TaqMan®, designada ZC43,275 (SEC ID N° 142) se sintetizó y se marcó mediante PE Applied Biosystems y se usó en cada reacción de PCR a una concentración de 200 nM. La sonda ZC43,275 (SEC ID N° 142) se marcó en el extremo 5' con un pigmento fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un pigmento inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences).

Como control para analizar la integridad y la calidad de las muestras de ARN analizadas, se sometió a detección selectiva a todas las muestras de ARN para ARNr o GUS usando conjuntos de cebador y sonda adquiridos en PE Applied Biosystems (kit de ARNr) o diseñados internamente (GUS). El kit de ARNr contenía el cebador directo (SEC ID N° 56), el cebador inverso de ARNr (SEC ID N° 57) y la sonda de ARNr TaqMan® (SEC ID N° 58). La sonda de ARNr se marcó en el extremo 5' con un pigmento fluorescente indicador VIC (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un pigmento inactivador fluorescente TAMRA (PE Applied Biosystems). Los cebadores y la sonda GUS se generaron de forma interna y se usaron en cada reacción de PCR a 200 nM y a 100 nM, respectivamente. El cebador directo fue ZC40,574 (SEC ID N° 143) y el cebador inverso fue ZC40,575 (SEC ID N° 144). La sonda GUS ZC43,017 (SEC ID N° 145) se marcó en el extremo 5' con un pigmento fluorescente indicador (Yakima-Yellow) (Epoch Biosciences) y en el extremo 3' con un pigmento inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). El ARNr y los resultados de GUS también sirven como control endógeno y permiten la normalización de los resultados de expresión del ARNm de Zcytor17 observados en las muestras de ensayo.

Para la RT-PCR no cuantitativa convencional, los cebadores se diseñaron usando el software de diseño de cebadores Primer Express Software (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores de zcytor17 humano generan un producto de aproximadamente 1000 pares de bases y son los siguientes: el cebador directo ZC28,917 (SEC ID N° 83) y el cebador inverso fue ZC28,480 (SEC ID N° 146). Los cebadores de OSMRbeta humano generan un producto de 202 pares de bases y son los siguientes: el cebador directo ZC41,653 (SEC ID N° 147) y el cebador inverso ZC41,655 (SEC ID N° 148). Los cebadores de Zcytor17ligand humano generan un producto de 305 pares de bases y son los siguientes: el cebador directo ZC41,703 (SEC ID N° 149) y el cebador inverso ZC41,704 (SEC ID N° 150).

*B. Cebadores y sondas para Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17ligand murinos para RT-PCR cuantitativa y convencional*

Los cebadores y las sondas usados para análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real de la expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17ligand murinos se diseñaron usando el software de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores para Zcytor17 murino se diseñaron saltando las áreas en la unión intrón-exón para eliminar la posible amplificación de ADN genómico. El cebador directo ZC43,272 (SEC ID N° 151) y el cebador inverso, ZC43,273 (SEC ID N° 152) se usaron en las reacciones de PCR (más

adelante) a una concentración de 300 nM. La correspondiente sonda de Zcytor17 TaqMan®, designada ZC43,478 (SEC ID N° 153) se sintetizó y se marcó mediante PE Applied Biosystems. La sonda ZC43,478 (SEC ID N° 153) se marcó en el extremo 5' con un pigmento fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un pigmento inactivador fluorescente (6-carboxi-tetrametilrodamina) (TAMRA) (PE Applied Biosystems). La sonda ZC43,478 (SEC ID N° 153) se usó en las reacciones de PCR a una concentración de 100 nM.

Los cebadores para Zcytor17ligand murino se diseñaron saltando las áreas en la unión intrón-exón para liminar la posible amplificación de ADN genómico. El cebador directo ZC43,278 (SEC ID N° 154) y el cebador inverso, ZC43,279 (SEC ID N° 155) se usaron en las reacciones de PCR a una concentración de 500 nM. La correspondiente sonda de Zcytor17ligand TaqMan®, designada ZC43,276 (SEC ID N° 156) se sintetizó y se marcó mediante PE Applied Biosystems. La sonda ZC43,478 (SEC ID N° 153) se marcó en el extremo 5' con un pigmento fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un pigmento inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). La sonda ZC43,276 (SEC ID N° 156) se usó en las reacciones de PCR (más adelante) a una concentración de 200 nM.

Los cebadores para OSMRbeta murino se diseñaron saltando las áreas en la unión intrón-exón para liminar la posible amplificación de ADN genómico. El cebador directo ZC43,045 (SEC ID N° 157) y el cebador inverso, ZC43,046 (SEC ID N° 158) se usaron en las reacciones de PCR a una concentración de 300 nM. La correspondiente sonda de OSMRbeta TaqMan®, designada ZC43,141 (SEC ID N° 159) se sintetizó y se marcó mediante Epoch Biosciences. La sonda ZC43,141 (SEC ID N° 159) se marcó en el extremo 5' con un pigmento fluorescente indicador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un pigmento inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). La sonda ZC43,141 (SEC ID N° 159) se usó en las reacciones de PCR (más adelante) a una concentración de 100 nM.

Como control para analizar la integridad y la calidad de las muestras de ARN analizadas, se sometió a detección selectiva a todas las muestras de GUS murino o receptor de transferrina usando cebadores y sondas diseñadas usando el programa de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Los cebadores de GUS murinos son los siguientes: cebador directo ZC43,004 (SEC ID N° 160), el cebador inverso ZC43,005 (SEC ID N° 161) y la sonda de ZC43,018 TaqMan® (SEC ID N° 162). La sonda GUS ZC43,018 murina (SEC ID N° 162) se marcó en el extremo 5' con un pigmento fluorescente indicador (Yakima-Yellow) (Epoch Biosciences) y en el extremo 3' con un pigmento inactivador no fluorescente (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). Los cebadores GUS murinos se usaron en las reacciones de PCR a 300 nM y la sonda ZC43,018 (SEC ID N° 162) se usó a 100 nM. En algunos casos se usó el receptor de la transferrina murina en lugar de GUS como control endógeno. El cebador directo del receptor de la transferrina, ZC40,269 (SEC ID N° 163) y el cebador inverso, ZC40,268 (SEC ID N° 164) se usaron a 300 nM. La sonda del receptor de la transferrina, ZC40,298 (SEC ID N° 165) se usó en la PCR a 100 nM y se marcó en el extremo 5' con un pigmento fluorescente indicador VIC (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un pigmento inactivador fluorescente (TAMRA) (PE Applied Biosystems). Los resultados de GUS y del receptor de la transferrina murinos también sirven como control endógeno y permiten la normalización de los resultados de expresión del ARNm de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17ligand observados en las muestras de ensayo.

Para la RT-PCR semicuantitativa convencional, los cebadores se diseñaron usando el software de diseño de cebadores Primer Express Software (PE Applied Biosystems). Los cebadores de Zcytor17 murino generan un producto de 276 pares de bases y son los siguientes: el cebador directo ZC43,140 (SEC ID N° 166) y el cebador inverso ZC43,139 (SEC ID N° 167). Los cebadores de OSMRbeta murino generan un producto de 575 pares de bases y son los siguientes: el cebador directo ZC41,608 (SEC ID N° 168) y el cebador inverso ZC41,609 (SEC ID N° 169). Los cebadores de Zcytor17ligand murino generan un producto de 675 pares de bases y son los siguientes: el cebador directo ZC41,502 (SEC ID N° 170) y el cebador inverso ZC41,500 (SEC ID N° 171).

### *C. Protocolos para RT-PCR cuantitativa en tiempo real y RT-PCR semicuantitativa convencional*

Los niveles relativos del ARNm de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17ligand se determinaron analizando las muestras de ARN total usando el procedimiento de RT-PCR de una etapa (PE Applied Biosystems). El ARN total de las células BAF (humanas) o células BHK (murinas) transfeccionadas con Zcytor17- y OSMRbeta se aisló mediante procedimientos estándar y se usó para generar una curva estándar usada para cuantificar Zcytor17 y OSMRbeta. La curva consistió en diluciones por 10 en serie que varían de 100-0,01 ng/μl con cada punto de la curva estándar analizado por triplicado. De un modo similar, para Zcytor17ligand, el ARN de los linfocitos T activados (que antes se ha mostrado que generan Zcytor17ligand) se usó para generar una curva estándar en el mismo intervalo de 100-0,01ng/μl. El ARN total de células humanas o murinas se analizó por triplicado para los niveles de transcripción de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17ligand humanos o murinos y para uno de los siguientes genes control endógenos: ARNr, GUS o receptor de transferrina. En un volumen total de 10 μl, cada muestra de ARN se sometió a una reacción de RT-PCR de una etapa que contiene: Aproximadamente 50-100 ng de ARN total en una mezcla maestra 2C preformulada que contiene un pigmento control interno (ROX)(carboxi-x-rodamina) y ADN polimerasa ThermoStart® (Abgene, Surrey, Reino Unido); los cebadores adecuados para el gen de interés (véanse las partes A y B del ejemplo actual), la sonda adecuada (véanse las partes A y B para concentración); transcriptasa inversa Superscript®

- (50 U/μl) (PE Applied Biosystems) y un volumen adecuado de agua sin ARNasa. Las condiciones de ciclado térmico para PCR fueron las siguientes: una etapa inicial de transcripción inversa (RT) de un ciclo a 48 °C durante 30 minutos; seguido de una etapa de activación con la enzima Thenmo-Start® de un ciclo a 95 °C durante 10 minutos; seguido de 40 ciclos de amplificación a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minutos. Los niveles relativos del ARN de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17ligand se determinaron usando el procedimiento de la Curva Estándar como ha descrito el fabricante, PE Applied Biosystems (boletín para el usuario nº 2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, December 11, 1997). Las mediciones de ARNr, GUS y receptor de transferrina se usaron para normalizar los niveles del gen de interés.
- 10 Las reacciones de RT-PCR semicuantitativa usaron el sistema de RT-PCR de una etapa Superscript con Platinum Taq' (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada reacción de 25 μl consistió en lo siguiente: 12,5 μl de tampón de reacción 2X, 0,5 μl (2 Opmol/μl) del cebador directo, 0,5 μl (20 pmol/μl) del cebador inverso, 0,4 μl de la mezcla de RT/polimerasa Taq, 5,0 μl de tampón de carga Rediload Gel Loading Buffer (Invitrogen), 5,1 μl de agua sin ARNas y 1,0 μl de ARN total (100 ng/μl). La amplificación se llevó a cabo del siguiente modo: Un ciclo a 45 °C durante 30 minutos, seguido de 35-38 ciclos de 94 °C, 20 segundos; temperatura de hibridación variable (véase la Tabla 7 a continuación), 20 segundos; 72 °C, 45 segundos; después se terminó con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. De ocho a diez microlitros del producto de reacción de la PCR se sometieron a electroforesis estándar en gel de agarosa usando un gel de agarosa al 2 %.

20

Tabla 7

Zcytor17 murino	Temp. de hibridación 58 °C
OSMRbeta murino	Temp. de hibridación 60 °C
Zcytor17ligand murino	Temp. de hibridación 52 °C
Zcytor17 humano	Temp. de hibridación 55 °C
OSMRbeta humano	Temp. de hibridación 59 °C
Zcytor17ligand humano	Temp. de hibridación 59 °C

*D. Aislamiento de ARN de subpoblaciones de PBMC y líneas celulares humanas y murinos*

- Se extrajo sangre de varios donantes anónimos y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron usando metodología estándar en gradiente de Ficoll. Después, se aislaron los monocitos usando el kit de aislamiento de monocitos y el sistema de separación celular magnética (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Después, los monocitos se sembraron sobre placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja en medio sin endotoxinas. No se estimularon o se trataron con IFNγ recombinante humano (R&D Systems Inc.) a 10ng/ml. Las células se recolectaron a 24 y 48 horas. De un modo similar, se aislaron los linfocitos T CD4+ and CD8+ de los PBMC usando las perlas magnéticas anti-CD4 o anti-CD8 de Miltenyi Biotec. Después, las células se activaron durante 4 o 16 horas en placas de cultivo tisular revestidas con anticuerpos anti-CD3 0,5 μg/ml en medio que contiene anticuerpos anti-CD28 5 μg/ml. También se aislaron células NK de los PBMC usando anti-perlas magnéticas revestidas de Miltenyi. Algunas de las células NK se recolectaron a tiempo cero para ARN y las demás se sembraron en medio que contiene acetato de forbol miristato (μMA) (5ng/ml) e ionomicina (0,5 μg/ml) durante 24 horas. Adicionalmente, se recolectaron varias líneas celulares similares a los monocitos humanos, U937, THP1 y H-60, en sus estados de reposo o de activación. Las células U937 se activaron durante la noche con PMA (10 mg/ml). Las HL-60 se activaron durante la noche con PMA (10 ng/ml) o durante 72 y 96 horas con IFNγ (10 ng/ml) para dirigir las hacia una vía monocítica. Las células THP-1 se activaron durante la noche con una combinación de LPS (10 ng/ml) e IFNγ (10 ng/ml). Se preparó ARN a partir de todas las células primarias usando el kit RNeasy Midiprep™ (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN contaminante se eliminó usando el kit DNA-Free™ (Ambion, Inc., Austin, TX). La concentración de ARN se determinó usando espectrofotometría estándar y la calidad del ARN se determinó usando el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

- El ARN de células T murinas se recolectó usando varios procedimientos conocidos en la técnica. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ esplénicos primarios se aislaron de bazo de ratones C57B1/6 usando perlas magnéticas revestidas con anticuerpos y el sistema de separación celular magnética de Miltenyi Biotec. Después, los linfocitos T CD4+ and CD8+ se activaron cultivando las células en placas de 24 pocillos revestidas con anticuerpos anti-CD3 (500 ng/ml) en medio que contiene anticuerpos anti-CD28 5 μg/ml. Las células se recolectaron para obtener el ARN a 0, 4 y 16 horas. De un modo similar, los linfocitos T CD4+ se aislaron y, después, se desviaron a un fenotipo Th1 o Th2 usando el protocolo siguiente. Dado que las células T C57B1/6 ya se han desviado a la dirección Th1, todo ello era necesario para activar durante 6 horas con 0,5 μg/ml de PMA y 10 ng/ml de ionomicina. La desviación a Th2' se obtuvo sembrando linfocitos T CD4+ no expuestos anteriormente con 2,5 μg/ml de anti-CD28, 10ng/ml de mL-2 (R&D Systems Inc.) y 25ng/ml de mL-4 (R&D Systems) en placas recubiertas con 0,5 μg/ml de anti-CD3. Después de 2 días de cultivo, las células se resuspendieron en medio que contiene 10 ng/ml de mL-2 (R&D Systems) y 25 ng/ml de mL-4. Las células se cultivaron durante tres días adicionales y después se activaron con PMA e ionomicina durante 6 horas.

Un conjunto adicional de linfocitos T desviados a Th1 y Th2 se obtuvo usando la línea de células T DO11.10

transgénicas del receptor de células T. Todas las células se sembraron en placas revestidas con anti-CD3 y anti-CD28. Las células "Th1" se sembraron en medio que contiene mIL-12 (1ng/ml) y anti-IL-4 (10 µg/ml). Las células "Th2" se sembraron en medio que contiene mIL-4 (10 ng/ml) y anti-IFNg(10 µg/ml). Tras 24 horas, todos los cultivos recibieron mIL-2 (10 ng/ml). Después de dos días más, el medio de las células se cambió y se añadió medio nuevo que contiene las citocinas mencionadas anteriormente y las células se cultivaron 4 días adicionales antes de su recolección.

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

*E. Aislamiento de ARN de los modelos murinos de pancreatitis y enfermedad del intestino irritable*

Para inducir una afección similar a la Enfermedad del Intestino Irritable (EII), se usó la cepa de ratón híbrido C57B16/129S6F1. Los ratones se dividieron en 4 grupos con un tamaño medio de seis ratones por grupo. Al grupo 1 no se administró dextrano sulfato sódico (DSS) y se sacrificó el día 14. El grupo 2 recibió DSS al 2 % durante dos días antes de su sacrificio. El grupo 3 recibió DSS al 2 % durante siete días antes de su sacrificio El grupo 4 recibió DSS al 2 % durante siete días, después se les dejó recuperar durante siete días y se sacrificó el día 14. El día del sacrificio, las secciones del colon distal se eliminaron e introdujeron en RNAlater™ (Ambion). Las secciones de colon se homogeneizaron usando técnicas estándar y el ARN se aisló usando el kit RNeasy Midiprep™ (Qiagen). El ADN contaminante se eliminó mediante tratamiento DNA-free™ (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante.

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

En otro estudio más, se generaron ratones transgénicos con Zcytor17ligand murino y se observaron los cambios fenotípicos (véase el Ejemplo 41). En muchos de los ratones transgénicos se observó piloerección y pérdida de pelo. Se sacrificó a cuatro ratones transgénicos y las muestras de piel de áreas normales y sin pelo se eliminaron y se ultracongelaron para su posterior aislamiento de ARN. También se recogieron secciones de piel de dos ratones control no transgénicos. Las muestras de piel se homogeneizaron y, después, se digirieron con proteinasa K (Qiagen) (Catalog# 19133) durante 20 minutos a 60 °C. Después, se aisló el ARN usando el kit Qiagen RNeasy Midiprep™ siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN contaminante se eliminó usando el kit DNA-Free™ de Ambion.

*F. Resultados de RT-PCR cuantitativa y semicuantitativa para Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17ligand humanos*

La expresión de Zcytor17 and OSMRbeta se analizó mediante RT-PCR cuantitativa en cuatro conjuntos de monocitos humanos primarios que estaban en estado de reposo o activados con IFNg durante 24 o 48 horas. La expresión de Zcytor17 estaba por debajo de los niveles de detección en las células no estimuladas, pero aumentó espectacularmente tras la activación de 24 horas con IFNg y el valor más elevado se alcanzó tras 48 horas de activación. En todos los casos los niveles de OSMRbeta estaban por debajo de los límites de detección. En estas muestras no se probó el Zcytor17ligand.

En los linfocitos T primarios, los niveles de Zcytor17 estaban por debajo de los límites de detección en las subpoblaciones CD4+ y CD8+ en reposo. No obstante, tras una activación de cuatro horas, la expresión de Zcytor17 aumentó en ambas subpoblaciones y, después, disminuyó hasta un nivel ligeramente menor en el punto de tiempo de 16 horas. En estas muestras el OSMRbeta estaba por debajo de los límites de detección. La expresión de Zcytor17ligand se analizó usando RT-PCR semicuantitativa. No se detectó expresión alguna en los linfocitos T CD4+ y CD8+ sin estimular. No obstante, tras una activación de cuatro horas, se detectaron niveles altos de Zcytor17ligand. Este nivel disminuyó algo en el punto de tiempo de 16 horas.

La expresión de Zcytor17 no se analizó en células NK. En estas muestras el OSMRb estaba por debajo de los límites de detección. La expresión de Zcytor17ligand estaba por debajo de los límites de detección en las células NK en reposo, no obstante había una débil señal generada por las células NK activadas, lo que sugiere que estas células pueden fabricar Zcytor17ligand en ciertas condiciones.

En las líneas celulares similares a los monocitos humanos U937, THP-1 y HL-60, la expresión de OSMRbeta estaba por debajo de los límites de detección en todas las muestras en reposo y activadas, a excepción de las muestras THP-1 activadas en las que se detectó una señal débil. La expresión de Zcytor17 fue alta en las líneas celulares en reposo tanto U937 como THP-1 y mostró una fuerte regulación por aumento tras la activación. La expresión en U937 ERA la más elevada de las de todos los tipos celulares. En HL-60, Zcytor17 se expresó a niveles moderados en las



células no estimuladas y disminuyó tras la estimulación con PMA. No obstante, la expresión de Zcytor17 se regló por aumento espectacularmente en HL-60 cuando se estimuló con IFNg durante 72 y 96 horas. Todos los datos de expresión en seres humanos se resumen en la Tabla 8 siguiente.

5

Tabla 8

Monocitos primarios humanos	Estado de activación	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17ligand
Monocitos humanos	Sin estim.	-	-	
Monocitos humanos	Act. 24 h con IFNg	+	-	
Monocitos humanos	Act. 48 h con IFNg	++	-	
CD4+ humanos	Sin estim.	-	-	-
CD4+ humanos	Act. 4 h	++	-	++
CD4+ humanos	Act. 16 h	+	-	+
CD8+ humanos	Sin estim.	-	-	-
CD8+ humanos	Act. 4 h	++	-	++
CD8+ humanos	Act. 16 h	+	-	+
Células NK humanas	Sin estim.	-	-	-
Células NK humanas	Act. 24 h	-	-	+
U937	Sin estim.	++	-	-
U937	Act. 16 h	+++	-	-
THP-1	Sin estim.	++	-	-
THP-1	Act. 16 h	+++	+	-
HL-60	Sin estim.	++	-	-
HL-60	Act. 16 con PMA	+	-	-
HL-60	Act. 72 h con IFNg	+++	-	-
HL-60	Act. 96 h con IFNg	+++	-	-

G. Resultados de RT-PCR cuantitativa y semicuantitativa para Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17ligand murinos

10 Los niveles de expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17ligand murinos se analizaron en varias poblaciones de linfocitos T murinos y los resultados se resumen en la Tabla 9 siguiente. La expresión de Zcytor17 murino se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa y se muestra que está a niveles bajos en linfocitos T CD4+ primarios tanto en reposo como activados. La expresión de Zcytor17 se detectó en linfocitos T CD8+ en reposo y, después, pareció que descendía tras la activación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en los puntos de tiempo de 4 y de 16 horas. La expresión de OSMRbeta se midió mediante RT-PCR cuantitativa y se mostró que se expresaba en linfocitos T CD4+ y CD8+ tanto en reposo como activados. La expresión de OSMRbeta aumentó tras una activación de 4 horas y, después, volvió a los niveles sin estimular a las 16 horas en los linfocitos T tanto CD4+ como CD8+. Se detectó Zcytor17ligand mediante RT-PCR cuantitativa y se mostró que se expresaba a niveles muy bajos en los linfocitos T CD4+ sin estimular. No obstante, tras una activación de 4 horas, la expresión de Zcytor17ligand estaba espectacularmente regulada por aumento y, después, disminuyó ligeramente en el punto de tiempo de 16 horas. En linfocitos T CD8+, no se detectó expresión de Zcytor17ligand en las células sin estimular. Había alguna expresión de Zcytor17ligand en el punto de tiempo de 4 horas, pero los niveles de expresión a las 16 horas habían disminuido por debajo de los límites de detección.

25 En los linfocitos T DO11.10, se detectó expresión de Zcytor17 en las células no expuestas previamente y desviadas a Th2, pero no en las células desviadas a Th1. La expresión de OSMRbeta estaba a niveles bajos en las células DO11.10 no expuestas previamente. Se observó un incremento espectacular de los niveles de expresión de OSMRbeta en las células desviadas a Th1 y un incremento moderado de la expresión en las células desviadas a Th2. En estas células, se mostró que la expresión de Zcytor17ligand estaba, predominantemente, en la subpoblación de células desviadas a Th2. Se detectaron niveles bajos en la subpoblación Th1 y no se detectó expresión en las células no expuestas previamente. Estos resultados se resumen en la Tabla 9 que se expone a continuación.

35 En los linfocitos T CD4+ primarios desviados en cualquiera de las direcciones Th1 o Th2, no se examinaron los niveles de Zcyto17. Se detectó expresión de OSMRbeta en las tres muestras, encontrándose los niveles más altos en la muestra de Th2. De un modo similar a los resultados en DO11.10, se detectaron niveles alto de expresión de Zcytor17ligand en la subpoblación desviada a Th2, detectándose una cantidad pequeña en la subpoblación Th1 y los niveles estaban por debajo de los límites de detección en las células sin estimular. Estos resultados se resumen en la Tabla 9 que se expone a continuación.

40

Tabla 9

Linfocitos T murinos	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17ligand
Linfocitos T CD4+ murinos sin estimular	+	+	+/-
Linfocitos T CD4+ activación de 4 h	+	++	++
Linfocitos T CD4+ activación de 16 h	+	+	+

Linfocitos T CD8+ sin estimular	+	+	-
Linfocitos T CD8+ activación de 4 h	+/-	++	+
Linfocitos T CD8+ activación de 16 h	-	+	-
DO11.10 no expuestas previamente	+	+	-
DO11.10 Th1	-	+++	+
DO11.10 Th2	+	++	++
Linfocitos T CD4+ murinos sin estimular		++	-
Linfocitos T CD4+ desviados a Th1		+++	+
Linfocitos T CD4+ desviados a Th2		++	+++

En las muestras de piel transgénica con Zcytor17ligand, los niveles de expresión de , Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17ligand se determinaron usando RT-PCR cuantitativa. Se demostró que había Zcytor17 en todas las muestras a niveles aproximadamente equivalentes. Había niveles de expresión de OSMRbeta espectacularmente más altos en los animales control no transgénicos que en las muestras transgénicas La expresión de Zcytor17ligand estaba por debajo de los límites de detección en los animales control no transgénicos con niveles de expresión de moderados a altos en los animales transgénicos. Los resultados se resumen en la Tabla 10 que se expone a continuación.

5

10

Tabla 10

Zcytor17ligand murino en piel transgénica	Fenotipo Skin	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17ligand
Ratón silvestre	Normal	+	+++	-
Ratón silvestre	Normal	+	+++	-
Transgénico nº 1	Normal	+	+	+
Transgénico nº 1	Pérdida de pelo	+	+	+
Transgénico nº 2	Normal	+	+	+
Transgénico nº 2	Pérdida de pelo	+	+	+
Transgénico nº 3	Normal	+	+	+
Transgénico nº 3	Pérdida de pelo	+	+	+
Transgénico nº 4	Normal	+	+	+++
Transgénico nº 4	Pérdida de pelo	+	+	+++

En un experimento diferente, los niveles de expresión de Zcytor17, OSMRbeta y Zcytor17ligand se midieron mediante RT-PCR cuantitativa en las pancreasas de ratones sometidos a pancreatitis aguda. En todas las muestras, la expresión de Zcytor17 estaba por debajo de los límites de detección. Se observaron niveles bajos de expresión de OSMRbeta en las muestras control normales (Grupo 1), pero mostraron una fuerte regulación por aumento en el punto de tiempo de 12 horas (Grupo 2) y niveles ligeramente menores en el punto de tiempo de 24 horas (Grupo 3). La expresión de Zcytor17ligand estaba por debajo de los límites de detección en los animales control, pero mostró niveles altos e los grupos de animales en los que se inyectó caeruleína. Los datos se resumen en la Tabla 11 que se expone a continuación.

15

20

Tabla 11

Modelo de pancreatitis	de Descripción	Zcytor17	OSMRbeta	Zcytor17ligand
Grupo 1	Control normal	-	+	-
Grupo 2	12 h tras la inyección	-	+++	++
Grupo 3	24 h tras la inyección	-	++	++

En otro experimento se analizaron los niveles de expresión de Zcytor17 y OSMRbeta en el colon distal de ratones sometidos a tratamiento con DSS. En este modelo murino de enfermedad intestinal inflamatoria, los niveles de expresión de ambos genes se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa y se resumen en la Tabla 12 que se expone a continuación. Los niveles de expresión de Zcytor17 aumentaron con la gravedad de la enfermedad, con niveles bajos de expresión en los animales normales del Grupo 1 y cantidades crecientes en los Grupos 2 y 3. En los animales del Grupo 4, los niveles de Zcytor17 habían retornado a niveles más normales. Al contrario que la expresión de Zcytor17, los niveles de OSMRbeta fueron los más elevados en los animales control y, en realidad, los niveles disminuyeron en los tres grupos tratados con DSS.

25

30

Tabla 12

Modelo de EII	Descripción	Día SAC	Zcytor17	OSMRbeta
Grupo 1	Control normal	14	+	++
Grupo 2	Tratados con DSS 2 días	2	++	+
Grupo 3	Tratados con DSS 7 días	7	+++	+
Grupo 4	Tratados con DSS 7 días	14	+	+

**Ejemplo 28**

5 *Expresión de la distribución tisular de Zcytor17lig humano basada en el análisis RT-PCR de ADNc de primera hebra en múltiples tejidos*

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

15 Las reacciones de PCR se fijaron usando los cebadores oligoméricos específicos de zcytor17lig, ZC41,458 (SEC ID Nº 60) y ZC41,457 (SEC ID Nº 61), que dan un producto de 139 pb, y ZC41,459 (SEC ID Nº 62), y ZC41,460 (SEC ID Nº 63), que dan un producto de 92 pb, Taq ADN polimerasa y tampón de Qiagen HotStar (Qiagen, Inc., Valencia, CA), dH<sub>2</sub>O y pigmento RediLoad™ (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). Las condiciones de ciclado para PCR fueron las siguientes: Un ciclo inicial de desnaturalización durante 15 minutos a 95 °C, 35 ciclos de una desnaturalización durante 45 segundos a 95 °C, 1 minuto de hibridación a 53 °C o 56 °C y 1 minuto y 15 segundos de extensión a 72 °C, seguido de una extensión del ciclo 1 final de 7 minutos a 72 °C. Las reacciones se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (EM Science, Gibbstown, NJ) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

25 Un fragmento de ADN del tamaño correcto se observó en los siguientes tejidos adultos humanos usando el panel "Human Tissue Rapid-Scan™ Panel": testículos, plasma, leucocitos de sangre periférica (PBL) y médula ósea.

30 Un fragmento de ADN del tamaño correcto se observó en las siguientes fracciones de sangre humana usando el panel "Human Blood Fractions MTC™ Panel" de Clontech: Células mononucleares activadas (linfocitos B y T y monocitos), linfocitos CD8+ activados (T supresores/citotóxicos), linfocitos CD4+ activados (T colaboradores/inductores) y ligeramente en linfocitos CD8+ en reposo.

**Ejemplo 29**

*Clonación del receptor de oncostatina M humana*

35 El receptor beta de la oncostatina M (OSMRbeta) es un receptor de citocinas de tipo I con similitud estructural con IL12R-B2. ZcytoR17 tiene similitud estructural con IL12R - B1. Los OSMRbeta y zcytor17 se analizaron para ver si podían interactuar como subunidades en un complejo de señalización de citocinas y si, juntos, podían actuar como un receptor de señalización, o antagonista del receptor soluble, para zcytor17lig.

40 Para aislar al OSMRbeta, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos para PCR ZC39982 (SEC ID Nº 64) y ZC39983 (SEC ID Nº 65) para amplificar la región de codificación de longitud completa de la secuencia de ADNc de la oncostatina M beta humana (SEC ID Nº 6) (Nº de registro en Genbank U60805; Mosley B, JBC Volumen 271, Número 50, de 20 de diciembre de 1996 pág. 32635-32643).

45 Las reacciones de PCR se realizaron en una matriz de moldes de biblioteca de ADNc usando una polimerasa sólida, Advantage II (Clontech, Palo Alto, CA), con el fin de identificar una fuente del ADNc. El ADN molde usado procedía de bibliotecas de plásmidos de ADNc amplificado, cada una con 5 millones de clones de ADNc independientes. Las reacciones se montaron según las instrucciones del fabricante usando 400 fmol/µl de cada oligonucleótido y 2-20 ng/µl de ADN de biblioteca de plásmidos purificados como molde. Las bibliotecas de ADNc procedían de los siguientes tejidos y líneas celulares humanos: Cerebro fetal, músculo liso de próstata, médula ósea, RPMI 1588, tiroides, WI-38, testículos, células mononucleares de sangre periférica estimuladas, células CD3+ estimuladas, THP-1, amígdala activada, HACAT e hígado fetal. Las reacciones se realizaron en un termociclador usando las condiciones siguientes: 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 3 minutos. Al final de los 30 ciclos se realizó un único ciclo de extensión adicional de 8 minutos a 68 °C. Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa TAE en presencia de bromuro de etidio, seguido de iluminación UV. Se encontró que el producto más abundante procedía de una biblioteca de ADNc en músculo liso de próstata. La reacción de PCR usando molde de músculo liso de próstata y los oligonucleótidos ZC39982 (SEC ID Nº 64) y ZC39983 (SEC ID Nº 65) se repitió usando una ADN polimerasa termoestable menos sólida pero más fiable "turboPfu", (Stratagene, La Jolla, CA) Se realizaron treinta ciclos de amplificación con las condiciones siguientes: Desnaturalización a 94 °C, 30 segundos, hibridación a 63 °C 45 segundos, extensión a 72 °C, 3,5 minutos. Se purificó en gel una única banda del producto, en un gel de agarosa TAE al 0,8 %.

65 Después, este ADN se amplificó de nuevo usando los cebadores ZC39980 (SEC ID Nº 66) y ZC39981 (SEC ID Nº 67) diseñados para incluir secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción con el fin de permitir la clonación de este ADNc en un vector de expresión en mamíferos.

La reacción de PCR se realizó usando "TurboPfu" y el producto de PCR purificado durante 15 ciclos de: 95 °C

durante 1 minuto, 64 °C durante 1 minuto 20 segundos, 72 °C durante 4,5 minutos. Después, la reacción de PCR se digirió con EcoR1 y Xho1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se purificó en gel como se ha descrito anteriormente. Se preparó un vector de expresión en mamíferos pZ7NX digiriendo con EcoR1 and Xho1 y el producto de la PCR se ligó en este vector y se sometió a electroporación en células DH10b de *E. coli*. Se aislaron y secuenciaron varias colonias bacterianas. Un clon era correcto, con la excepción de una única mutación no conservadora. Con el fin de cambiar esta base para coincidir con la secuencia prevista, se usó una mutación que abarca un oligonucleótido y un sitio de restricción vecino para Pst1 en una reacción de PCR con "TurboPfu" usando el plásmido pZP7Nx-h. OncostatinM R previamente secuenciado como molde. El ADN amplificado mediante PCR se digirió con Pst1 and Xho1 y se clonó de nuevo en el plásmido pZP7Nx-h OncostatinM R en lugar del fragmento de Pst1/Xho1 que contiene la mutación implicada. Este nuevo plásmido se secuenció sobre la región sometida a Pst1 to Xho1 recientemente amplificada para confirmar la corrección y garantizar que no se crearon otros errores en el proceso de amplificación. Este análisis confirmó la secuencia que coincidía con la secuencia prevista sobre la región de codificación. La secuencia se muestra en la SEC ID N° 6 y la correspondiente secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 7.

### Ejemplo 30

#### *Construcciones para generar un heterodímero del receptor de oncostatina M (OSMRbeta)/Zcytor17 humano*

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

Para construir una línea celular que exprese un heterodímero de hzcytor17/OSMRbeta humano soluble secretado se fabricó una construcción de modo que el receptor soluble heterodimérico resultante comprendiera el dominio extracelular de /OSMRbeta humano condensado con la cadena pesada de la IgG gamma1 (Fc4) (SEC ID N° 37) con una marca Glu-Glu (SEC ID N° 35) en el extremo C; mientras que el dominio extracelular de zcytoR17 está condensado con Fc4 (SEC ID N° 37) con una cola de His (SEC ID N° 72) en el extremo C. Para ambos brazos de hzcytor17 y OSMRbeta humano del heterodímero se introdujo mediante ingeniería genética un espaciador de Gly-Ser de 12 aminoácidos (SEC ID N° 73) entre la porción extracelular del receptor y el extremo N de Fc4.

#### *A. Construcción de OSMRbeta/Fc4-CEE humano soluble*

Para la construcción de la porción OSMRbeta/Fc4-CEE humana soluble del heterodímero, la porción extracelular de OSMRbeta humano se aisló usando PCR con los oligos Z14063 (SEC ID N° 48) y ZC41557 (SEC ID N° 74) en las condiciones de reacción de PCR siguientes: 30 ciclos de 95 °C durante 60 segundos, 57 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 100 segundos; y 72 °C durante 7 minutos. Los productos de la PCR se purificaron usando el kit de purificación QIAquick PCR Purification (Qiagen), se digirieron con EcoRI y BglIII (Boehringer-Mannheim), se separaron mediante electroforesis en gel y se purificaron usando un kit de extracción en gel QIAquick gel extracción (Qiagen).

El casete de expresión, la estructura del plásmido y la porción de la marca Fc4-GluGlu de la quimera estaban contenidos dentro de un vector plasmídico fabricado previamente internamente. El vector plasmídico se digirió con EcoR1 y BamH1 (Boehringer-Mannheim), se separó mediante electroforesis en gel y se purificó usando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen). Los fragmentos digeridos y purificados del plásmido que contiene OSMRbeta y Fc4-cEE humanos se ligaron usando la ADN ligasa de T4 (Life Technologies, Bethesda, MD) usando procedimientos de ligación estándar. Minipreparaciones de la ligación resultante se sometieron a detección selectiva de un inserto de EcoRI/SmaI del tamaño correcto (772 pb) para OSMRbeta soluble y las minipreparaciones positivas se secuenciaron para confirmar la precisión de la reacción de PCR. Esta nueva construcción plasmídica se denomina pZP9-ONCOMR-Fc4CEE.

#### *B. Construcción de Zcytor17/Fc4-CHIS humano soluble*

Para la construcción de la porción de hzcytor17/Fc4-CHIS del heterodímero, la porción extracelular de zcytor17 humano se aisló mediante digestión de un plásmido que previamente contenía el receptor soluble Zcytor17-Fc4. En primer lugar, el plásmido se digirió con Sal 1 (New England Biolabs, Beverly, MA), tras lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol-cloroformo y se precipitó en etanol. Después, el ADN digerido se trató con la ADN polimerasa de T4 (Boehringer-Mannheim), para llenar los salientes en 5' creados por la digestión con Sal1, dejando romos los extremos del ADN, tras lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol-cloroformo y se precipitó en etanol. El ADN con extremos romos se digirió después con BglIII para cortar en el extremo 3', se separó mediante electroforesis en gel y se purificó usando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN resultante que contiene la secuencia de codificación del dominio extracelular de zcytoR17 se ligó en una marca de Fc4-CHIS que contiene el vector de expresión en mamíferos preparado del siguiente modo.

El casete de expresión, la estructura del plásmido y la porción de la marca Fc4-CHIS de la quimera estaban

contenidos dentro de un vector plasmídico fabricado previamente internamente. Este vector plasmídico se digirió con EcoRI(Boehringer-Mannheim), tras lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol-cloroformo y se precipitó en etanol. Después, el ADN digerido se trató con la ADN polimerasa de T4 (Boehringer-Mannheim), para llenar los salientes en 5' creados por la digestión con EcoRI, dejando romos los extremos del ADN, tras lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol-cloroformo y se precipitó en etanol. El ADN con extremos romos se digirió después con BamH1 (Boehringer-Mannheim) para cortar en el extremo 3', se separó mediante electroforesis en gel y se purificó usando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen). Los fragmentos digeridos y purificados del plásmido que contiene zcytor17 y Fc4-CHIS humanos se ligaron usando la ADN ligasa de T4 (Life Technologies, Bethesda, MD) usando procedimientos de ligación estándar.

Las minipreparaciones de la unión resultante se sometieron a detección selectiva mediante PCR usando el cebador sentido específico de zcytor17 ZC29180 (SEC ID N° 22) y el cebador antisentido específico de Fc4 ZC29232 (SEC ID N° 75) con las siguientes condiciones de la reacción de PCR: 30 ciclos de 94 °C durante 60 segundos, 68 °C durante 150 segundos y 72 °C durante 7 minutos. Un tamaño de producto previsto de 848 pb confirmó el correcto ensamblaje del plásmido denominado pZEM228 hzcytor17/Fc4HIS.

Se creó una segunda construcción de zcytor17-Fc4 para usar en la generación de la proteína homodimérica a partir de células COS. Brevemente, la región de codificación de la proteína de fusión completa se aisló mediante digestión de un plásmido que previamente contenía el receptor soluble Zcytor17Fc4 con Sal1 (Boehringer-Mannheim). La reacción se extrajo en serie con fenol cloroformo y se precipitó en etanol. Después, el ADN digerido se trató con la ADN polimerasa de T4 (Boehringer-Mannheim), para llenar los salientes en 5' creados por la digestión con EcoRI, dejando romos los extremos del ADN, tras lo cual la reacción se extrajo en serie con fenol-cloroformo y se precipitó en etanol. El ADN con extremos romos se digirió después con Not1 (Boehringer-Mannheim) para cortar en el extremo 3', se separó mediante electroforesis en gel y se purificó usando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen). Un vector de expresión en mamíferos que contiene un casete de expresión dirigido por CMV se digirió para generar extremos compatibles y los 2 fragmentos se ligaron juntos. Las minipreparaciones de la unión resultante se sometieron a detección selectiva mediante PCR usando el cebador sentido específico ZC14063 (SEC ID N° 48) y el cebador antisentido específico de zcytor17 C27899 (SEC ID N° 19) con las siguientes condiciones de la reacción de PCR: 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 64°C durante 30 segundos; 70 °C durante 90 segundos y 72 °C durante 7 minutos. Un tamaño de producto previsto de aproximadamente 1000 pb confirmó el correcto ensamblaje del plásmido denominado pZP7NX-hzcytor17-Fc4. Este plásmido se transfeccionó después en células COS usando Lipofectamine (Gibco/BRL), según las instrucciones del fabricante. Las células se acondicionaron durante 60 horas en DMEM + FBS al 5 % (Gibco/BRL), tras lo cual la proteína se purificó sobre una columna de cromatografía en proteína G-sefarosa 4B y se presentó para los bioensayos in vitro, por ejemplo como los descritos en el presente documento.

### C. Generación de un receptor de Zcytor17 / oncostatina M (OSMRbeta) humano

Aproximadamente 16 µg de pZP9-ONCOMR-Fc4CEE y pZEM228 hzcytor17/Fc4HIS se co-transfeccionaron en células BHK-570 (N° ATCC CRL-10314) usando lipofectamine (Gibco/BRL), según las instrucciones del fabricante. Las células transfeccionadas se seleccionaron durante 10 días en DMEM + 5 % FBS (Gibco/BRL) que contiene 0,5 mg/ml de G418 (Gibco/BRL) y metiltrexato 250 nM (MTX) (Sigma, St. Louis, MO) durante 10 días.

La combinación resultante de células doblemente seleccionadas se usó para generar la proteína heterodimérica. Tres fábricas de células (Nunc, Denmark) de este grupo se usaron para generar 10 l de medio acondicionado sin suero. Este medio acondicionado se pasó sobre una columna de 1 ml de proteína A y se eluyó en (10) fracciones de 750 microlitros. Cuatro de estas fracciones que tenían la concentración más alta se combinaron y dializaron (corte de PM 10 kD) contra PBS. El complejo proteico zcytor17/OSMRbeta heterodimérico soluble se aisló de otros componentes del medio pasando la combinación sobre una columna de níquel y lavando la columna con varias concentraciones de imidazol. La proteína zcytor17/OSMRbeta soluble eluyó a concentraciones intermedias de imidazol, mientras que el homodímero hzcytor17/Fc4HIS eluyó a concentraciones más altas de imidazol.

### Ejemplo 31

*Distribución tisular de zcytor17 humano en paneles tisulares usando transferencia Northern y PCR*

#### A. Distribución tisular de zcytor17 humano usando transferencia Northern

Múltiples transferencias Northern de tejido humano (Human 12-lane MTN Blot I and II, and Human Immune System MTN Blot II; Human Endocrine MTN, Human Fetal MTN Blot II, Human Multiple Tissue Array) (Clontech) además de transferencias internas que contienen varios tejidos se unieron a sondas para determinar la distribución tisular de la expresión de zcytor17 humano. Las transferencias preparadas internamente incluyeron el siguiente ARNm tisular y de línea celular: células SK-Hep-1, células THP1, glándula suprarrenal (Clontech); riñón (Clontech), hígado (Clontech e Invitrogen); médula espinal (Clontech), testículos (Clontech), células T CD4+ humanas, células T CD8+ humanas, células T CD19+ humanas, reacción de linfocitos mixtos humanos (MLR), línea celular THP1 (N° ATCC TIB-202), línea celular U937, línea celular de linfoblastos de ratón p388D1 ne (N° ATCC CCL-46) con o sin

estimulación con ionomicina, y línea celular WI-38 embrionaria humana (Nº ATCC CRL-2221) con o sin estimulación con ionomicina.

Una sonda derivada de PCR de aproximadamente 500 pb para zcytor17 (SE ID NO:4) se amplificó usando los oligonucleótidos ZC28,575 (SEC ID Nº 77) y ZC27,899 (SEC ID Nº 19) como cebadores. La amplificación por PCR se llevó a cabo del siguiente modo: 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto, seguido de 1 ciclo a 72 °C durante 7 minutos. El producto de la PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa y el producto de la PCR de aproximadamente 500 pb se purificó en gel como se ha descrito en el presente documento. La sonda se marcó radiactivamente usando el kit de marcaje PRIME IT II™ Random Primer Labeling Kit (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna de empuje NUCTRAP™ (Stratagene). La solución EXPRESSHYB™ (Clontech) se usó para prehibridación y como solución de hibridación para las transferencias Northern. La prehibridación se llevó a cabo a 68 °C durante 2 horas. La hibridación tuvo lugar durante la noche a 68 °C con aproximadamente  $5 \times 10^6$  cpm/ml de sonda marcada. Las transferencias se lavaron tres veces a temperatura ambiente en 2X SSC, 0,05 % SDS, seguido de 1 lavado durante 10 minutos en 2X SSC, 0,1 % SDS a 50 °C. Se visualizaron varias bandas leves tras varios días de exposición. Se observó un transcrito de aproximadamente 9 kb en tráquea, músculo esquelético y timo; se observó un transcrito de aproximadamente 2 kb en células PBL, HPV, U937 y THP-1; y se observó un transcrito de aproximadamente 1,2 kb en placenta, médula ósea y tiroides, y células HPV y U937. En todos los tejidos citados anteriormente, la intensidad de la señal fue débil. Pareció haber poca expresión en la mayoría de los tejidos normales, lo que sugiere que la expresión de zcytor17 puede depender de la activación de la célula o los tejidos en los que se expresó,

#### B. Distribución tisular en paneles de tejidos usando PCR

Un panel de ADNc de tejidos humanos se sometió a detección selectiva de la expresión de zcytor17 usando PCR. El panel se realizó de forma interna y contenía 94 ADNc maratón y muestras de ADNc de varios tejidos y líneas celulares humanas normales y cancerosas como se muestran en la Tabla 13. Los ADNc procedían de bibliotecas internas o ADNc maratón de preparaciones de ARN internas, ARN de Clontech o ARN de Invitrogen. Los ADNc maratón de ratón se prepararon usando el kit marathon-Ready™ (Clontech, Palo Alto, CA) y el CC se analizó con los cebadores de clatrina ZC21195 (SEC ID Nº 78) y ZC21196 (SEC ID Nº 79) y, después, se diluyeron en base a la intensidad de la banda de clatrina. Para garantizar la calidad de los paneles de muestras se realizaron tres ensayos de control de calidad (CC): (1) Para evaluar la calidad del ARN usado para las bibliotecas, los ADNc internos se analizaron según el tamaño medio del inserto mediante PCR con oligos vectores que eran específicos de las secuencias del cetor para una biblioteca de ADNc individual; (2) La estandarización de la concentración del ADNc en las muestras del panel se consiguió usando procedimientos de PCR estándar para amplificar la alfa tubulina de longitud completa o el ADNc de G3PDH usando un oligo vector en 5' ZC14,063 (SEC ID Nº 48) y un cebador oligo específico de la alfa tubulina en 3' ZC17,574 (SEC ID Nº 49) u oligo cebador específico de 3' G3PDH ZC17,600 (SEC ID Nº 50); y (3) una muestra se envió a secuenciación para comprobar posible contaminación con ADN ribosómico o mitocondrial. El panel se fijó en un formato de 96 pocillos que incluyó una muestra control para ADN genómico humano (Clontech, Palo Alto, CA). Cada pocillo contenía aproximadamente 0,2-100 pg/µl de ADNc. Las reacciones de PCR se fijaron usando los oligos ZC26,358 (SEC ID Nº 80) y ZC26,359 (SEC ID Nº 81), TaKaRa Ex Taq™ (TAKARA Shuzo Co LTD, Biomedicals Group, Japón) y pigmento Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). La amplificación se llevó a cabo del siguiente modo: 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 66,3 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, seguido de 1 ciclo a 72 °C durante 5 minutos. Aproximadamente 10 µl del producto de reacción de la PCR se sometieron a electroforesis estándar en gel de agarosa usando un gel de agarosa al 4 %. El tamaño correcto previsto del fragmento de ADN se observó en ganglios linfáticos, próstata, tiroides, HPV (epitelio prostático), HPV5 (epitelio prostático seleccionado), tumor de pulmón, reacciones tumorales uterinas, junto con la reacción del ADN genómico.

El fragmento de ADN para tejido prostático (2 muestras), HPV (epitelio prostático), HPV5 (epitelio prostático seleccionado) y genómico se escindió y purificó usando el kit Gel Extraction (Qiagen, Chatsworth, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se confirmaron mediante secuenciación para mostrar que, de hecho, eran zcytor17.

Tabla 13

Tejido/Línea celular	Nº de muestras	Tejido/Línea celular	Nº de muestras
Glándula suprarrenal	1	Médula ósea	3
Vejiga urinaria	1	Cerebro fetal	3
Médula ósea	1	Islotes	2
Cerebro	1	De próstata	3
Cuello uterino	1	RPMI #1788 (ATCC # CCL-156)	2
De colon	1	Testículos	4
Cerebro fetal	1	Tiroides	2
Corazón fetal	1	WI38 (ATCC # CCL-75)	2
Riñón fetal	1	ARIP (ATCC # CRL-1674 - rat)	1
Hígado fetal	1	HaCat – queratinocitos humanos	1
Pulmón fetal	1	HPV (ATCC # CRL-2221)	1
Músculo fetal	1	Glándula suprarrenal	1

Piel fetal	1	Próstata SM	2
Corazón	2	PBMC CD3+ seleccionados estimulados con ionomicina + PMA	1
K562 (ATCC # CCL-243)	1	HPVS (ATCC # CRL-2221) - seleccionado	1
Riñón	1	Corazón	1
Hígado	1	Hipófisis	1
Pulmón	1	Placenta	2
Ganglios linfáticos	1	Glándula salival	1
Melanoma;	1	HL60 (ATCC # CCL-240)	3
Páncreas	1	Plaquetas	1
Hipófisis	1	HBL-100	1
Placenta	1	Mesangial renal	1
Próstata	1	Linfocitos T	1
Recto	1	Neutrófilos	1
Glándula salival	1	MPC	1
Músculo esquelético	1	Hut-102 (ATCC # TIB-162)	1
Intestino delgado	1	Endotelial	1
Médula espinal	1	HepG2 (ATCC # HB-8065)	1
Bazo	1	Fibroblastos	1
Estómago	1	E. Histo	1
Testículos	2		
Timo	1		
Tiroides	1		
Tráquea	1		
Útero	1		
Tumor de esófago	1		
Tumor gástrico	1		
Tumor renal	1		
Tumor hepático	1		
Tumor pulmonar	1		
Tumor ovárico	1		
Tumor rectal	1		
Tumor de útero	1		

C. Análisis de la expresión de *zcytoR17* mediante PCR y Northern

- 5 Anotar los tipos celulares y las condiciones de crecimiento que afectan a la expresión del receptor es un medio útil de elucidar su función y predecir una fuente de ligando. Con este fin, mediante PCR se analizó una amplia variedad de tipos de tejido y de células. Se usó la polimerasa termoestable Advantage II™ (Clontech, La Jolla, CA) con los cebadores oligonucleotídicos ZC29,180 (SEC ID N° 22) y ZC29,179 (SEC ID N° 82) y 1-10 ng de los diversos moldes de ADNc indicados más adelante para 30 ciclos de amplificación de (94°C, 30 s.; 66°C, 20 s.; 68°C, 1 min. 30 s). Tras esto, el 20 % de cada reacción se pasó por geles de agarosa al 0,8 %, TAE/bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. Después, las muestras se puntuaron en base a la intensidad de la señal. Véase la Tabla 14 a continuación.

Tabla 14

Células y condiciones	Puntuación 0-5
Hel estimuladas con PMA	0
U937	3
MCF-7	0
HuH7	1
Folículos humanos	0
HT-29	0
HEPG2	0
HepG2 estimuladas con IL6	0
Endotelial dérmica humana	0
Endotelial venosa humana	0
CD4+ humanos	0
BEWO	0
CD 19+ humanos	1
PBMC humanas estimuladas con PHA, PMA, ionomicina, IL2, IL4, TNFα 24 horas	0
PBMC humanas estimuladas con LPS, PWM, IFNγ, TNFα, 24 horas	0
PBMC humanas a todas las condiciones anteriores durante 48 horas	4
HUVEC p.2	4
RPMI1788	0
TF1	0
Linfocitos T de bazo de mono estimulados con PMA, ionomicina	0
Epitelio prostático humano HPV transformado	5

Amígdalas humanas inflamadas	0
HACAT	0
Condrocitos humanos	1
Sinoviocitos humanos	1
THP1	5
REH	0

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

- 5 Estas dos líneas celulares, junto con una línea de epitelio de próstata, se seleccionaron para su análisis posterior mediante transferencia Northern. Los intentos previos de visualizar un transcrito mediante análisis Northern usando ARNm de varios tejidos dieron señales débiles y difusas en el intervalo sorprendentemente grande de 7-10 kb haciendo estos datos difíciles de interpretar. Se preparó un gel desnaturante de formaldehído/MOPS/agarosa al 0,8 % (RNA Methodologies, Farrell, RE Academic Press) y 2 µg de poliA +ARNm se pasaron para cada muestra
- 10 junto con una escalera de ARN (Life Technologies, Bethesda, MD). Después, el gel se transfirió a un nylon Hybond (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), se reticuló con UV y se hibridó en solución ExpressHyb (Clontech, LaJolla, CA) a 68 °C durante la noche usando una sonda para zcytoR17 humano generado mediante PCR con los oligos ZC28,575 (SEC ID N° 77) y ZC27,899 (SEC ID N° 9) y se marcaron con un kit Megaprime 32P (Amersham). La transferencia Northern se lavó después con 0,2xSSC+0,1 %SDS a 65 °C durante 15 minutos y se expuso a película
- 15 durante 7 días con pantallas de intensificación. Se observó una banda prominente de 8 kb en los carriles del epitelio de próstata y de U937, mientras que había una banda más leve en el carril de THP1.

Para optimizar el ADNc usado como sonda de hibridación, mediante PCR se amplificaron cuatro regiones diferentes de la secuencia del zcytoR17 humano de longitud completa, se marcaron y se hibridaron como se ha descrito

20 anteriormente para las transferencias Southern que contienen ADN de biblioteca de ADNc genómico y amplificado. Las cuatro sondas, en el presente documento designadas sondas A-D, se amplificaron usando los siguientes pares de cebadores: (A) ZC28,575 (SEC ID N°: 77), ZC27,899 (SEC ID N° 19); (B) ZC27,895 (SEC ID N° 20), ZC28,917 (SEC ID N° 83); (C) ZC28,916 (SEC ID N° 84), ZC28,918 (SEC ID N° 85); y (D) ZC28,916 (SEC ID N° 84), ZC29,122 (SEC ID N° 21). El ADN genómico humano junto con las bibliotecas de ADNc amplificado que se había demostrado

25 que contenían zcytoR17 mediante PCR se digirió con EcoR1 and Xho1 para liberar insertos y se pasó por geles duplicados de TAE/agarosa al 0,8 %, se desnaturizó con Noah 0,5M, NaCl 1,5M, se transfirió a Hybond, se reticuló con UV y cada uno se hibridó con una sonda distinta. Se encontró que la sonda B tenía la unión inespecífica menor y la señal más fuerte. Por tanto, la sonda B se usó para todas las hibridaciones posteriores.

30 Dado que las células THP1 son un modelo excelente de monocitos en circulación y expresaban zcytoR17 a niveles bajos, los inventores las trataron con diversos compuestos en un esfuerzo por incrementar la expresión de zcytoR17. Las células se cultivaron hasta una densidad de 2e5/ml, se lavaron y resuspendieron en varios medios estimulantes, se cultivaron durante cuatro o treinta horas y se recolectaron para las preparaciones de ARN. Cada medio se

35 suplementó con uno de los fármacos o res de citocinas siguientes. 2ug/ml de (Sigma Chemicals, St. Louis, MO), 2 ng/ml de hTNFα (R&D Systems, Minneapolis, MN), 2ng/ml de hGM-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN), 50 ng/ml de hIFNγ (R&D Systems, Minneapolis, MN), 1ng/ml de hMCSF (R&D Systems, Minneapolis, MN), 1 ng/ml de hIL6 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 2 ng/ml de hIL1β (R&D Systems, Minneapolis, MN), 50 ng/ml de hIFNγ + 0,5 ng/ml de hIL4 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 50 ng/ml de hIFNγ + 1ng/ml hIL10 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml de PMA (Calbiochem, San Diego, CA) y un control sin tratar. Al final del periodo de cultivo, el ARN

40 total se limpió mediante el kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA). Se seleccionó el ARN poli A+ del ARN total usando un kit MPG (CPG, Lincoln Park, NJ). Dos microgramos de ARN poliA+ de cada condición se pasaron en geles de formaldehído/MOPS/agarosa, se transfirieron a nylon y se reticularon con UV como se ha descrito anteriormente. Estas transferencias Northern se hibridaron, como se ha indicado anteriormente, con la sonda B a 68 °C durante la noche, se lavaron en condiciones de rigurosidad estricta con 0,2xSSC, SDS al 0,1 % a 65 °C, se

45 expusieron a la película durante la noche y se expusieron después a pantallas de fósforo para cuantificar la señal. En todos los carriles se observó un ARNm dominante de 8 kb, además de una banda relativamente más débil de 2,8 kb. En el ARN de las células tratadas con hIFNγ durante 30 horas se observó un incremento por 20 del ARNm de zcytoR17, este efecto mutó ligeramente con el tratamiento simultáneo con IL4. En el ARN de las células tratadas con LPS, TNFα and GM-CSF se observaron incrementos minoritarios por 3 del ARNm, mientras que MCSF, IL6 e IL1β

50 no tuvieron ningún efecto sobre los niveles del ARNm de zcytoR17. En conjunto, estos datos sugieren la existencia de un papel del receptor de zcytoR17 y su ligando en la biología de los monocitos-macrófagos y, por extensión, en cualquier cifra de procesos de enfermedad en los que participan estas células.

### Ejemplo 32

55

*Distribución tisular de zcytoR17 humano en paneles tisulares usando transferencia Northern y PCR*

Usando PCR con cebadores específicos de genes se obtuvo un fragmento de ADNc de zcytoR17lig humano: cebador sentido ZC41438 (SEC ID N° 93) y cebador antisentido ZC41437 (SEC ID N° 94) y el ADNc molde del zcytoR17lig



humano (SEC ID N° 90). Este fragmento se purificó usando procedimientos estándar y aproximadamente 25 ng marcados con <sup>32</sup>P alfa dCTP usando el kit de marcaje con cebador aleatorio Prime-It RmT (Stratagene) y se hibridó en Ultrahyb, (Ambion) se usó para exponer a película Biomaax/pantallas de intensificación según las recomendaciones del fabricante en cada caso. Nuevas transferencias no usadas previamente, incluidas Clontech Human 12 lane MTN, the human brain MTN II, and the human brain MTN blot IV, the human immune system MTN II, y human MTE array II, de Clontech, se hibridaron durante la noche a 42 °C según el procedimiento ultrahyb de Ambion. Los recuentos radioactivos no específicos se eliminaron mediante lavado usando .1SSC SDS al 5 % a 55°C. Las transferencias positivas incluyeron human 12 lane MTN (Clontech). De los 12 tejidos analizados, solo la placenta era positiva para un transcrito de aproximadamente 1,2 kb,

### Ejemplo 33

*Construcción de vectores de expresión en mamíferos que expresan zcytor17lig-CEE humano*

#### A. Construcción de zCyt17Lig-CEE/pZMP21

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

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

Las reacciones de PCR se realizaron del siguiente modo: A un volumen final de 100 µl final se añadió: 10 µl de tampón de reacción de la Taq polimerasa 10x con MgCl 15mM (Gibco), 1 µl de Taq AND polimerasa (5 unidades/µl, Gibco), 3 µl de dNTP 10mM, 78 µl de dH<sub>2</sub>O, 3 µl de una reserva 20 pmol/µl del cebador ZC41607 (SEC ID N° 97) 3 µl de una reserva 20 pmol/µl del cebador ZC41605 (SEC ID N° 98) y 2 µl y de una reserva de 0,13 µg/µl de ADN molde de zCyt17lig. A la mezcla se añadió un volumen igual hasta 50 µl de aceite mineral. La reacción se calentó hasta 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 1 minuto; 55 °C durante 2 minutos; 72 °C durante 3 minutos; seguido de una ampliación de 10 minutos a 72 °C y mantenida a 4 °C hasta la recolección de la reacción.

El plásmido pZMP21 se sometió a digestión con la enzima de restricción BglIII, se limpió con un kit de purificación QiaQuick PCR (Qiagen) usando un protocolo de microcentrifuga, y se usó para recombinación con el fragmento de PCR. El plásmido pZMP21 se construyó a partir de pZMP20, que se construyó a partir de pZP9 (depositado en la Colección Americana de cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y con designación N° 98668), tomando los elementos genéticos de levadura de pRS316 (depositado en la Colección Americana de cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y con designación N° 77145), un elemento IRES de poliovirus y el dominio extracelular de CD8, truncado en el extremo carboxiterminal del dominio transmembrana. PZMP21 es un vector de expresión en mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de MPSV, el intrón del péptido señal de inmunoglobulina, múltiples sitios de restricción para insertar secuencias de codificación, un codón de terminación y un terminador de la hormona de crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor de SV40, un potenciador y un origen de replicación, un gen de DHFR, el terminador de SV40, así como las secuencias URA3 y CEN-ARS requeridas para la selección y replicación en *S. cerevisiae*.

Cincuenta microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) se combinaron de forma independiente con 100 ng de plásmido cortado, 5 µl de la mezcla de PCR descrita anteriormente y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/ADN se sometió a electropulsación a 0,75 Kv (5 Kv/CM), ∞ ohmios, 25 µF. Cada cubeta tenía 600 µl de sorbitol 1,2M añadido y la levadura se sembró en un alícuota de 100 µl y un alícuota de 300 µl sobre dos placas de URA-D y se incubaron a 30 °C. Después de aproximadamente 72 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una única placa se resuspendieron en 1 ml de H<sub>2</sub>O y se agitaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 500 µl de tampón de lisis ( Triton X-100 al 2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, tris 10 mM, a pH, EDTA 1 mM). Los 500 µl de la mezcla de lisis se añadieron a un tubo Eppendorf que contiene 300 µl de perlas de vidrio de 600 µm lavadas con ácido y 300 µl de fenol-cloroformo, se agitaron durante intervalos de 1 minuto dos o tres veces, seguido de una centrifugación de 5 minutos en una centrifuga de Eppendorf a velocidad máxima. Trecientos microlitros de la fase acuosa se transfirieron a un tubo fresco y el ADN se precipitó con 600 µl de etanol (EtOH) al 100 %, seguido de centrifugación durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento de ADN se lavó después con 500 µl de EtOH al 70 %, seguido de

centrifugación durante 1 minuto a 4°C. El sedimento de ADN se resuspendió en 30 µl de H<sub>2</sub>O.

La transformación de las células electrocompetentes de *E. coli* (MC1061) se realizó con 5 µl de la preparación de ADN de levadura y 50 µl de células MC1061. Las células se sometieron a electropulsación a 2,0 kV, 25 µF y 400 ohmios (Ω). Tras la electroporación, se añadieron 600 µl de SOC (Bacto' Triptona al 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM). Las células de *E.coli* sometidas a electroporación se sembraron en un alícuota de 200 µl y de 50 µl en dos placas de LB AMP (caldo LB (Lennox), Bacto Agar al 1,8 % (Difco), 100 mg/l de ampicilina). Las placas se incubaron boca abajo durante aproximadamente 24 horas a 37 °C. Las colonias resistentes a ampicilina se seleccionaron de forma aleatoria y se sometieron a análisis de la secuencia del inserto. El ADN del plásmido a gran escala se aisló a partir de un clon de secuencia confirmada usando el kit Qiagen Maxi (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

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

Un plásmido de expresión que contiene todo el polinucleótido de codificación de zCyt17Lig-CEE murino (SEC ID N° 104 y SEC ID N° 105) también se construyó mediante recombinación homóloga usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 33A anterior. Los cebadores usados fueron: (1) ZC41643 (SEC ID N° 106) (directo, 5' a 3' sentido) que tiene un solapamiento de 28 pb del vector en 5' del punto de inserción; 21 pb del extremo 5' de zcytor17lig(m) y (2) ZC41641 (SEC ID N° 107) (inverso, 5' a 3' antisentido) que tiene un solapamiento de 37 pb con el vector en 2' del punto de inserción; codón de terminación de 3 pb; un marcador EE en el extremo C de 21 pb; 24 pb correspondientes al extremo 3' de zCyt17Lig(m)-CEE. El plásmido se denominó zcytor17lig(m)-CEE/pZMP21. La secuencia polinucleotídica de zcytor17lig(m)-CEE se muestra en la SEC ID N° 104 y la correspondiente secuencia polipeptídica se muestra en la SEC ID N° 105.

#### **Ejemplo 34**

##### *Transfección y expresión de polipéptidos de zcytor17lig-CEE*

##### *A. Expresión de zCyt17Lig-CEE/pZMP21 humano en células 293T*

ZCyt17Lig-CEE se expresó de forma transitoria en células 293T (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA; N° ATCC SD-3515) para generar la proteína inicial purificada. El día antes de la transfección, las células 293T se sembraron a  $6,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en matraces de cultivo con un volumen total de 30 ml de medio de cultivo (SL7V4 +FBS al 5 % + Pen/estrept. al 1 %) por matraz. Se dejó incubar las células durante 24 horas a 37 °C.

Una mezcla de ADN/liposoma se preparó del siguiente modo: Dos tubos cónicos de 50 ml se cargaron con 25 ml de medio de transfección (SL7V4 + Pen/estrept. al 1 %) y a cada uno se añadieron 1,13 mg de zCyt17Lig-CEE/pZMP21 (Ejemplo 33). Un conjunto separado de dos tubos cónicos de 50 ml se cargaron con 22 ml de medio de transfección (anterior) y a cada uno se añadieron 3 ml de liposomas (Lipofectamine, Gibco). Para cada conjunto de tubos, un tubo de ADN se añadió a un tubo de liposomas y la mezcla de ADN/liposoma se incubó durante 30 minutos. Los dos tubos cónicos de 50 ml que contienen las mezclas de ADN/liposoma se combinaron (aproximadamente 100 ml) y se añadieron 300 ml del medio de transfección. Los 30 matraces de las células 293T se decantaron, se lavaron 1 con aproximadamente 15 ml de PBS y a cada matraz se añadieron 12,5 ml de la mezcla de ADN/liposoma diluida. Los matraces se incubaron durante 3 horas a 37 °C. Tras el periodo de incubación, a cada matraz T162 se añadieron 25 ml del medio de cultivo (anterior). El medio de transfección se recolectó tras aproximadamente 96 horas y se usó para purificación de proteínas (Ejemplo 35).

##### *B. Expresión de zCyt17Lig-CEE(m)/pZMP21 de ratón en células 293T*

El zCyt17Lig(m)-CEE de ratón se expresó de forma transitoria en células 293T como se describe en el Ejemplo 34<sup>a</sup> y el medio cultivado se usó para purificación de proteínas (Ejemplo 35).

#### **Ejemplo 35**

##### *Purificación de Zcytor17lig-CEE de células 293T*

A menos que se indique lo contrario, todas las operaciones se llevaron a cabo a 4 °C. Se usó el siguiente procedimiento para purificar Zcytor17lig tanto de ratón como humano que contiene marcadores Glu-Glu (EE) en el extremo C (SEC ID N° 103). El medio acondicionado de las células 293T que expresan Zcytor17lig-CEE (Ejemplo 34) se purificó. Las concentraciones de la proteína diana total del medio acondicionado se determinaron mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia Western con el anticuerpo anti-EE.

Una columna de 5,5 ml de Poros 50 A anti-EE (PE BioSystems, Framingham, MA) (preparada como se describe más adelante) se vertió en una columna de vidrio Waters AP-1, de 1 cm x 7 cm (Waters, Milford, MA). La columna se empaquetó en flujo y se equilibró en un BioCad Sprint (PE BioSystems, Framingham, MA) con solución salina

tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4. El medio acondicionado se ajustó con NaCl a 0,3M y el pH se ajustó a 7,2. Después, el medio acondicionado se cargó en la columna durante la noche con un caudal de aproximadamente 3 ml/minuto. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna (VC) de PBS a pH 7,4 y, de nuevo, se lavó con 3 VC 5 veces con PBS Sigma a pH 7,4. Se eluyó de forma escalonada con acetato 0,5M, NaCl 0,5M, pH 2,5 a un caudal de 3 ml/minuto. Los tubos de fracción contenían 1 ml de la base Tris (sin ajuste de pH) para neutralizar la elución inmediatamente. La columna se lavó de nuevo con 2 VC de PBS 5X Sigma, a pH 7,4, para neutralizar la columna y después se equilibró en PBS (a pH 7,4). Se recolectaron fracciones de 2 ml durante la cromatografía de elución y se monitorizó la absorbancia a 280 y 215 nm, también se guardaron y analizaron las fracciones que atravesaron la columna y las de lavado. Las fracciones de 5X PBS y de los picos de elución ácida se analizaron para determinar la proteína diana mediante SDS-PAGE, tinción de plata y transferencia Western con el anticuerpo primario anti-EE y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP. Las fracciones de elución ácida de interés se combinaron y concentraron desde 38 ml a 0,8 ml usando un concentrador de espín de membrana con un peso molecular de corte de 5000 dalton (Millipore, Bedford, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para separar Zcytor17lig-CEE del material agregado y de cualquier otra proteína copurificante contaminante, las fracciones combinadas concentradas se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño en una columna 1,6 x 60 cm (120 ml) Superdex 75 (Pharmacia, Piscataway, NJ) equilibrada y cargada en PBS a un caudal de 1,0 ml/min usando un BioCad Sprint. Se recogieron fracciones de tres ml a través de la totalidad de la cromatografía y se analizó la absorbancia a 280 y 215 nm. Las fracciones pico se caracterizaron mediante SDS-PAGE, tinción de plata y solo se combinaron las fracciones más puras. Este material representó la proteína Zcytor17lig-CEE purificada.

En los genes de SDS-PAGE, de la transferencia Western, teñidos con plata y azul de Coomassie, el the Zcytor17lig-CEE era una banda predominante. La concentración proteica del material purificado se realizó mediante análisis BCA (Pierce, Rockford, IL) y la proteína se alícuotó y almacenó a -80 °C de acuerdo con procedimientos estándar.

Para preparar PorosA50 anti-EE, un volumen de lecho de 65 ml de Poros A50 (PE Biosystems) se lavó con 100 ml de agua y, después, trietanolamina 0,1M, pH 8,2 (TEA, ICN, Aurora, Ohio), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, pH 8,8 que contiene azida sódica al 0,02 % usando una unidad de filtro en matraz de vacío. La solución del anticuerpo monoclonal EE, a una concentración de 2 mg/ml en un volumen de 300 ml, se mezcló con la resina lavada en un volumen de 250 ml. Tras una incubación durante la noche a temperatura ambiente, el anticuerpo no unido se eliminó lavando la resina con 5 volúmenes de TEA 200 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, pH 8,8 que contiene azida sódica al 0,02 % como se ha descrito anteriormente. La resina se resuspendió en 2 volúmenes de TEA, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, pH 8,8 que contiene azida sódica al 0,02 % y se transfirió a un contenedor adecuado. Se añadieron tres mol de suberato de disuccinimidilo 25 mg/ml (68 mM (en DMSO suministrado por Pierce, Rockford, IL) y la solución se incubó durante tres horas a temperatura ambiente. Después, los sitios no específicos en la resina se bloquearon incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente con 5 volúmenes de etanolamina 20 mM (Sigma, St. Louis, MO) en TEA 200 mM, pH 8,8 usando la unidad de filtro de vacío. La resina se lavó con PBS, a pH 7,4, seguido de glicina 0,1M, a pH 3, y después se neutralizó con 10X PBS. Después de lavar con agua destilada, la resina Poros-A 50 anti-EE acoplada final se almacenó a 4 °C en etanol al 20 %.

### Ejemplo 36

#### *Secuenciación en N-terminal de Zcytor17lig humano y de ratón*

##### *A. Secuenciación en N-terminal de Zcytor17lig humano*

Se realizó la secuenciación estándar automatizada del polipéptido en N-terminal (degradación de Edman) usando reactivos de Applied Biosystems. El análisis de la secuencia en N-terminal se realizó en un sistema secuenciador Model 494 Protein Sequencer System (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). El análisis de datos se realizó con el sistema de análisis de datos de modelo 610A para secuenciación de proteínas, versión 2.1a (Applied Biosystems).

Se suministró una muestra de zcytor17lig-CEE humana purificada (Ejemplo 35). La muestra se cargó sobre un filtro de fibra de vidrio preparado para la secuenciación n-terminal. El filtro de fibra de vidrio se preparó mediante ciclado previo con Biobrené™.

El análisis de la secuencia N-terminal del polipéptido zcytor17lig humano secretado no verificó el sitio de escisión predicho de la secuencia señal, pero dio lugar a un inicio maduro en el residuo 27 (Leu) en la SEC ID N° 2 de la secuencia precursora de zcytor17lig humana.

##### *B. Secuenciación de N-terminal de Zcytor17lig humano*

Se realizó la secuenciación estándar automatizada del polipéptido en N-terminal (degradación de Edman) usando reactivos de Applied Biosystems. El análisis de la secuencia en N-terminal se realizó en un sistema secuenciador Model 494 Protein Sequencer System (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). El análisis de datos se realizó con el sistema de análisis de datos de modelo 610A para secuenciación de proteínas, versión 2.1a (Applied Biosystems).

- 5 UA muestra de zcytor17lig-CEE de ratón purificado se suministró capturada en perlas de proteína G sefarosa/anti-EE (Ejemplo 35). Las perlas se introdujeron en tampón de muestra SDS-PAGE reductor y en un baño de agua en ebullición antes de pasarlas por SDS-PAGE, usando un sistema SDS-PAGE Novex (Bis-Tris al 4-12 % MES NuPAGE; Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El gel se sometió a electrotransferencia a una membrana de PVDF Novex (Invitrogen), y se tiñó con azul de coomassie (Sigma, St., Louis, MO) usando procedimientos estándar. Se realizaron las correspondientes transferencias Western anti-EE para identificar la banda de zcytor17lig para la secuenciación de proteínas N-terminal. El anticuerpo IgG anti-EE de ratón conjugado con HRP usado se produjo internamente.
- 10 El análisis de la secuencia N-terminal del polipéptido zcytor17lig de ratón secretado verificó el sitio de escisión predicho de la secuencia señal, lo que dio lugar a un inicio maduro en el residuo 31 (Ala) en la SEC ID N° 11 y la SEC ID N° 91 de la secuencia precursora de zcytor17lig de ratón.

**Ejemplo 37**

15 *Ensayo de unión en células Cos*

Se usó un ensayo de unión para analizar la unión del zcytor17lig a los receptores que comprenden el receptor zcytor17, de modo que el receptor zcytor17 o heterodímeros y trímeros del receptor que comprenden el receptor zcytor17 (p. ej., zcytor17/OSMR, zcytor17/WSX-1, o zcytor17/OSMR/WSX-1, u otra subunidad del receptor de citocina de clase). El ADN plasmídico con el receptor de Zcytor17 se transfeccionó a células COS y las células COS transfeccionadas se usaron para evaluar la unión de zcytor17lig a los receptores que comprenden el receptor zcytor17 como se describe más adelante.

25 *A. Transfecciones en células COS*

La transfección en células COS se realizó del siguiente modo: Mezclar 800 ng del ADN plasmídico del receptor en las combinaciones siguientes: pZp7pX/zcytor17 solo; pZp7Z/WSX-1 solo; pZp7NX/OSMR solo; pZp7pX/zcytor17 + pZp7NX/OSMR; pZp7pX/zcytor17 + pZp7Z/WSX-1; pZp7NX/OSMR + pZp7Z/WSX-1; pZp7pX/zcytor17 + pZp7NX/OSMR + pZp7Z/WSX1) y 4ul de Lipofectamine™ en 80 µl de medio DMEM sin suero (55 mg de piruvato sódico, 14 6mg L-glutamina, 5mg de transferrina, 2,5 mg de insulina, 1µg de selenio y 5 mg de fetuína en 500 ml de DMEM), incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se añadieron 320 µl de medio DMEM sin suero. Añadir esta mezcla de 400ul a 2 x10<sup>5</sup> de células COS/pocillo sobre placas de cultivo tisular de 12 pocillos (revestidos con fibronectina) se incubaron durante 5 horas a 37 °C. Añadir 500 ul de medio DMEM DBS al 20 % (100 ml de FBS, 55 mg de piruvato sódico y 146 mg de L-glutamina en 500 ml de DMEM e incubar durante la noche.

*B. Ensayo de unión*

40 El ensayo de unión se realizó del siguiente modo: El medio se eliminó de las células mediante lavado con PBS + BSA al 0,1 % y, después, las células se bloquearon durante 60 minutos con la misma solución. Después, las células se incubaron durante 1 hora en PBS + BSA al 0,1 % con 1,0 µg/ml de proteína purificada zcytor17ligCEE. Después, las células se lavaron con PBS + BSA al 0,1 % y se incubaron durante otra hora con anticuerpo anti-GluGlu de ratón diluido a 1:1000. De nuevo, las células se lavaron con PBS + BSA al 0,1 %, después se incubaron durante 1 hora con anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con HRP diluido a 1:200.

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

50 La unión positiva se detectó para las células transfeccionadas solo con zcytor17, zcytor17+OSMRbeta, zcytor17+WSX1, and zcytor17+OSMRbeta+WSX-1. No se detectó unión alguna para células transfeccionadas WSX-1 + OSMRbeta, solo con OSMRbeta o solo con WSX-1.

**Ejemplo 38**

*zcytor17lig de ratón activa el receptor de zcytor17/OSMRbeta de ratón en el ensayo de luciferasa*

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

Una biblioteca de ADNc de testículos de ratón se sometió a detección selectiva para detectar un clon de longitud completa de zcytoR17 de ratón. La biblioteca se sembró a 65.500 ufc/placa en 24 placas de LB + Amp. Se prepararon filtros usando Hybond N (Amersham-Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) sobre un total de aproximadamente 1,6 millones de colonias. Los filtros se marcaron con una aguja caliente para orientación y después se desnaturalizaron durante 6 minutos en NaOH 0,5M y Tris-HCl 1,5 M, a pH 7,2. Después, los filtros se

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

5 Al día siguiente, los filtros se lavaron previamente a 65 °C en tampón de pre-lavado, que consiste en 0,25X SSC, 0,25 % SDS y EDTA 1mM. Los residuos celulares se eliminaron manualmente usando Kimwipes® (Kimberly-Clark) y la solución se cambió 3 veces en un periodo de 1 hora. Los filtros se secaron al aire y se almacenaron a temperatura ambiente hasta que fueron necesarios. Después, los filtros se prehibridaron durante aproximadamente 3 horas a 63 °C en 20 ml de la solución de hibridación ExpressHyb™ (Clontech, Palo Alto, CA).

10 La sonda B (Ejemplo 31) se generó mediante PCR a partir del molde de *zcytoR17* humano usando cebadores oligonucleotídicos ZC27,895 (SEC ID N° 20) y ZC28,917 (SEC ID N° 83) y se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P usando un kit comercialmente disponible (Megaprime DNA Labeling System; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna de empuje Stratagene™ (columna NucTrap®; Stratagene, La Jolla, CA) La sonda se desnaturalizó a 100 °C durante 15 minutos y se añadió a ExpressHyb.™ Los filtros se hibridaron en 15 ml de solución de hibridación que contiene 1,6 x 10<sup>6</sup> cpm/ml de sonda a 63 °C durante la noche. Los filtros se lavaron a 55 °C en 2X SSC, SDS al 0,1 % y EDTA 1 mM y se expusieron a una película de rayos X a -80 °C durante 4 días y medio. Se escogieron trece positivos de las placas y se introdujeron en 1 ml de LB + amp. en tubos de 1,7 ml. Los tubos se introdujeron a 4 °C durante la noche. Estos 13  
20 positivos se sometieron a dos rondas más de purificación. Las placas terciarias se superaron a 37 °C después de subir a los filtros y se escogieron colonias sencillas y se enviaron a secuenciación. Se determinó que tres de estos contenían la secuencia del ortólogo de ratón de *zcytoR17*.

25 Además, se generó un producto de PCR usando ADNc de CTLL-2 como molde y los oligonucleótidos ZC38,239 (SEC ID N° 123) y ZC38,245 (SEC ID N° 124) como cebadores. CTLL-2 es una línea celular de linfocitos T citotóxicos de ratón (N° de ATCC TIB-214). Esta reacción de PCR se realizó del siguiente modo: 1 ciclo a 95 °C durante 1 minuto, 30 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 68 °C durante 3 minutos, después 68 °C durante 10 minutos, empapamiento a 4 °C. La reacción de PCR usó aproximadamente 0,5 ng de ADNc, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 µl de la mezcla de polimerasa Advantage II (ClonTech). Aproximadamente el 6 % del producto de PCR se usó como molde en una nueva reacción de PCR, como anteriormente, a excepción de los oligonucleótidos ZC38,239 (SEC ID N° 123) y ZC38,238 (SEC ID N° 125). Esta reacción de PCR se realizó del siguiente modo: 30  
30 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 65 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 1 minuto, después 72 °C durante 7 minutos, empapamiento a 10 °C. La mayoría de la reacción de PCR se cargó en un gel de agarosa al 1,0 % y se escindió la banda predominante a aproximadamente 360 pb, se eluyó el fragmento de ADN y se realizó la  
35 secuenciación de ADN.

La secuencia del polinucleótido *zcytor17* de ratón se muestra en las SEC ID N° 126 y la correspondiente secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 127. Además, en la SEC ID N° 128 se muestra una forma soluble truncada del polinucleótido *zcytor17* de ratón y la correspondiente secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID  
40 N° 129.

Para obtener un ADNc de longitud completa de OSMRbeta de ratón, se aislaron los productos de PCR 5' y 3' y se unieron usando un sitio BamHI interno. Se diseñaron los cebadores para PCR usando la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 134 e incluyen sitios de restricción para EcoRI y XbaI a efectos de clonación. La secuencia de ácido  
45 nucleico de OSMRbeta de ratón se muestra en la SEC ID N° 134, en la que la secuencia de codificación abarca los residuos 780 a 3692 que codifican el polipéptido OSMRbeta de ratón de 970 aminoácidos, que se muestra en la SEC ID N° 135. En la SEC ID N° 136 se muestra una secuencia degenerada de ácido nucleico que codifica en polipéptido de la SEC ID N° 135.

50 Se generó un producto de PCR en 5' usando ADNc de 3T3-L1 (adipocito de ratón diferenciado) como molde y los oligonucleótidos ZC41,764 (SEC ID N° 130) y ZC41,598 (SEC ID N° 131) como cebadores. Esta reacción de PCR en 5' se realizó del siguiente modo: 30 ciclos a 95 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 1 minuto 30 segundos, después 72 °C durante 7 minutos, empapamiento a 4 °C. La reacción de PCR usó aproximadamente 3 µg de plásmido preparado a partir de la biblioteca de ADNc, 20 pmoles de cada oligonucleótido  
55 y cinco unidades de ADN polimerasa *Pwo* (Roche). Aproximadamente el 90 % del producto de la PCR en 5' se digirió con EcoRI y BamHI y se purificó en gel en un gel de agarosa al 1,0 %. La banda de aproximadamente 1446 pb se escindió y se usó para la unión (véase más adelante).

60 Se generó un producto de PCR en 3' usando ADNc interno de placenta de ratón como molde y los oligonucleótidos ZC41,948 (SEC ID N° 132) y ZC41,766 (SEC ID N° 133) como cebadores. Esta reacción de PCR en 3' se realizó del siguiente modo: 30 ciclos a 95 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 1 minuto 30 segundos, después 72 °C durante 7 minutos, empapamiento a 4 °C. La reacción de PCR usó aproximadamente 3 µg de plásmido preparado a partir de la biblioteca de ADNc, 20 pmoles de cada oligonucleótido y cinco unidades de ADN polimerasa *Pwo* (Roche). Aproximadamente el 90 % del producto de la PCR en 3' se digirió con BamHI y XbaI,  
65 y se purificó en gel en un gel de agarosa al 1,0 %. La banda de aproximadamente 2200 pb se escindió y se usó para la unión junto con el producto de PCR en 5' (descrito anteriormente) en el vector de expresión pZP-5Z digerido

con EcoRI and XbaI. La unión por tres partes se realizó con el fragmento 5' EcoRI a BamHI anterior, el fragmento 3' BamHI a XbaI y el vector de expresión pZP-5Z digerido con EcoRI y XbaI. Esto generó un plásmido pZP-5Z que contenía un ADNc de longitud completa para OSMRbeta de ratón (nucleótidos 780 a 3692 de la SEC ID N° 134), designado pZP-5Z/OSMRbeta. El ADNc de longitud completa de OSMRbeta de ratón en pZP5Z/OSMRbeta tiene dos inserciones de aminoácidos de la SEC ID N° 135. Existe una duplicación del aminoácido Glicina en la posición 370 y una duplicación del aminoácido ácido glutámico en la posición 526. El plásmido pZP-5Z es un vector de expresión en mamíferos que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de CMV, múltiples sitios de restricción de secuencias de codificación y un terminador de la hormona de crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor de SV40, un potenciador y un origen de replicación, un gen de resistencia a zeocina y el terminador de SV40.

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

15 **B. Construcción de las líneas celulares BaF3/KZ134/zcytor17m, BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbeta, BHK/KZ134/zcytor17m y BHKIKZ134/zcytor17mOSMRbeta**

Las líneas celulares BaF3/KZ134 and BHK/KZ134 estables (Ejemplo 20) se transfeccionaron con un plásmido de expresión que codifica zcytor17 de ratón de longitud completa, pZP-7P/zcytor17m (Ejemplo 38A), para crear células BaF3/KZ134/zcytor17m and BHK/KZ134/zcytor17m, respectivamente. El plásmido de expresión OSMRbeta de ratón, pZP-5Z/OSMRbeta (Ejemplo 38A) se transfeccionó después a estas células para crear las líneas celulares BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbeta y BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbeta, respectivamente. Los procedimientos fueron los descritos en el Ejemplo 4, con la excepción de que BaF3/KZ134/zcytor17m y BHK/KZ134/zcytor17m se seleccionaron, además de con genecitina, con 2 ug/ml de puomicina, mientras que BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbeta y BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbeta se seleccionaron, además de con genecitina, con 2ug/ml de puomicina y 200 ug/ml de zeocina.

Los clones se diluyeron, sembraron y seleccionaron usando técnicas estándar. Los clones se sometieron a detección selectiva mediante ensayo de luciferasa (véase el Ejemplo 20 anterior) usando el medio acondicionado de zcytor17lig de ratón y la proteína purificada de zcytor17lig de ratón (Ejemplo 35) como inductor. Se seleccionaron los clones con la respuesta luciferasa más alta (mediante STAT luciferasa) y el menor nivel inicial. Se seleccionaron las líneas celulares transfectantes estables.

35 **C. Zcytor17lig de ratón activa el receptor de zcytor17 de ratón en el ensayo de luciferasa con BaF31KZ134/zcytor17m/OSMRbeta o BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbeta**

Las líneas celulares se sembraron para los ensayos de luciferasa como se ha descrito en el ejemplo 20 anterior. La activación STAT de las células BaF31KZ134/Zcytor17m, BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbeta, BHK/KZ134/zcytor17m, o BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRbeta se evaluó usando (1) medio acondicionado de células BHK570 transfeccionadas con el zcytor17lig humano (Ejemplo 7), (2) el medio acondicionado de las células BHK570 transfeccionadas con el zcytor17lig de ratón (Ejemplo 18), (3) zcytor17lig purificado de ratón y humano (Ejemplo 35) y (4) medio sin mL-3 para medir la respuesta al control de únicamente el medio. Los ensayos de luciferasa se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 20.

Los resultados de este ensayo confirman que la respuesta del indicador STAT de las células BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRbeta y BHKIKZ134/zcytor17m/OSMRbeta al zcytor17lig de ratón cuando se compararon con las células BaF3/KZ134/zcytor17m, las células BHK/KZ134/zcytor17m i las células control sin transfeccionar BaF3/KZ134 o BHK/KZ134, y muestran que la respuesta está mediada por los receptores de zcytor17/OSMRbeta de ratón. Los resultados también muestran que el zcytor17lig humano no activa el ensayo indicador STAT mediante el complejo receptor de ratón.

50 **Ejemplo 39**

*Unión del ligando de zcytor17 humano a zcytor17 y zcytor17/OSMRbeta mediante citometría de flujo*

55 La biotilización de zcytor17L humano se realizó del siguiente modo: 100 µl de zcytor17 a 5,26 mg/ml se combinaron con 30 µl de EZ-link Sulfo-NHS-LC-biotina 10mg/ml (Pierce, Rockford, IL) disueltos en ddH<sub>2</sub>O. Esta solución se incubó en un agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la biotilización, la solución se dializó en PBS usando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer.

60 Para analizar las propiedades de unión del ligando de zcytor17 humano a diferentes combinaciones de receptores, tanto las células BHK como BAF3 se transfeccionaron con los plásmidos de expresión usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Estos plásmidos se transfeccionaron en ambas líneas celulares en las combinaciones siguientes: zcytor17 solo, OSMRbeta solo y zcytor17 y OSMRbeta. La transfección se realizó como se ha detallado anteriormente. Las células BHK y BAF3 sin transfeccionar se usaron como controles. Las células se tiñeron mediante FACS del siguiente modo: Las células 2E5 se tiñeron con: 2,0 µg/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1,0 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, 1,0 pg/ml de zcytor17L biotilizado o se dejaron sin teñir durante 30 minutos en hielo en tampón

FACS (PBS + BSA al 2 % + NHS al 2 % (Gemini) + NGS al 2 %). Las células se lavaron 1,5 veces y después se tiñeron con SA-PE (Jackson Immuno Laboratories) a 1:250 durante 30 minutos en hielo. Después, las células se lavaron 1,5 veces con tampón FACS y se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron mediante FACS en un BD FACSCaliber usando el software CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

5 Tanto las células BHK como BAF3 mostraron que el ligando de zcytor17 unido a zcytor17 solo y en combinación con OSMRbeta, siendo la unión al heterodímero zcytor17/OSMRbeta ligeramente más fuerte. No se observó unión en ninguna línea celular que expresara OSMRbeta solo. El ligando de zcytor17 se unió de un modo dependiente de la concentración. Los valores de la intensidad de fluorescencia media (IFM) para la unión en BHK se muestran a  
10 continuación en la Tabla 15.

Tabla 15

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

#### Ejemplo 40

15 *Análisis en matriz de la expresión génica de células tratadas con Zcytor17lig humano*

El ARN se aisló de células A549 tratadas con zcytor17lig humano, células SK-LU-1 tratadas con zcytor17lig y células control sin tratar, usando el kit RNeasy Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del  
20 fabricante.

El perfil de la expresión génica de las células tratadas con zcytor17lig y las respectivas células control se llevó a cabo usando matrices de expresión de ADNc de la serie GEArray Q (SuperArray Inc., Bethesda, MD). Las matrices de expresión de ADNc de la serie Q contienen hasta 96 fragmentos de ADNc asociados con una ruta biológica específica, o genes con funciones similares o características estructurales similares. La comparación de matrices de  
25 células tratadas y control permite la determinación de la regulación por aumento y por disminución de genes específicos. El marcaje con sondas, la hibridación y la detección se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La detección de la señal quimioluminiscente y la adquisición de datos se llevó a cabo en una estación de trabajo Lumi-Imager (Roche, Indianapolis, IN). Los datos de imágenes resultantes se analizaron usando software  
30 ImageQuant 5.2 (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ) y GEArray Analyzer 1,2 (SuperArray Inc., Bethesda, MD).

El análisis de los resultados de las matrices HS-014N de serie Q con interleucina humana y el receptor mostraron, tras la normalización, un incremento de aproximadamente 4,7 veces de la señal de IL13RA2 en las células SK-LU-1  
35 humanas tratadas con zcytor17lig y un incremento de aproximadamente 2,2 veces de la señal de IL13RA2 en las células A5491 humanas tratadas con zcytor17lig.

Estos resultados indican que zcytor17lig regula por aumento significativamente el IL13RA2 en las células SK-LU-1 y A549. Ambas son líneas celulares establecidas derivadas de carcinomas pulmonares humanos (Blobel y col.,  
40 Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol., 1984;45(4):407-29). Más específicamente, A549 se caracteriza como una línea celular del epitelio pulmonar humano (Lin, y col., J Pharm Pharmacol., 2002 Sep;54(9):1271-8; Martinez y col., Toxicol Sci., 2002 Oct;69(2):409-23).

Se ha demostrado que la interleucina 13 (IL13), una citocina secretada por los linfocitos T activados, es tanto  
45 necesaria como suficiente para la expresión del asma alérgico y para uso en modelos experimentales de asma, que incluyen hiperrespuesta de las vías respiratorias, reclutamiento de eosinófilos e hiperproducción de moco (Wills-Karp y col., Science, 1998;282:2258-2261). Se ha demostrado que la neutralización selectiva de IL13 mejorará el fenotipo del asma (Grunig y col., Science, 1998; 282:2261-2263). También se ha comunicado que la IL13 está implicada en la regulación por aumento de la expresión del gen de la mucina MUC8 en epitelio de pólipo nasal humano y epitelio  
50 nasal cultivado (Kimm y col., Acta Otolaryngol., 2002; Sep;122(6):638-643; Seong y col., Acta Otolaryngol., 2002; Jun;122(4):401-407). La MUC8, una glicoproteína mucina mayoritaria en las vías respiratorias, está implicada en la patogenia de la hipersecreción de moco en la sinusitis crónica con pólipos (Seong y col., Acta Otolaryngol., 2002;

Jun;122(4):401-407).

Funcionalmente, la IL13 señala a través de un complejo de receptores compuesto por la cadena alfa 1 del receptor de la interleucina 13 (IL13RA1) y el receptor alfa de IL-4 (IL4RA) (Daines y Hershey, J Biol Chem., 2002; 22(12):10387-10393). También se ha demostrado que la cadena alfa 2 del receptor de la interleucina 13 (IL13RA2) se une a la IL13 con una afinidad alta, pero solo (Daines y Hershey, J Biol Chem., 2002; 22(12):10387-10393). Sin embargo, este receptor carece del dominio citoplásmico necesario para la señalización y, por tanto, se considera un receptor señuelo. Se ha demostrado que el IL13RA2 es, predominantemente, una molécula intracelular que se puede movilizar rápidamente a partir de almacenes intracelulares y se expresa en la superficie tras el tratamiento celular con interferón (IFN)-gamma. La expresión en la superficie de IL13RA2 tras el tratamiento con IFN-gamma no implica síntesis de proteínas y tiene como resultado una menor señalización de IL13 (Daines y Hershey, J Biol Chem., 2002; 22(12): 10387-10393).

Los resultados del análisis de la matriz de expresión génica para *zcytor17lig* indican que la acción de *zcytor17lig* es nueva con respecto a la del IFN-gamma en cuanto a que el tratamiento con *zcytor17lig* de las líneas celulares derivadas de epitelio pulmonar dieron como resultado un incremento significativo de la expresión del gen de IL.13RA2. Por tanto, es concebible que el tratamiento con *zcytor17lig* sería beneficios en los casos en los que se desea la regulación por aumento a largo plazo de la expresión de IL13RA2 y la regulación por disminución de IL13, tal como en asma, hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) y regulación de la mucina, incluida la sinusitis crónica con pólipos.

#### Ejemplo 41

##### *Ratones transgénicos con Zcytor17lig murino*

Para evaluar los efectos in vivo de la sobreexpresión de *zcytor17lig* se generaron múltiples fundadores de ratones transgénicos que expresaran la forma mutada del gen, dirigido por dos promotores diferentes: El promotor específico de linfocitos  $E\mu/lck$  y el promotor ubicuo EF1 $\alpha$  (Ejemplo 22). Los niveles de proteína en suero varían de aproximadamente 20 a 300 ng/ml. El promotor  $E\mu/lck$  generó ratones con niveles más altos de proteína en suero que los ratones transgénico de EF1 $\alpha$ -*zcytor17lig*.

Los ratones transgénicos con *zcytor17lig* desarrollaron un fenotipo de piel a alrededor de las 4-8 semanas de edad. El pelaje de los ratones transgénicos pasó a estar "erizado" con una erección pilosa obvia y pérdida de pelo de leve a grave, normalmente en el dorso, los laterales del torso y alrededor de los ojos. Este fenotipo se encontró de forma consistente en los ratones con niveles detectables de la proteína *zcytor17lig* en su suero. Entre los fundadores, se observó una tasa de incidencia del 100 % entre los ratones que expresan el gen dirigido por  $E\mu/lck$  y una incidencia del 50 % en los ratones transgénicos EF1 $\alpha$ -*zcytor17lig*, que se correlaciona bien con los niveles relativos de *zcytor17lig* detectados en su suero. La piel transgénica pareció prurítica, lo que se manifestó por el comportamiento de rascado de los ratones, en ocasiones lo bastante excesivo como para inducir excoriación y lesiones en la piel, que normalmente se infectaron (con, al menos, *Staphylococcus aureus*). Inicialmente, se identificó a los ratones con marcadores metálicos en las orejas pero, en la mayoría de los casos, los propios ratones se quitaron los marcadores de las orejas. A menudo, esto tenía como resultado daños en el oído externo. Estas orejas heridas no solían curarse adecuadamente, como refleja la presencia de pústulas duraderas y se desarrollan heridas con costras, supurantes y en expansión en muchos de los animales, detrás y entre las orejas. Algunos de los ratones transgénicos también desarrollaron heridas costrosas en los hombros y el cuello. Se observaron lesiones cutáneas en un subconjunto de los animales, que, generalmente, evolucionaban en áreas de la piel en las que ya se había perdido pelo y a menudo se agravaban por el comportamiento de rascado de los ratones.

Se usó RT-PCR cuantitativa en tiempo real para detectar transcritos de ARN de *zcytor17lig* en muestras de piel transgénica (pero no en no transgénica), de los que la piel transgénica con  $E\mu/lck$  expresaba más ARN de *zcytor17lig* que la piel de los ratones transgénicos con EF1 $\alpha$ -*zcytor17lig*. Los genes que codifican las subunidades del receptor de *zcytor17*, *zcytor17* y OSM-Rbeta, se expresaron en la piel de ratones no transgénicos y transgénicos-*zcytor17lig*.

Un análisis de los tejidos linfoides de una subpoblación de los fundadores transgénicos con  $E\mu/lck$  mediante citometría de flujo reveló un incremento significativo de la proporción de linfocitos T activados en el bazo y los ganglios linfáticos de estos ratones. Dos de los cuatro ratones analizados tenían ganglios linfáticos muy agrandados, posiblemente por la presencia de lesiones en sus cuellos. Se observó un sutil incremento del peso del bazo y un ligero aumento de los niveles de monocitos y neutrófilos circulando en la sangre de los ratones transgénicos. No se observó incremento en diversas citocinas analizadas ni cambios en los niveles de amiloide A circulante en suero en estos ratones. Los efectos sobre las células inmunológicas en los ratones transgénicos pueden ser un resultado directo o indirecto de *zcytor17lig* o son efectos secundarios de las lesiones cutáneas.

Se realizó análisis histopatológico en muchos tejidos aparte de la piel, incluidos hígado, timo, bazo, riñón y testículos, y no se observaron anomalías significativas en estos órganos. No obstante, el análisis de la piel transgénica sí reveló una serie de alteraciones que variaron considerablemente en función de la fuente y la



localización de la piel (p. ej., normal, sin pelo o dañada). En muchos casos, las orejas de los ratones transgénicos tenían una epidermis engrosada en comparación con los controles no transgénico (p. ej., aproximadamente 4 capas frente a 2 capas) y los tejidos subyacentes contenían cifras bajas o moderadas de células inflamatorias, que principalmente eran mononucleares, con neutrófilos ocasionales. La epidermis sobre el abdomen apareció ligeramente más gruesa en múltiples focos en los ratones transgénicos, pero no se observó un incremento evidente de las células inflamatorias en la dermis subyacente o subcutis. En las partes sin pelo de estos ratones había folículos pilosos dilatados que contenían algunos residuos pero no vainas pilosas (p. ej., el pelo se había caído de raíz). En las áreas dañadas, había un engrosamiento intenso de la epidermis (acantosis), aumento de la queratina en la superficie de la piel (hiperqueratosis), úlceras dispersas de diversos tamaños y un número significativo de células inflamatorias en la dermis (principalmente neutrófilos, con cifras variables de macrófagos y linfocitos). La dermis también contenía numerosos mastocitos limitando las lesiones. Algunas de las vainas pilosas en las áreas dañadas de la piel transgénica estaban en estado activo (anagen) en contraste con muchas de las vainas pilosas de las áreas "normales", que estaban en estado de involución (catagen) o inactivo (telogen).

El fenotipo de los ratones transgénicos *zcytor17lig* se asemeja fuertemente al de los pacientes con dermatitis atópica (DA) y modelos de ratones con DA. La DA es una enfermedad inflamatoria crónica frecuente que se caracteriza por citocinas hiperactivadas de la subpoblación 2 de linfocitos T colaboradores (Th2). *Zcytor17lig* se expresa, preferentemente, en las células Th2 frente a Th1, lo que proporciona credibilidad adicional a esta comparación. Aunque la etiología exacta de la DA se desconoce, se ha implicado a múltiples factores, incluidas las respuestas inmunitarias de Th2 hiperactivos, autoinmunidad, infección, alérgenos y predisposición genética. Las características clave de la enfermedad incluyen xerosis (sequedad de la piel), prurito (picor de la piel), conjuntivitis, lesiones cutáneas inflamatorias, infección por *Staphylococcus aureus*, eosinofilia elevada en sangre, elevación de la IgE y IgG1 en suero, y dermatitis crónica con infiltración de linfocitos T, mastocitos, macrófagos y eosinófilos. Se ha reconocido que la colonización o infección con *S. aureus* exacerba la DA y perpetúa la cronicidad de esta enfermedad de la piel.

La DA a menudo se encuentra en pacientes con asma y rinitis alérgica y, con frecuencia, es la manifestación inicial de la enfermedad alérgica. Aproximadamente el 20 % de la población de los países occidentales sufren estas enfermedades alérgicas y la incidencia de la DA en los países desarrollados está aumentando por motivos desconocidos. La DA normalmente comienza en la infancia y a menudo persiste a través de la adolescencia y hasta la edad adulta. Los tratamientos actuales de la DA incluyen corticosteroides tópicos, ciclosporina A oral, inmunosupresores no corticosteroides tales como tacrolimús (FK506 en forma de pomada) e interferón gamma. A pesar de la variedad de tratamientos para la DA, los síntomas de muchos pacientes no mejoran o presentan reacciones adversas a medicamentos, lo que demanda la búsqueda de otros agentes terapéuticos más eficaces.

Las células epiteliales, que expresan el receptor heterodimérico de *zcytor17lig* (*zcytoR17* y *OSM-Rbeta*), se localizan en los sitios (p. ej., piel, intestino, pulmón etc.) de entrada de alérgenos en el cuerpo e interactúan estrechamente con las células dendríticas (células presentadoras de antígeno profesionales) in situ. Las células dendríticas desempeñan un papel importante en la patogenia de las enfermedades alérgicas y es posible que *zcytor17lig* pueda interactuar con su receptor sobre las células epiteliales de la piel y los pulmones e influir sobre las respuestas inmunitarias en estos órganos. *Zcytor17lig* y sus receptor(es) puede, por tanto, contribuir a la patogenia de las enfermedades alérgicas, como la DA y el asma. Además, el fenotipo de los ratones transgénicos *zcytor17lig* sugiere que este ligando puede desempeñar un papel en la cicatrización de heridas, ya que los ratones parecen incapaces de reparar los daños de sus orejas y a menudo son portadores de lesiones duraderas en sus dorsos y laterales. Por tanto, un antagonista de *zcytor17lig* podría representar una terapéutica viable para estas y otras indicaciones.

#### Ejemplo 42

*Ensayo de luciferasa en líneas de células epiteliales transformadas humanas mediante infección transitoria con un gen indicador adenoviral STAT/SRE*

Una amplia variedad de líneas de células epiteliales transformadas humanas (véase la Tabla 16 más adelante) se sembró en placas de 96 pocillos de fondo plano a 10.000 células/pocillo en medio de crecimiento regular, según se especifique para cada tipo de célula. Al día siguiente, las células se infectaron con una construcción indicadora adenoviral, KZ136, a una multiplicidad de infección de 5000. El indicador KZ136 contiene los elementos STAT además de un elemento de respuesta al suero. El volumen total fue de 100  $\mu$ l/pocillo usando DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM (GibcoBRL), piruvato sódico 1 mM (GibcoBRL) y suplemento 1x Insulina-Transferrina-Selenio (GibcoBRL) (en adelante denominado medio sin suero). Las células se cultivaron durante la noche.

Al día siguiente se retiró el medio y se sustituyó con 100  $\mu$ l de medio de inducción. El medio de inducción fue ligando de *zcytor17* humano diluido en medio sin suero a 100 ng/ml., 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml y 1,56 ng/ml. Se usó un control positivo de FBS al 20 % para validar el ensayo y garantizar el éxito de la infección por adenovirus. Las células se indujeron durante 5 horas, tras lo cual se aspiró el medio. Después, las células se lavaron en 50  $\mu$ l/pocillo de PBS y después se lisaron en 30  $\mu$ l/pocillo de tampón de lisis celular 1X (Promega). Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, 25  $\mu$ l/pocillo del lisado se transfirieron a placas de 96 pocillos blancas opacas. Después, se leyeron las placas en el luminómetro usando integración de 5 segundos con inyección

de 40 µl/pocillo del sustrato de la luciferasa (Promega).

Los resultados revelaron la capacidad de múltiples líneas celulares epiteliales para responder al ligando de zcytor17, como se muestra en la Tabla 16 a continuación.

5

Tabla 16

Línea celular	Especie	Tejido	Morfología	Enfermedad	Inducción X
A549	Ser humano	Pulmón	Epitelial	Carcinoma	2x
Sk-Lu-1	Ser humano	Pulmón	Epitelial	Adenocarcinoma	6x
WI-38	Ser humano	Pulmón embrionario	Fibroblastos		Negativa
MRC-5	Ser humano	Pulmón	Fibroblastos		Negativa
DU 145	Ser humano	Próstata	Epitelial	Carcinoma Transformada	10x
PZ-HPV-7	Ser humano	Próstata	Epitelial	con HPV	5x
PC-3	Ser humano	Próstata	Epitelial	Adenocarcinoma	Negativa
U2OS	Ser humano	Hueso	Epitelial	Osteosarcoma	15,5x
SaOS2	Ser humano	Hueso	Epitelial	Osteosarcoma	22x
MG-63	Ser humano	Hueso	Fibroblastos	Osteosarcoma	Negativa
143B	Ser humano	Hueso	Fibroblastos	Osteosarcoma	3,5x
HOS	Ser humano	Hueso	Fibroblastos, y Epitelial		8x
TRBMeC	Ser humano	Médula ósea vascular	Epitelial		2x
HT144	Ser humano	Piel	Fibroblastos	Melanoma;	5x
C32	Ser humano	Piel		Melanoma;	Negativa
Sk-Mel-2	Ser humano	Piel	Poligonal	Melanoma;	2,7x
WM-115	Ser humano	Piel	Epitelial	Melanoma;	2x
HCT-116	Ser humano	De colon	Epitelial	Carcinoma	Negativa
HT-29	Ser humano	De colon	Epitelial	Carcinoma	Negativa
CaCo2	Ser humano	De colon	Epitelial	Adenocarcinoma	3x
HBL-100	Ser humano	Mama	Epitelial		1,5x
ME-180	Ser humano	Cuello uterino	Epitelial	Carcinoma	Negativa
HeLa 299	Ser humano	Cuello uterino	Epitelial	Adenocarcinoma	Negativa
SK-N-SH	Ser humano	Cerebro	Epitelial	Neuroblastoma	Negativa
U138 MG	Ser humano	Cerebro	Poligonal	Glioblastoma	Negativa
HepG2	Ser humano	Hígado	Epitelial	Carcinoma	Negativa
Chang liver	Ser humano	Hígado	Epitelial		Negativa
Sk-Hep-1	Ser humano	Hígado	Epitelial	Adenocarcinoma	4x
Int 407	Ser humano	Intestino	Epitelial		Negativa
3a-Sub E	Ser humano	Placenta			Negativa

### Ejemplo 43

#### 10 Producción de citocinas por las líneas celulares epiteliales humanas cultivadas con ligando de zcytor17 humano

Las líneas celulares epiteliales enfermas humanas (A549, carcinoma epitelial pulmonar; SkLul, adenocarcinoma; epitelial pulmonar humano; DU145, carcinoma epitelial prostático humano; PZ-HPV-7, HPV epitelial prostático humano transformado; U2OS, osteosarcoma epitelial óseo humano) se sometieron a detección selectiva para  
15 detectar la producción de citocinas en respuesta al ligando de zcytor17 *in Vitro*. Estas líneas celulares tienen ambas zcytor17 and OSMR-beta, identificados mediante RT-PCR y responden al ligando de zcytor17 cuando se analizan con la construcción indicadora de luciferasa adenoviral KZ136 (Ejemplo 42). La producción de citocinas por estas líneas celulares se determinó en respuesta al ligando de zcytor17 humano en una serie de tres experimentos.

#### 20 A. Producción de citocinas por las líneas celulares epiteliales humanas en estado de enfermedad cultivadas con zcytor17lig humano

Las células se sembraron en placas a una densidad de  $4,5 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 6 pocillos (Costar) y se cultivaron en los medios de crecimiento respectivos. Las células se cultivaron con reactivos de ensayo  
25 100ng/ml de ligando de zcytor17, 10 ng/ml de Interferón gamma (IFN gamma) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml del factor alfa de necrosis tumoral (TNF alfa) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml de 1L-1beta (R&D Systems, Minneapolis, MN) o 100 ug/ml de lipopolisacárido (LPS) (Sigma). Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 y 48 horas y se analizó la presencia de citocinas; GM-CSF (factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos), IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1 (proteína 1 de quimioatracción de macrófagos) y TNFa Se usaron kit de

Multiplex Antibody Bead de BioSource International (Camarillo, CA) para medir las citocinas en las muestras. Los ensayos se leyeron en un instrumento Luminex-100 (Luminex, Austin, TX) y los datos se analizaron usando software MasterPlex (MiraiBio, Alameda, CA). La producción de citocinas (pg/ml) para cada línea celular en las muestras de 24 horas se muestra a continuación en la Tabla 17.

5

Tabla 17

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

10 Todas las líneas celulares analizadas produjeron GM-CSF e IL-8 en respuesta a la estimulación con las citocinas control IL-1b y TNF-a. La mayoría de las líneas celulares produjeron IL-6 y MCP-1 en respuesta a la estimulación con EL-1b y TNFa. El ligando de Zcytor17 estimuló la producción de IL-6 en la línea celular DU145 en comparación con los controles (193 pg/ml frente a 71 pg/ml). El ligando de Zcytor17 estimuló la producción de IL-8 por 3 de 5

líneas celulares, observándose el mayor efecto en las células A549 (por 5) y menor producción de IL-8 en las células U2OS, por 2. Se produjo un ligero efecto sobre la producción de MCP-1 por parte de las células DU145 y U2OS cuando se cultivaron con el ligando de zcytor17.

5 *B. Producción de citocinas por las líneas celulares epiteliales humanas normales cultivadas con zcytor17lig humano*

Además de las líneas celulares epiteliales humanas, también se analizaron las celulares epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE, Clonetics). Las células se sembraron en placas a una densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se cultivaron con reactivos de ensayo; 1000 ng/ml, 100 ng/ml and 10 ng/ml del ligando de zcytor17 (A760F), 10 ng/ml de TNFa, 10 ng/ml de OSM, 10 ng/ml de IFNa, 10 ng/ml de TGFb o 10 ng/ml de linfotactina. Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 y 48 horas y se analizó la presencia de citocinas: IL-6, IL8, MCP-1, MIP-1a, RANTES y Eotaxina. Las citocinas se analizaron como se ha descrito anteriormente. La producción de citocinas (pg/ml) para cada línea celular en las muestras de 48 horas se muestra a continuación en la Tabla 18.

15

Tabla 18

IL-6 pg/ml					
	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000ng/ml	24,5	56,3	32,1	25,2	64,5
r171L 100ng/ml	25,0	65,0	31,0	25,4	50,2
r17L 10ng/ml	24,8	51,8	30,2	25,3	54,3
TNFa	272,9	355,4	437,5	36,1	299,3
OSM	26,4	73,5	112,4	25,6	80,4
IFNa	24,6	109,3	33,7	26,4	52,4
TGFb	24,4	102,6	42,7	27,8	268,9
control	24,5	36,3	29,9	25,2	47,9
IL-8 pg/ml					
	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000ng/ml	35,0	243,3	45,6	18,6	402,0
r171L 100ng/ml	31,0	290,7	40,1	21,3	296,0
r17L 10ng/ml	30,4	240,4	33,4	18,9	361,8
TNFa	2809,3	2520,9	1385,2	784,9	1486,3
OSM	37,8	60,6	68,0	22,5	494,6
IFNa	18,9	315,3	39,5	33,1	231,6
TGFb	9,9	77,5	19,6	88,9	246,9
control	10,9	238,0	38,0	39,7	315,8
MCP-1 pg/ml					
	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000ng/ml	nd	nd	149,1	81,0	nd
r171L 100ng/ml	nd	nd	130,6	81,9	nd
r17L 10ng/ml	nd	nd	111,7	49,1	nd
TNFa	nd	22,1	2862,6	1104,7	nd
OSM	nd	17,2	448,2	85,8	nd
IFNa	nd	nd	131,7	10,5	nd
TGFb	nd	1,7	54,5	27,6	nd
control	nd	nd	113,0	1,7	nd

nd = No detectado

Las células DU145 produjeron IL-6 en respuesta al ligando de zcytor17, de modo que se repiten los resultados anteriores del Ejemplo 43A. No obstante, solo A549 y U2OS tuvieron respuestas de IL-8 similares a las observadas en el Ejemplo 43A. Las células SkLu1 and U2OS produjeron MCP-1 en respuesta al ligando de zcytor17. La producción de citocinas por las células NHBE fue insignificante en comparación con los controles.

25 *C. Producción de citocinas por las líneas celulares epiteliales humanas en estado de enfermedad co-cultivadas con zcytor17lig humano e IFN gamma*

Las células se sembraron en placas a una densidad de 2 x 10<sup>5</sup> células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se co-cultivaron con 10 ng/ml de IDN-gamma +/- ligando de zcytor17 a 100 ng/ml, 10 ng/ml o 1 ng/ml. Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 y 48 horas y se analizó la presencia de IL-8 y MCP-1 como se ha descrito anteriormente. La producción de citocinas (pg/ml) para cada línea celular en las muestras de 24 horas se muestra a continuación en la Tabla 19.

30

Tabla 19

		IL-8 pg/ml	MCP-1 pg/ml
A549	10ng/ml IFNg+100ng/ml r17L	86,7	nd
	10ng/ml IFNg+10ng/ml r17L	75,1	nd
	10ng/ml IFNg+1ng/ml r17L	63,6	nd
	10ng/ml IFNg	35,4	nd
	control	36,6	nd
DU145	10ng/ml IFNg+100ng/ml r17L	102,3	nd
	10ng/ml IFNg+10ng/ml r17L	92,9	nd
	10ng/ml IFNg+1ng/ml r17L	79,9	nd
	10ng/ml IFNg	70,7	nd
	control	79,4	nd
SkLul 1	10ng/ml IFNg+100ng/ml r17L	152,2	604,9
	10ng/ml IFNg+10ng/ml	194,4	870,7
	10ng/ml IFNg+1ng/ml r17L	138,7	585,4
	10ng/ml IFNg	170,8	652,6
	control	203,0	292,3
U2OS	10ng/ml EFNg+100ng/ml r17L	106,8	357,0
	10ng/ml IFNg+10ng/ml r17L	108,2	347,7
	10ng/ml IFNg+1ng/ml r17L	109,9	293,3
	10ng/ml IFNg	118,8	159,8
	control	146,8	7,0

Las células A549 produjeron IL-8 en respuesta al ligando de zcytor17, sin embargo no se produjo ningún efecto por el co-cultivo de las células con la adición de IFN-gamma. Las células U2OS sintetizaron 10 veces más MCP-1 cuando se cultivaron con IFNg y 50 veces más MCP-1 cuando se cultivaron con IFN gamma + ligando de zcytor17.

5

#### Ejemplo 44

*Efectos de Zcytor17lig sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-TdR en células de carcinoma epitelial de próstata DU145*

10 Las células se sembraron en grupos de tejido de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de 25.000/pocillo en medio de crecimiento MEM ((Life Technologies) suplementado con glutamina, piruvato, aminoácidos no esenciales (Life Technologies) y suero bovino fetal al 10 % (Hyclone). En la confluencia (24 horas después), las células se cambiaron a medio de detención del crecimiento sustituyendo el BSA (LifeTechnologies) al 0,1 % por suero. Tras 48 horas para alcanzar la sincronización celular, el medio de detención del crecimiento se sustituyó con medio fresco.

15 Después, se añadió zcytor17lig recombinante humano (reactivo de ensayo) a varias concentraciones (de 0,24 a 60 ng/ml) (véase la Tabla 16 a continuación), para analizar el efecto de la proteína sobre la replicación del ADN basal. Algunos pocillos recibieron FBS al 2,5 % (Hyclone) además del zcytor17Ligand, con el fin de analizar el efecto de la proteína sobre niveles elevados de incorporación de TdR. Como control positivo se usaron FBS al 10 % y factor de crecimiento derivado de las plaquetas-BB a 20 ng/ml (R&D).

20

Dieciocho horas después de la adición de zcytor17Ligand y del resto de los reactivos de ensayo, las células se sometieron a pulsos con 250 nCi/ml de [<sup>3</sup>H]-timidina (NEN) durante 4 horas. Tras los pulsos de 4 horas, se desechó el medio y a cada pocillo se añadieron 100 µl de solución de tripsina (Life Technologies) para extraer las células. La radiactividad incorporada por las células DU145 se determinó recolectando las células con un cosechador celular Packard Filtermate 196 y contando el marcaje incorporado usando un contador de centelleo de microplacas Packard TopCount NXT.

25

Como se puede ver en la Tabla 20 a continuación, zcytor17lig indujo la incorporación de timidina en células quiescentes (en BSA al 0,1 %) de un modo dependiente de concentración. Este efecto alcanzó 2,5 veces el del BSA control a la concentración más elevada usada, 60 ng/ml. Además, este efecto del zcytor17lig también se pudo detectar cuando la incorporación basal se elevaba por la adición de FBS al 2,5 % (en esta serie un mitógeno tan potente como el FBS al 10 %). Por tanto, estos resultados indican que en condiciones basales y de estimulación, el zcytor17lig puede actuar como factor mitogénico para las células de carcinoma DU145.

30

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

Tabla 20

	BSA al 0,1 %	FBS al 2,5 %
BSA Control	1139 ± 336	4228 ± 600
Zcytor171ig (0,24 ng/ml)	1430 ± 136	4894 ± 1037
Zcytor17lig (0,74 ng/ml)	1657 ± 32	5038 ± 810

Zcytor17lig (2,22 ng/ml)	1646 ± 57	5162 ± 808
Zcytor17lig (6,67 ng/ml)	2226 ± 189	6385 ± 1613
Zcytor17lig (20 ng/ml)	2168 ± 108	5880 ± 1085
Zcytor17lig (60 ng/ml)	2512 ± 111	6165 ± 417
PDGF-BB (20ng/ml)	4094 ± 202	5927 ± 360

#### Ejemplo 45

##### Expresión del huzcytor17Ligand en *E.coli*

5

##### A. Construcción del vector de expresión pRPS01 que expresa el polipéptido de fusión huzcytor17/MBP-6H

Mediante recombinación homóloga se construyó un plásmido de expresión que contiene un polinucleótido que codifica un huzcytor17lig condensado en el extremo C a la proteína de unión a maltosa (MBP). El polipéptido de fusión contiene una porción de MBP de aproximadamente 388 aminoácidos en N-terminal condensada al huzcytor17Lig descrito en el presente documento. Usando PCR, como se describe en el presente documento, se aisló un fragmento de ADNc de huzcytor17lig. Se usaron dos cebadores en la producción del fragmento zcytor17lig en una reacción de PCR estándar. (1) uno que contiene aproximadamente 40 pb del vector que flanquea la secuencia y 20 pb correspondientes al extremo amino del huzcytor17lig y (2) otro que contiene aproximadamente 40 pb del extremo 3' correspondiente a la secuencia del vector flanqueante y 20 pb correspondiente al extremo carboxilo del huzcytor17lig. Dos microlitros de la reacción de PCR de 100 µl se pasaron por un gel de agarosa al 1,0 % con tampón 1 x TBE para análisis y se observó el fragmento del peso molecular esperado. La reacción de PCR restante se combinó con el segundo tubo de PCR y precipitó con 400 µl de etanol absoluto. El ADN precipitado se usó para recombinar en un vector receptor pTAP98 cortado con SmaI para producir la construcción que codifica la fusión MBP-huzcytor17lig como se describe más adelante.

El vector pTAP98 se construyó usando recombinación homóloga de levaduras. Cien nanogramos de pMAL-c2 cortado con EcoR1 se recombinaron con 1 µg de pRS316 cortado con Pvu1, 1 µg de ligador y 1 µg de pRS316 cortado con ScaI/EcoR1 se combinaron en una reacción de PCR. Los productos de la PCR se concentraron mediante precipitación en etanol al 100 %. La cepa competente de células de levadura (*S. cerevisiae*), SF838-9Da, se combinó con 10 µl de una mezcla que contiene aproximadamente 1 µg del producto de PCR huzcytor17lig (anteriormente) y 100 ng del vector pTAP98 digerido con SmaI y se sometieron a electroporación a 0,75 75 kV, 25 µF y ∞ ohmios. La mezcla de reacción resultante se sembró en placas sobre placas URA-D y se incubó a 30 °C.

Tras 48 horas, se seleccionaron los transformantes de levadura Ura+ de una única placa. El ADN se aisló y se transformó en células de *E. coli* electrocompetentes (p. ej., MC1061, Casadaban y col. J. Mol. Biol. 138, 179-207). Las células de *E. coli* resultantes se sembraron en placas MM/CA +AMP a 100 mg/l (Pryor and Leiting, Protein Expression and Purification 10: 309-319, 1997) usando procedimientos estándar. Se recolectaron cuatro clones individuales de las placas y se inocularon en MM/CA con 100 µg/ml de ampicilina durante dos horas a 37 °C. Un mililitro de cada uno de los cultivos se indujo con IPTG 1 mM. Aproximadamente 2-4 horas después, los 250 µl de cada cultivo inducido se mezclaron con 250 µl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 250 µl de tampón de Thorner con βME al 5 % (urea 8M, Tris 100 Mm, pH 7,0, glicerol al 10 %, EDTA 2 mM, SDS al 5 %). Las muestras se agitaron en vórtex durante un minuto y se calentaron hasta 65 °C durante 10 minutos. Se cargaron veinte microlitros por carril en un gel de PAGE 4 %-12 % (NOVEX). Los geles se pasaron en un tampón 1XMES. Los clones positivos se denominaron pROPS01 y se sometieron a análisis de secuencia.

Se usó un microlitro de ADN de secuenciación para transformar la cepa electrocompetente de *E. coli* MC1061. Las células se sometieron a electropulsación a 2,0 kV, 25 µF y 400 ohmios. Tras la electroporación se rescató a las células con 0,6 ml de SOC y se cultivaron en placas LB+Amp a 37 °C durante la noche, con 100 mg/l de ampicilina. Cuatro cultivos se indujeron con IPTG y se sometieron a detección selectiva para detectar los positivos, como se ha descrito anteriormente. Los clones positivos se expandieron para purificación de proteínas de la proteína de fusión huzcytor17/MBP-6H usando técnicas estándar.

##### B. Purificación huzcytor17Lig/MBP-6H de fermentación de *E.coli*

50

A menos que se indique lo contrario, todas las operaciones se realizaron a 4 °C. El procedimiento siguiente se usó para la purificación del polipéptido de huzcytor17Lig/MBP-6H. Las células de *E. Coli* que contienen la construcción pRPS01 y que expresan huzcytor17Lig/MBP-6H se construyeron usando procedimientos de biología molecular estándar y se cultivaron en SuperBroth II 50,0 g/l (12 g/l Casien, 24 g/l de extracto de levadura, 11,4 g/l de fosfato dipotásico, 1,7 g/l de fosfato monopotásico; Becton Dickinson, Cockeysville, MD), 5 g/l de glicerol y 5 ml/l de sulfato magnésico 1M. Para la purificación de proteínas se recolectaron veinte gramos de células congeladas y se congelaron.

55

Las células descongeladas se resuspendieron en 500 ml de tampón de equilibrado de Amilosa (Tris 20 mM, NaCl

100 mM, pH 8,0). Para lisar las células se usó un sistema de rotura de células en prensa francesa (Constant Systems Ltd., Warwick, Reino Unido) fijando la temperatura a -7°C a 10°C y 30 K PSI. En las células resuspendidas se analizó la rotura mediante lecturas de la A<sub>600</sub> antes y después de ciclar a través de la Prensa Francesa. La suspensión celular procesada se sedimentó a 10.000 G durante 30 minutos para eliminar todos los residuos celulares y se recolectó el sobrenadante para purificación de proteínas.

Una columna de 25 ml de la resina Amilosa (New England Biolabs, Beverly, MA) (preparada como se describe más adelante) se vertió en una columna de cristal Bio-Rad de 2,5 cm de D x 10 cm de altura. La columna se empaquetó y equilibró por gravedad con 10 volúmenes de columna (CV) del tampón de equilibrado de Amilosa. El sobrenadante celular procesado se cargó de forma discontinua en la resina Amilosa, durante la noche con balanceo. La resina se devolvió a la columna Bio-Rad y se lavó con 10 VC del tampón de equilibrado de Amilosa por gravedad. La columna se eluyó con -2 VC de tampón de elución de Amilosa (tampón de equilibrado de Amilosa + Maltosa 10 mM, Fluka Biochemical, Suiza) por gravedad. Se recogieron diez fracciones de 5 ml sobre el perfil de elución y se analizó la absorbancia a 280 y 320 nm. La resina Amilosa se regeneró con 1 VC de H<sub>2</sub>O destilada, 5 VC de SDS al 0,1 % (p/v) (Sigma), 5 VC de H<sub>2</sub>O destilada, 5 CV de tampón de equilibrado Amilosa y, por último, 1 CV de tampón de almacenamiento Amilosa (tampón de equilibrado de Amilosa, azida sódica al 0,02 % (p/v). La columna regenerada se almacenó a 4 °C.

Las fracciones del perfil de elución de interés se combinaron y dializaron en una cámara de diálisis de 10K (Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemical) contra 4 x 4 l de PBS a pH 7,4 (Sigma) durante un periodo de tiempo de 8 horas, para eliminar los contaminantes de bajo peso molecular, intercambio de tampón y desalación. Tras la diálisis, el material recolectado representaba el polipéptido huzcytor17Lig/MBP-6H purificado. El polipéptido huzcytor17Lig/MBP-6H purificado se esterilizó mediante filtración y se analizó mediante tinción con azul de Coomassie en SDS-PAGE para un producto de peso molecular adecuado. Mediante análisis BCA se determinó que la concentración del polipéptido huzcytor17Lig/MBP-6H era 1,28 mg/ml.

#### Ejemplo 46

##### *Anticuerpo policlonal de zcytor17lig humano*

##### *A. Preparación y Purificación*

Los anticuerpos policlonales se prepararon inmunizando 2 conejos hembra blancos New Zealand con la proteína recombinante purificada hzcytor17L/MBP-6H (Ejemplo 45). A cada conejo se administró una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 200 µg de proteína purificada en adyuvante completo de Freund, seguido de inyecciones IP de refuerzo de 100 µg de proteína en adyuvante incompleto de Freund cada tres semanas. De siete a diez días después de la administración de la segunda inyección de refuerzo (3 inyecciones totales), se extrajo sangre de los animales y se obtuvo el suero. Después, se administró refuerzo a los animales y se extrajo sangre cada tres semanas.

El suero de conejo específico de hzcytor17L/MBP-6H se pre-adsorbió de anticuerpos anti-MBP usando una columna de proteínas CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB) que se preparó usando 10 mg de la proteína de fusión-MBP recombinante purificada no específica por gramo de CNBr-SEFAROSA. Los anticuerpos policlonales específicos de hzcytor17L/MBP-6H se purificaron por afinidad a partir del suero de conejo pre-adsorbido usando una columna de proteínas CNBr-SEFAROSA 4B (Pharmacia LKB) que se preparó usando 10 mg de la proteína recombinante purificada de antígeno específico de hzcytor17L/MBP-6H. Tras la purificación, los anticuerpos policlonales se dializaron con 4 cambios de 20 veces el volumen de anticuerpo de PBS en un periodo de tiempo de al menos 8 horas. Los anticuerpos específicos de Hzcycotor17-Ligand se caracterizaron mediante ELISA usando 500 ng/ml de las proteínas recombinantes purificadas hzcytor17L/MBP-6H o hzcytor17L-CEE producidas en un sistema de expresión en baculovirus como dianas del anticuerpo. El límite inferior de detección (LID) del anticuerpo purificado por afinidad hzcytor17L/MBP-6H de conejo es 100 pg/ml en su antígeno recombinante purificado específico hzcytor17L/MBP6H y 500 pg/ml en el hzcytor17L-CEE recombinante purificado producido en un sistema de expresión en baculovirus.

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

El anticuerpo ZcytoR17lig MBP-6H anti-humano de conejo se analizó mediante SDS-PAGE (NuPage 4-12 %, Invitrogen, Carlsbad, CA) con el procedimiento de tinción con coomassie y transferencia de tipo Western usando IgG anti-conejo de cabra-HRP. La proteína purificada de zcytor17lig humano y de ratón (200-25 ng) se sometió a electroforesis usando una mini-celda Invitrogen Novex's Xcell II y se transfirió a nitrocelulosa (0,2 mm, Invitrogen, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente usando el módulo de transferencia Xcell de Novex con agitación siguiendo las instrucciones proporcionados en el manual del instrumento. La transferencia se realizó a 300 mA durante una hora en un tampón que contiene basa Tris 25 mM, glicina 200 mM y metanol al 20 %. Después, el filtro se bloqueó con tampón Western A (interno, Tris 50 mM, a pH 7,4, EDTA 5 mM, pH 8,0, Igepal CA-630 al 0,05 %, NaCl 150 mM y gelatina al 0,25 %) durante la noche con balanceo suave a 4 °C. La nitrocelulosa se aclaró rápidamente, después, se añadió zcytoR17 MBP-6H anti-humano de conejo (1:1000) en tampón Western A. La transferencia se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente con balanceo suave. La transferencia se aclaró 3 veces durante 5

minutos cada vez en Western A, después se añadió anticuerpo IgG anti-conejo de cabra-HRP (1:5000) en tampón Western A. La transferencia se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con balanceo suave. La transferencia se aclaró 3 veces durante 5 minutos cada vez en Western A, después se aclaró rápidamente en H<sub>2</sub>O. La transferencia se desarrolló usando reactivos de sustrato quimioluminiscente comercialmente disponibles (reactivos de detección de transferencia Western ECL 1 y 2 mezclados 1:1; reactivos obtenidos en Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) y la transferencia se expuso a una película de rayos X durante hasta 5 minutos.

El zcytor17lig humano purificado apareció como una banda grande a aproximadamente 30 kDa y una banda más pequeña a aproximadamente 20 kDa en condiciones reducidas. El zcytor17lig de ratón no se detectó mediante el anticuerpo anti-zcytor17lig humano de conejo.

#### Ejemplo 47

##### 15 *Efectos de Zcytor17lig sobre la adhesión de monocitos U937 a la monocapa de células endoteliales de médula ósea transformadas (TRBMEC)*

Las células endoteliales de médula ósea transformadas (TRBMEC) se sembraron en grupos tisulares de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de 25.000/pocillo en medio M131 (Cascade Biologics) suplementado con suplemento de crecimiento microvascular (MVGs) (Cascade Biologics). En la confluencia (24 horas después), las células se cambiaron a M199 (Gibco-Life Technologies) suplementado con suero bovino fetal al 1 % (Hyclone). El zcytor17lig recombinante humano (reactivo de ensayo) se añadió a varias concentraciones (de 0,4 a 10 ng/ml) (véase la Tabla 21 a continuación), para analizar el efecto de la proteína sobre las interacciones células inmunitarias-células endoteliales que dan lugar a adhesiones. Algunos pocillos recibieron 0,3 ng/ml de factor de necrosis tumoral (TNF alfa R&D Systems), una conocida citocina proinflamatoria, además de zcytor17lig, para analizar el efecto de la proteína sobre las células endoteliales en condiciones inflamatorias. El TNF alfa a 0,3 ng/ml solo se usó como control positivo y la concentración usada representa aproximadamente el 70 % del efecto máximo del TNF alfa en este sistema, es decir no induce adherencia máxima de las células U937 (una línea celular similar a los monocitos humanos) al endotelio. Por esta razón, esto puede detectar regulación por aumento y regulación por disminución de los efectos del TNF alfa. Los niveles basales de adhesión con y sin TNF alfa se usaron como basal para evaluar el efecto de los reactivos de ensayo.

Tras incubación durante la noche de las células endoteliales con los reactivos de ensayo (zcytor17ligand ±; TNF alfa), las células U937 teñidas con calceína 5µM-marcador fluorescente AM (Molecular Probes), las células se suspendieron en RPMI 1640 (sin rojo fenol) suplementado con FBS al 1 % y se sembraron a 100.000 células/pocillo sobre la monocapa TRBMEC aclarada. Los niveles de fluorescencia a las longitudes de onda de excitación/emisión de 485/538 nm (lector de microplacas Molecular Devices, aplicación CytoFluor) se midieron 30 minutos después, antes y después de lavar los pocillos tres veces con RPMI 1640 (sin rojo fenol) para eliminar las células U937 no adheridas. Los niveles de fluorescencia antes del lavado (total) y después del lavado (específicos de la adherencia) se usaron para determinar el porcentaje de adherencia (adherencia neta/neta total x 100= % adherencia).

Como se puede apreciar en la Tabla 21 más adelante, zcytor17lig, cuando se añade solo, afectó a la adherencia basal de las células U937 a las monocapas endoteliales al intervalo de concentración usado (incrementos menores de 2 veces, p<0,01 mediante ANOVA). Por si solo, el control positivo, 0,3 ng/ml. El TNF alfa aumentó la adherencia de las células U937 de un 5,8 % basal al 35 % (por 6). En presencia de TNF alfa, zcytor17lig sinergizó con TNF alfa y potenció la adhesión de U937 de un modo dependiente de la concentración entre 0,4 y 10 ng/ml (p<0,01 mediante ANOVA). A 10 ng/ml, zcytor17lig potenció el efecto del TNF alfa en un 62 %. Estos resultados indican que zcytor17lig puede, por si solo, ser un agente proinflamatorio. Zcytor17lig pudo sinergizar con concentraciones submáximas de TNF alfa para aumentar la adherencia de los monocitos a las células endoteliales. Estos resultados también muestran que las células endoteliales, especialmente cuando se exponen a las citocinas proinflamatorias, tales como TNF alfa, son un probable tejido diana de la acción de zcytor17lig. La consecuencia de zcytor17ligand sobre las células endoteliales puede ser reforzar la adhesión de los monocitos o los macrófagos a un sitio de actividad proinflamatoria. Los monocitos y los macrófagos activados son importantes en muchas enfermedades inflamatorias. Por tanto, la inhibición de las adhesiones de monocitos/macrófagos puede proporcionar un fundamento terapéutico para los antagonistas de zcytor17ligand. Estos datos respaldarían el uso de antagonistas del ligando de zcytor17 para el tratamiento de enfermedades pulmonares, enfermedades vasculares, autoinmunidad, metástasis tumorales, enfermedades que implican reacciones alérgicas, cicatrización de heridas y enfermedades de la piel, que incluyen dermatitis por contacto, alérgica o no alérgica, o psoriasis y enfermedad intestinal inflamatoria. La Tabla 21 muestra los efectos de zcytor17lig sobre la adhesión de los monocitos U937 a monocapas endoteliales de TRBMEC. Los resultados se expresan en porcentaje de adhesión y los números son la media ± desviación estándar de los pocillos por triplicado.

Tabla 21

	<i>Basal</i>	<i>0,3 ng/ml de TNF alfa</i>
Basal	5,8 ± 1,2	35 ± 5,5



## ES 2 546 797 T3

zcytor17lig 0,4 ng/ml	9 ± 0,7	44,7 ± 2,5
zcytor17lig 1,1 ng/ml	10,4 ± 0,8	45,2 ± 0,6
zcytor17lig 3,3 ng/ml.	7,9 ± 1,7	51,1 ± 4,0
zcytor17lig 10 ng/ml	9,5 ± 0,5	56,6 ± 3,9

1. Un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado que comprende:

5 al menos un polipéptido que tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con SEC ID N°: 111 o SEC ID N°: 109; y en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende la SEC ID N°: 2.

10 2. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 1 en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico comprende además un dominio de unión a citocina de un receptor de citocinas de clase I.

15 3. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 2, en el que el dominio de unión a citocinas del receptor de citocinas de clase I comprende del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 739 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 429 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 739 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 761 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 761 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 979 de SEC ID N°: 7, o del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 979 de SEC ID N°: 7.

20 4. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 1, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico antagoniza una actividad de SEC ID N°: 2.

25 5. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico de la cláusula 1, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico inhibe la proliferación de células hematopoyéticas, inhibe la proliferación de células inmunes, inhibe la proliferación de células inflamatorias, inhibe una respuesta inmune, inhibe una respuesta inflamatoria o inhibe la proliferación de células tumorales de origen epitelial.

30 6. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 1, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico es soluble.

7. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 1 que comprende además un marcador de afinidad o una molécula citotóxica.

35 8. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 7, en el que el marcador de afinidad es polihistidina, proteína A, glutatión S transferasa, Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag™, péptido de unión a estreptavidina o polipéptido Fc de inmunoglobulina.

40 9. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 7, en el que la molécula citotóxica es una toxina o un radionúclido.

45 10. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 1, en el que el polipéptido que tiene al menos un 90 por ciento de identidad con SEC ID N°: 111 comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 519 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 543 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 732 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 227, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 519, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 543 o del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 732.

50 11. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 1, en el que el polipéptido que tiene al menos un 90 por ciento de identidad con SEC ID N°: 109 comprende del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 649 de SEC ID N°: 109 o del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 649 de SEC ID N°: 109.

55 12. Un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado que comprende al menos un polipéptido que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111.

60 13. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 12, en el que el polipéptido comprende del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 519 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 519 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 543 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 543 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 732 de SEC ID N°: 111, o del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 732 de SEC ID N°: 111.

14. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 12, que además comprende un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I.
- 5 15. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 14, en el que el dominio de unión a citocinas del receptor de citocinas de clase I comprende del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 429 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 739 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 739 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 761 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 761 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 979 de SEC ID N°: 7 o del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 979 de SEC ID N°: 7.
- 10 16. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 12, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico antagoniza una actividad de un ligando que comprende a SEC ID N°: 2.
- 15 17. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 12, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico inhibe la proliferación de células hematopoyéticas, inhibe la proliferación de células inmunes, inhibe la proliferación de células inflamatorias, inhibe una respuesta inmune, inhibe una respuesta inflamatoria o inhibe la proliferación de células tumorales de origen epitelial.
- 20 18. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 12, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico es soluble.
- 25 19. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 12 que además comprende un marcador de afinidad o una molécula citotóxica.
- 30 20. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 19, en el que el marcador de afinidad es polihistidina, proteína A, glutatión S transferasa, Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag™, péptido de unión a estreptavidina o polipéptido Fc de inmunoglobulina.
- 35 21. El receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de la cláusula 19, en el que la molécula citotóxica es una toxina o un radionúclido.
- 40 22. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de receptor de citocinas que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con SEC ID N°: 111 o SEC ID N°: 109, en el que el polipéptido receptor de citocinas forma un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico, y en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende la SEC ID N°: 2.
- 45 23. El polinucleótido aislado de la cláusula 22, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico comprende además un dominio de unión a citocina de un receptor de citocinas de clase I.
- 50 24. El polinucleótido aislado de la cláusula 23, en el que el dominio de unión a citocina del receptor de citocinas de clase I comprende del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 739 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 429 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 739 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 761 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 761 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 979 de SEC ID N°: 7 o del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 979 de SEC ID N°: 7.
- 55 25. El polinucleótido aislado de la cláusula 22, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico antagoniza una actividad de SEC ID N°: 2.
- 60 26. El polinucleótido aislado de la cláusula 22, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico inhibe la proliferación de células hematopoyéticas, inhibe la proliferación de células inmunes, inhibe la proliferación de células inflamatorias, inhibe una respuesta inmune, inhibe una respuesta inflamatoria o inhibe la proliferación de células tumorales de origen epitelial.
- 65 27. El polinucleótido aislado de la cláusula 22, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico es soluble.
28. El polinucleótido aislado de la cláusula 22, que además comprende un marcador de afinidad o una molécula citotóxica.
29. El polinucleótido aislado de la cláusula 28, en el que el marcador de afinidad es polihistidina, proteína A, glutatión S transferasa, Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag™, péptido de unión a estreptavidina, o polipéptido Fc de inmunoglobulina.

30. El polinucleótido aislado de la cláusula 28, en el que la molécula citotóxica es una toxina o un radionúclido.
31. El polinucleótido aislado de la cláusula 22, en el que el polipéptido receptor de citocinas que tiene al menos un 90 por ciento de identidad con SEC ID N°: 111 comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 519 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 543 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 732 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 519 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 543 de SEC ID N°: 111 o del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 732 de SEC ID N°: 111.
32. El polinucleótido aislado de la cláusula 22, en el que el receptor de citocinas que tiene al menos un 90 por ciento de identidad con SEC ID N°: 109 comprende del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 649 de SEC ID N°: 109 o del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 649 de SEC ID N°: 109.
33. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido receptor de citocinas que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111, en el que el polipéptido receptor de citocinas forma un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico.
34. El polinucleótido aislado de la cláusula 33, en el que el polipéptido receptor de citocinas comprende del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 519 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 519 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 543 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 543 de SEC ID N°: 111, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 732 de SEC ID N°: 111 o del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 732 de SEC ID N°: 111.
35. El polinucleótido aislado de la cláusula 33, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico comprende además un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I.
36. El polinucleótido aislado de la cláusula 35, en el que el dominio de unión a citocinas del receptor de citocinas de clase I comprende del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 429 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 739 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 739 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 761 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 761 de SEC ID N°: 7, del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 979 de SEC ID N°: 7 o del resto de aminoácido 1 al resto de aminoácido 979 de SEC ID N°: 7.
37. El polinucleótido aislado de la cláusula 33, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico antagoniza una actividad de un ligando que comprende a SEC ID N°: 2.
38. EL polinucleótido aislado de la cláusula 33, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico inhibe la proliferación de células hematopoyéticas, inhibe la proliferación de células inmunes, inhibe la proliferación de células inflamatorias, inhibe una respuesta inmune, inhibe una respuesta inflamatoria o inhibe la proliferación de células tumorales de origen epitelial.
39. El polinucleótido aislado de la cláusula 33, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico es soluble.
40. El polinucleótido aislado de la cláusula 33, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico comprende además un marcador de afinidad o una molécula citotóxica.
41. El polinucleótido aislado de la cláusula 40, en el que el marcador de afinidad es polihistidina, proteína A, glutatión S transferasa, Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag™, péptido de unión a estreptavidina, o polipéptido Fc de inmunoglobulina.
42. El polinucleótido aislado de la cláusula 40, en el que la molécula citotóxica es una toxina o un radionúclido.
43. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente:
- un promotor de la transcripción;
  - un segmento de ADN que codifica un polipéptido receptor de citocinas que tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con SEC ID N°: 111; y
  - un terminador de la transcripción;
- en el que el polipéptido receptor de citocinas forma un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico, y en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende SEC ID N°: 2.
44. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente:

- a) un primer promotor de la transcripción; un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido receptor de citocinas que tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con SEC ID N°: 111; y un primer terminador de la transcripción; y
- 5 b) un segundo promotor de la transcripción; un segundo segmento de ADN que codifica un dominio de unión a citocina de un receptor de citocinas de clase I; y un segundo terminador de la transcripción;
- en el que el polipéptido receptor de citocinas y el receptor de citocinas de clase I forman un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico; y
- 10 en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende a SEC ID N°: 2.
45. Una célula cultivada que comprende un vector de expresión de la cláusula 43, en el que la célula expresa el polipéptido receptor de citocinas codificado por el segmento de ADN.
- 15 46. Una célula cultivada que comprende un vector de expresión de la cláusula 44, en el que la célula expresa el polipéptido receptor de citocinas y el receptor de citocinas de clase I codificado por los segmentos de ADN.
47. Una célula cultivada que comprende:
- 20 un primer vector de expresión que comprende:
- a) un promotor de la transcripción;
- b) un segmento de ADN que codifica un receptor de citocinas que tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con SEC ID N°: 111; y
- 25 c) un terminador de la transcripción; y
- un segundo vector de expresión que comprende:
- a) un promotor de la transcripción;
- 30 b) un segmento de ADN que codifica un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I; y
- c) un terminador de la transcripción;
- en el que el polipéptido receptor de citocinas y el receptor de citocinas de clase I forman un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico; y
- 35 en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende a SEC ID N°: 2.
48. Un procedimiento para producir un anticuerpo para un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocinas de clase I, comprendiendo el método:
- 40 inocular en un animal el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico provoca una respuesta inmune en el animal para producir un anticuerpo que se une específicamente al receptor de citocinas multimérico o heterodimérico; y
- 45 aislar el anticuerpo del animal.
49. Un anticuerpo que se une específicamente al receptor de citocinas multimérico o heterodimérico de la cláusula 1.
- 50 50. Un anticuerpo que se une específicamente al receptor de citocinas multimérico o heterodimérico de la cláusula 12.
51. Una composición que comprende:
- 55 una cantidad eficaz de un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I; y
- un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 60 52. Un procedimiento para producir un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico que comprende:
- cultivar una célula de acuerdo con la cláusula 45; y
- aislar el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico producido por la célula.
- 65 53. Un procedimiento para producir un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico que comprende:
- cultivar una célula de acuerdo con la cláusula 46; y

aislar al receptor de citocinas multimérico o heterodimérico producido por la célula.

54. Un procedimiento para producir un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico que comprende:

5 cultivar una célula de acuerdo con la cláusula 47; y  
aislar el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico producido por la célula.

55. Una composición inhibidora de células inmunes que comprende:

10 una cantidad eficaz de un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I; y  
un vehículo farmacéuticamente aceptable;  
15 en la que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble inhibe la proliferación de células inmunitarias.

56. Una composición inhibidora de una respuesta inmune que comprende:

20 una cantidad eficaz de un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I; y  
un vehículo farmacéuticamente aceptable;  
en la que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble inhibe una respuesta inmune.

25 57. Una composición inhibidora de células inflamatorias que comprende:

una cantidad eficaz de un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I; y  
30 un vehículo farmacéuticamente aceptable;  
en la que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble inhibe la proliferación de células inflamatorias.

58. Una composición inhibidora de la respuesta inflamatoria que comprende:

35 una cantidad eficaz de un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I; y  
un vehículo farmacéuticamente aceptable;  
40 en la que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble inhibe una respuesta inflamatoria.

59. Un procedimiento para inhibir una respuesta inmune en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno, comprendiendo el procedimiento:

45 (a) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno presente en el mamífero;  
(b) administrar una composición que comprende un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble en un vehículo farmacéuticamente aceptable;  
(c) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno en el mamífero; y  
50 (d) comparar el nivel de antígeno o patógeno en la etapa (a) o el nivel de antígeno o patógeno en la etapa (c), en el que un cambio en el nivel es indicativo de la inhibición de una respuesta inmune.

60. El procedimiento de la cláusula 59 que además comprende:

55 (e) volver a administrar una composición que comprende un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico en un vehículo farmacéuticamente aceptable;  
(f) determinar directa o indirectamente el nivel de antígeno o patógeno en el mamífero; y  
(g) comparar el número de antígenos o el nivel de patógenos en la etapa (a) con el nivel de antígeno en la etapa (f), en el que un cambio en el nivel es indicativo de la inhibición de una respuesta inmune.

60 61. Un procedimiento para reducir células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas en un mamífero, comprendiendo el procedimiento:

65 cultivar células de médula ósea o de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad eficaz de un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico para producir una disminución en el número de células linfoides en las células de médula ósea o de sangre periférica en comparación con células de médula ósea o de sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor de citocinas multimérico o heterodimérico.

62. El procedimiento de la cláusula 61, en el que las células hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides.
- 5 63. El procedimiento de la cláusula 62, en el que las células linfoides son células monocíticas, macrófagos o linfocitos T.
64. Un procedimiento para detectar la presencia de un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico en una muestra biológica que comprende las etapas de:
- 10 (a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, de la cláusula 50, en el que la puesta en contacto se desarrolla en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la muestra biológica, y  
(b) detectar cualquiera del anticuerpo unido o del fragmento de anticuerpo unido.
- 15 65. Un procedimiento para eliminar células cancerosas que comprende,  
obtener *ex vivo* una muestra de tejido o biológica que contiene células cancerosas de un paciente, o identificar células cancerosas *in vivo*;  
producir un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico mediante el procedimiento de la cláusula 52;  
20 formular el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico en un vehículo farmacéuticamente aceptable; y administrar al paciente o exponer a las células cancerosas a la formulación de receptor de citocinas multimérico o heterodimérico;  
en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico elimina a las células.
- 25 66. Un procedimiento para eliminar células cancerosas de la cláusula 65, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se conjuga además a una toxina.
67. El anticuerpo de la cláusula 50, en el que el anticuerpo es del grupo de: (a) anticuerpo monoclonal, (b) anticuerpo monoclonal murino, (c) anticuerpo humanizado derivado de (b), (d) un fragmento de anticuerpo y (e) anticuerpo monoclonal humano.
- 30 68. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I.
- 35 69. El anticuerpo de la cláusula 50, en el que el anticuerpo comprende además un radionúclido, una enzima, un sustrato, un cofactor, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, una marca peptídica, una partícula magnética, un fármaco o una toxina.
- 40 70. Un procedimiento para inhibir la proliferación o diferenciación inducida por zcytor17lig de células hematopoyéticas y de células progenitoras hematopoyéticas que comprende cultivar células de médula ósea o de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocinas de clase I, suficiente para reducir la proliferación o  
45 diferenciación de las células hematopoyéticas en la médula ósea o de las células de sangre periférica en comparación con células de médula ósea o de sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble.
71. El procedimiento de la cláusula 70, en el que las células hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides.
- 50 72. El procedimiento de la cláusula 71, en el que las células linfoides son macrófagos o linfocitos T.
73. Un procedimiento para reducir la inflamación inducida por zcytor17lig que comprende administrar a un mamífero con inflamación una cantidad de una composición que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I suficiente para reducir la inflamación.
- 55 74. Un procedimiento para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación que comprende:
- 60 (1) determinar un nivel de una molécula inflamatoria;  
(2) administrar una composición que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I en un vehículo farmacéuticamente aceptable;  
65 (3) determinar un nivel después de la administración de la molécula inflamatoria;  
(4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la

etapa (3), en el que una ausencia de aumento o una disminución en el nivel de la molécula inflamatoria es indicativo de la supresión de una respuesta inflamatoria.

5 75. El anticuerpo de la cláusula 68, en el que el anticuerpo comprende además un radionúclido, una enzima, un sustrato, un cofactor, un marcador fluorescente, un marcador bioluminiscente, un marcador peptídico, una partícula magnética, un fármaco o una toxina.

10 76. Un procedimiento para inhibir la proliferación o diferenciación de células hematopoyéticas y de células progenitoras hematopoyéticas inducida por zcytor17lig que comprende cultivar células de médula ósea o de sangre periférica con una composición que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 11 y un dominio de unión a citocina de un receptor de citocinas de clase I en un vehículo farmacéuticamente aceptable suficiente para reducir la proliferación o diferenciación de las células hematopoyéticas de médula ósea o células de sangre periférica en comparación con células de médula ósea o de sangre periférica cultivadas en ausencia de receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble.

15 77. El procedimiento de la cláusula 76, en el que las células hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides.

20 78. El procedimiento de la cláusula 77, en el que las células linfoides son macrófagos o linfocitos T.

79. Un procedimiento para reducir la inflamación inducida por zcytor17lig que comprende administrar a un mamífero con inflamación una cantidad de una composición que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I en un vehículo farmacéuticamente aceptable suficiente para reducir la inflamación.

25 80. Un procedimiento para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación que comprende:

- 30 (1) determinar un nivel de una molécula inflamatoria;  
(2) administrar una composición que comprende un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 en un vehículo farmacéuticamente aceptable;  
(3) determinar un nivel post-administración de la molécula inflamatoria;  
(4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (3), y en el que una ausencia de aumento o una disminución en el nivel de la molécula inflamatoria es indicativo de la supresión de una respuesta inflamatoria.

81. Un procedimiento para tratar a un mamífero afectado con una enfermedad inflamatoria en la que está implicado zcytor17lig, que comprende:

40 administrar un antagonista de zcytor17lig al mamífero, de tal forma que se reduzca la inflamación, en el que el antagonista es un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico que comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a citocinas de un receptor de citocinas de clase I en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 82. Un procedimiento de la cláusula 81, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica.

83. Un método de la cláusula 82, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica del grupo de:

- 50 (a) enfermedad inflamatoria del intestino;  
(b) colitis ulcerosa;  
(c) enfermedad de Crohn;  
(d) dermatitis atópica;  
(e) ec  
(f) psoriasis.

55 84. Un procedimiento de la cláusula 81, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda.

85. Un procedimiento de la cláusula 84, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda del grupo de:

- 60 (a) endotoxemia;  
(b) septicemia;  
(c) síndrome del choque tóxico; y  
(d) enfermedad infecciosa.

65 86. Un procedimiento de la cláusula 81, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico comprende

además un radionúclido, una enzima, un sustrato, un cofactor, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador peptídico, una partícula magnética, un fármaco o una toxina.

87. Un procedimiento para detectar la inflamación en un paciente, que comprende:

- 5           obtener una muestra tisular o biológica de un paciente;  
incubar la muestra tisular o biológica con un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble que  
comprende del resto de aminoácido 20 al resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y un dominio de unión a  
citocinas de un receptor de citocinas de clase I en condiciones en las que el receptor de citocinas multimérico o  
10           heterodimérico se une a su polipéptido complementario en la muestra tisular o biológica;  
visualizar el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble unido en la muestra tisular o biológica; y  
comparar los niveles de receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble en una muestra tisular o  
biológica del paciente con una muestra tisular o biológica normal de control,  
15           en el que un aumento en el nivel de receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble unido a la  
muestra tisular o biológica del paciente en relación a la muestra tisular o biológica normal de control es indicativo  
de inflamación en el paciente.

88. Un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico soluble que comprende del resto de aminoácido 20 al  
20           resto de aminoácido 227 de SEC ID N°: 111 y del resto de aminoácido 28 al resto de aminoácido 429 de SEC ID N°:  
7.



LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Zymogenetics, Inc
- 5 <120> MULTÍMEROS ZCYTOR17 RECEPTORES DE CITOCINAS
- <130> P26814EP-D1-PCT
- <140> EP 03761891.5
- 10 <141> 21-01-2003
- <150> US 60/435.361
- <151> 19-12-2002
- 15 <150> US 60/389.108
- <151> 14-06-2002
- <150> US 60/350.325
- <151> 18-01-2002
- 20 <160> 183
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 25 <210> 1
- <211> 904
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 30 <220>
- <221> CDS
- <222> (28)...(519)
- <400> 1
- 35

```

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

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

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

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

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

agc cct gac gcc cag ccg cca aac aac atc cac agc cca gcc atc cgg 294

```

```

Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg
 75                               80                               85

gca tat ctc aag aca atc aga cag cta gac aac aaa tct gtt att gat 342
Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp
 90                               95                               100

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

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

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

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

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

```

<210> 2  
 <211> 164  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

10  
 <210> 3  
 <211> 492  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> polinucleótido degenerado zcytor17lig humano de la SEC ID Nº: 2

<221> misc\_feature

<222> (1)...(492)

5 <223> n = A,T,C o G

<400> 3

```

atggcnwsnc aywsnggncc nwsnacnwsn gtnytnttyy tnttytgytg yytngngngn 60
tggytngcnw sncaayacny t nccngtnmgn ytnytngnc cnwsngayga ygtncaraar 120
athgtngarg arytncarws nytnwsnaar atgytnytna argaygtnga rgargaraar 180
ggngtnytng tnwsncaraa ytayacnytn ccentgyytnw snccngaygc ncarccnccn 240
aayaayathc aywsnccngc nathmgngcn tayytnaara cnathmgnc rytngayaay 300
aarwsngtna thgaygarat hathgarca y tngayaary tnathttyca rgaygcncn 360
garacnaaya thwsngtnc nacngaya cn caygartgya armgnttyat hytnacnath 420
wsncarcart tywsngartg yatggayytn gcnytnaarw snytnacnws ngngncncar 480
cargnacna cn 492
    
```

10

<210> 4

<211> 2903

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<220>

<221> CDS

<222> (497)...(2482)

20

<400> 4

```

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

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

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

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

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

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

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

335	340	345	
gtt gct gag gac cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac			1588
Val Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp			
350	355	360	
gtg aac act tgg atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc			1636
Val Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro			
365	370	375	380
acc acc ctt tcc tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc			1684
Thr Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile			
	385	390	395
cag caa gat aaa tta aaa cct ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat			1732
Gln Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr			
	400	405	410
cca atg ttg cat gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat			1780
Pro Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr			
	415	420	425
gcc aaa gaa ggc gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac			1828
Ala Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn			
	430	435	440
att ggc gtg aag acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt			1876
Ile Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser			
	445	450	455
gag aga aag ggt atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa			1924
Glu Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu			
	465	470	475
ggt gga aaa gga ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac			1972
Gly Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr			
	480	485	490
ggc ctg gag tcc ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg			2020
Gly Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met			
	495	500	505
gcc agc acc agt gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag			2068
Ala Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys			
	510	515	520
aca ttg tca ttc agt gtc ttt gag att atc ctc ata act tct ctg att			2116
Thr Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile			
	525	530	535
ggt gga ggc ctt ctt att ctc att atc ctg aca gtg gca tat ggt ctc			2164
Gly Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu			
	545	550	555
aaa aaa ccc aac aaa ttg act cat ctg tgt tgg ccc acc gtt ccc aac			2212
Lys Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn			
	560	565	570
cct gct gaa agt agt ata gcc aca tgg cat gga gat gat ttc aag gat			2260
Pro Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp			
	575	580	585
aag cta aac ctg aag gag tct gat gac tct gtg aac aca gaa gac agg			2308

```

Lys Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg
590                               595                               600

atc tta aaa cca tgt tcc acc ccc agt gac aag ttg gtg att gac aag 2356
Ile Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys
605                               610                               615                               620

ttg gtg gtg aac ttt ggg aat gtt ctg caa gaa att ttc aca gat gaa 2404
Leu Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu
625                               630

gcc aga acg ggt cag gaa aac aat tta gga ggg gaa aag aat ggg act 2452
Ala Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr
640                               645                               650

aga att ctg tct tcc tgc cca act tca ata taagtgtgga ctaaaatgcg 2502
Arg Ile Leu Ser Ser Cys Pro Thr Ser Ile
655                               660

agaaagggtgt cctgtggtct atgcaaatta gaaaggacat gcagagtttt ccaactagga 2562
agactgaatc tgtggcccca agagaaccat ctctgaagac tgggtatgtg gtcttttcca 2622
cacatggacc acctacggat gcaatctgta atgcatgtgc atgagaagtc tgttattaag 2682
tagagtgtga aaacatggtt atggtaatag gaacagcttt taaaatgctt ttgtatttgg 2742
gcctttcata caaaaaagcc ataataccat tttcatgtaa tgctatactt ctatactatt 2802
ttcatgtaat actatacttc tatactattt tcatgtaata ctatacttct atactatttt 2862
catgtaatac tatacttcta tattaaagtt ttaccctac a 2903

```

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

<400> 5

```

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

```

10

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

<210> 6  
 <211> 4171  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (368)...(3304)

<400> 6

```

gggcgcgctc tgcacgtccg ccccgagacc cgcacccgcg ccccacgcgc cgccgaggac 60
tcggcccggc tcgtggagcc cttegccegc ggcgtgagta cccccgacc gcccgcccc 120
gctctgctcg cgcctgcccg ctgcgcgccc ctcggtggct tttccgacgg gcgagcccgc 180
tgctgtgctg gaaagaatcc gacaacttcg cagcccattc cggctggacg cgaccgggag 240
tgcagcagcc cgttccccctc ctcggtgccc cctctgcccc gcgtttgctt ggctgggcta 300
ccacctgcgc tcggacggcg ctcgagggtt cctcgcccc gccctgccta cctgaaaacc 360
agaactg atg gct cta ttt gca gtc ttt cag aca aca ttc ttc tta aca 409
      Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu Thr
          1             5             10

ttg ctg tcc ttg agg act tac cag agt gaa gtc ttg gct gaa cgt tta 457
Leu Leu Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg Leu
  15             20             25             30

cca ttg act cct gta tca ctt aaa gtt tcc acc aat tct acg cgt cag 505
Pro Leu Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg Gln
          35             40             45

agt ttg cac tta caa tgg act gtc cac aac ctt cct tat cat cag gaa 553
Ser Leu His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln Glu
          50             55             60

ttg aaa atg gta ttt cag atc cag atc agt agg att gaa aca tcc aat 601
Leu Lys Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser Asn
          65             70             75

gtc atc tgg gtg ggg aat tac agc acc act gtg aag tgg aac cag gtt 649
Val Ile Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln Val
          80             85             90

ctg cat tgg agc tgg gaa tct gag ctg cct ttg gaa tgt gcc aca cac 697
Leu His Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr His
          95             100             105             110

ttt gta aga ata aag agt ttg gtg gac gat gcc aag ttc cct gag cca 745
Phe Val Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu Pro
          115             120             125

aat ttc tgg agc aac tgg agt tcc tgg gag gaa gtc agt gta caa gat 793
Asn Phe Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln Asp
          130             135             140

tct act gga cag gat ata ttg ttc gtt ttc cct aaa gat aag ctg gtg 841
Ser Thr Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu Val
          145             150             155

gaa gaa ggc acc aat gtt acc att tgt tac gtt tct agg aac att caa 889
Glu Glu Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile Gln
          160             165             170

aat aat gta tcc tgt tat ttg gaa ggg aaa cag att cat gga gaa caa 937
Asn Asn Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu Gln
          175             180             185             190

ctt gat cca cat gta act gca ttc aac ttg aat agt gtg cct ttc att 985
Leu Asp Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe Ile
          195             200             205

agg aat aaa ggg aca aat atc tat tgt gag gca agt caa gga aat gtc 1033
Arg Asn Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn Val

```



				210					215					220				
agt	gaa	ggc	atg	aaa	ggc	atc	ggt	ctt	ttt	gtc	tca	aaa	gta	ctt	gag			1081
Ser	Glu	Gly	Met	Lys	Gly	Ile	Val	Leu	Phe	Val	Ser	Lys	Val	Leu	Glu			
		225					230					235						
gag	ccc	aag	gac	ttt	tct	tgt	gaa	acc	gag	gac	ttc	aag	act	ttg	cac			1129
Glu	Pro	Lys	Asp	Phe	Ser	Cys	Glu	Thr	Glu	Asp	Phe	Lys	Thr	Leu	His			
	240					245					250							
tgt	act	tgg	gat	cct	ggg	acg	gac	act	gcc	ttg	ggg	tgg	tct	aaa	caa			1177
Cys	Thr	Trp	Asp	Pro	Gly	Thr	Asp	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Ser	Lys	Gln			
255					260					265					270			
cct	tcc	caa	agc	tac	act	tta	ttt	gaa	tca	ttt	tct	ggg	gaa	aag	aaa			1225
Pro	Ser	Gln	Ser	Tyr	Thr	Leu	Phe	Glu	Ser	Phe	Ser	Gly	Glu	Lys	Lys			
				275					280					285				
ctt	tgt	aca	cac	aaa	aac	tgg	tgt	aat	tgg	caa	ata	act	caa	gac	tca			1273
Leu	Cys	Thr	His	Lys	Asn	Trp	Cys	Asn	Trp	Gln	Ile	Thr	Gln	Asp	Ser			
			290					295					300					
caa	gaa	acc	tat	aac	ttc	aca	ctc	ata	gct	gaa	aat	tac	tta	agg	aag			1321
Gln	Glu	Thr	Tyr	Asn	Phe	Thr	Leu	Ile	Ala	Glu	Asn	Tyr	Leu	Arg	Lys			
		305					310					315						
aga	agt	gtc	aat	atc	ctt	ttt	aac	ctg	act	cat	cga	ggt	tat	tta	atg			1369
Arg	Ser	Val	Asn	Ile	Leu	Phe	Asn	Leu	Thr	His	Arg	Val	Tyr	Leu	Met			
	320					325					330							
aat	cct	ttt	agt	gtc	aac	ttt	gaa	aat	gta	aat	gcc	aca	aat	gcc	atc			1417
Asn	Pro	Phe	Ser	Val	Asn	Phe	Glu	Asn	Val	Asn	Ala	Thr	Asn	Ala	Ile			
335					340					345					350			
atg	acc	tgg	aag	gtg	cac	tcc	ata	agg	aat	aat	ttc	aca	tat	ttg	tgt			1465
Met	Thr	Trp	Lys	Val	His	Ser	Ile	Arg	Asn	Asn	Phe	Thr	Tyr	Leu	Cys			
				355					360					365				
cag	att	gaa	ctc	cat	ggt	gaa	gga	aaa	atg	atg	caa	tac	aat	ggt	tcc			1513
Gln	Ile	Glu	Leu	His	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Met	Gln	Tyr	Asn	Val	Ser			
			370					375					380					
atc	aag	gtg	aac	ggt	gag	tac	ttc	tta	agt	gaa	ctg	gaa	cct	gcc	aca			1561
Ile	Lys	Val	Asn	Gly	Glu	Tyr	Phe	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr			
		385					390					395						
gag	tac	atg	gcg	cga	gta	cgg	tgt	gct	gat	gcc	agc	cac	ttc	tgg	aaa			1609
Glu	Tyr	Met	Ala	Arg	Val	Arg	Cys	Ala	Asp	Ala	Ser	His	Phe	Trp	Lys			
	400					405					410							
tgg	agt	gaa	tgg	agt	ggt	cag	aac	ttc	acc	aca	ctt	gaa	gct	gct	ccc			1657
Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Gly	Gln	Asn	Phe	Thr	Thr	Leu	Glu	Ala	Ala	Pro			
415					420					425					430			
tca	gag	gcc	cct	gat	gtc	tgg	aga	att	gtg	agc	ttg	gag	cca	gga	aat			1705
Ser	Glu	Ala	Pro	Asp	Val	Trp	Arg	Ile	Val	Ser	Leu	Glu	Pro	Gly	Asn			
				435					440					445				
cat	act	gtg	acc	tta	ttc	tgg	aag	cca	tta	tca	aaa	ctg	cat	gcc	aat			1753
His	Thr	Val	Thr	Leu	Phe	Trp	Lys	Pro	Leu	Ser	Lys	Leu	His	Ala	Asn			
			450					455					460					
gga	aag	atc	ctg	ttc	tat	aat	gta	ggt	gta	gaa	aac	cta	gac	aaa	cca			1801

Gly	Lys	Ile	Leu	Phe	Tyr	Asn	Val	Val	Val	Glu	Asn	Leu	Asp	Lys	Pro	
		465					470					475				
tcc	agt	tca	gag	ctc	cat	tcc	att	cca	gca	cca	gcc	aac	agc	aca	aaa	1849
Ser	Ser	Ser	Glu	Leu	His	Ser	Ile	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn	Ser	Thr	Lys	
	480					485					490					
cta	atc	ctt	gac	agg	tgt	tcc	tac	caa	atc	tgc	gtc	ata	gcc	aac	aac	1897
Leu	Ile	Leu	Asp	Arg	Cys	Ser	Tyr	Gln	Ile	Cys	Val	Ile	Ala	Asn	Asn	
495					500					505					510	
agt	gtg	ggg	gct	tct	cct	gct	tct	gta	ata	gtc	atc	tct	gca	gac	ccc	1945
Ser	Val	Gly	Ala	Ser	Pro	Ala	Ser	Val	Ile	Val	Ile	Ser	Ala	Asp	Pro	
				515				520						525		
gaa	aac	aaa	gag	ggt	gag	gaa	gaa	aga	att	gca	ggc	aca	gag	ggg	gga	1993
Glu	Asn	Lys	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Arg	Ile	Ala	Gly	Thr	Glu	Gly	Gly	
			530					535					540			
ttc	tct	ctg	tct	tgg	aaa	ccc	caa	cct	gga	gat	ggt	ata	ggc	tat	ggt	2041
Phe	Ser	Leu	Ser	Trp	Lys	Pro	Gln	Pro	Gly	Asp	Val	Ile	Gly	Tyr	Val	
		545					550					555				
gtg	gac	tgg	tgt	gac	cat	acc	cag	gat	gtg	ctc	ggt	gat	ttc	cag	tgg	2089
Val	Asp	Trp	Cys	Asp	His	Thr	Gln	Asp	Val	Leu	Gly	Asp	Phe	Gln	Trp	
	560					565					570					
aag	aat	gta	ggt	ccc	aat	acc	aca	agc	aca	gtc	att	agc	aca	gat	gct	2137
Lys	Asn	Val	Gly	Pro	Asn	Thr	Thr	Ser	Thr	Val	Ile	Ser	Thr	Asp	Ala	
575					580					585					590	
ttt	agg	cca	gga	ggt	cga	tat	gac	ttc	aga	att	tat	ggg	tta	tct	aca	2185
Phe	Arg	Pro	Gly	Val	Arg	Tyr	Asp	Phe	Arg	Ile	Tyr	Gly	Leu	Ser	Thr	
				595					600					605		
aaa	agg	att	gct	tgt	tta	tta	gag	aaa	aaa	aca	gga	tac	tct	cag	gaa	2233
Lys	Arg	Ile	Ala	Cys	Leu	Leu	Glu	Lys	Lys	Thr	Gly	Tyr	Ser	Gln	Glu	
			610					615					620			
ctt	gct	cct	tca	gac	aac	cct	cac	gtg	ctg	gtg	gat	aca	ttg	aca	tcc	2281
Leu	Ala	Pro	Ser	Asp	Asn	Pro	His	Val	Leu	Val	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	
		625					630					635				
cac	tcc	ttc	act	ctg	agt	tgg	aaa	gat	tac	tct	act	gaa	tct	caa	cct	2329
His	Ser	Phe	Thr	Leu	Ser	Trp	Lys	Asp	Tyr	Ser	Thr	Glu	Ser	Gln	Pro	
	640					645					650					
ggt	ttt	ata	caa	ggg	tac	cat	gtc	tat	ctg	aaa	tcc	aag	gcg	agg	cag	2377
Gly	Phe	Ile	Gln	Gly	Tyr	His	Val	Tyr	Leu	Lys	Ser	Lys	Ala	Arg	Gln	
655					660					665					670	
tgc	cac	cca	cga	ttt	gaa	aag	gca	ggt	ctt	tca	gat	ggt	tca	gaa	tgt	2425
Cys	His	Pro	Arg	Phe	Glu	Lys	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Gly	Ser	Glu	Cys	
				675					680					685		
tgc	aaa	tac	aaa	att	gac	aac	ccg	gaa	gaa	aag	gca	ttg	att	gtg	gac	2473
Cys	Lys	Tyr	Lys	Ile	Asp	Asn	Pro	Glu	Glu	Lys	Ala	Leu	Ile	Val	Asp	
			690					695					700			
aac	cta	aag	cca	gaa	tcc	ttc	tat	gag	ttt	ttc	atc	act	cca	ttc	act	2521
Asn	Leu	Lys	Pro	Glu	Ser	Phe	Tyr	Glu	Phe	Phe	Ile	Thr	Pro	Phe	Thr	
		705					710					715				

agt gct ggt gaa ggc ccc agt gct acg ttc acg aag gtc acg act ccg	2569
Ser Ala Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro	
720 725 730	
gat gaa cac tcc tcg atg ctg att cat atc cta ctg ccc atg gtt ttc	2617
Asp Glu His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val Phe	
735 740 745 750	
tgc gtc ttg ctc atc atg gtc atg tgc tac ttg aaa agt cag tgg atc	2665
Cys Val Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Ile	
755 760 765	
aag gag acc tgt tat cct gac atc cct gac cct tac aag agc agc atc	2713
Lys Glu Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser Ile	
770 775 780	
ctg tca tta ata aaa ttc aag gag aac cct cac cta ata ata atg aat	2761
Leu Ser Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met Asn	
785 790 795	
gtc agt gac tgt atc cca gat gct att gaa gtt gta agc aag cca gaa	2809
Val Ser Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro Glu	
800 805 810	
ggg aca aag ata cag ttc cta ggc act agg aag tca ctc aca gaa acc	2857
Gly Thr Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu Thr	
815 820 825 830	
gag ttg act aag cct aac tac ctt tat ctc ctt cca aca gaa aag aat	2905
Glu Leu Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys Asn	
835 840 845	
cac tct ggc cct ggc ccc tgc atc tgt ttt gag aac ttg acc tat aac	2953
His Ser Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr Asn	
850 855 860	
cag gca gct tct gac tct ggc tct tgt ggc cat gtt cca gta tcc cca	3001
Gln Ala Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser Pro	
865 870 875	
aaa gcc cca agt atg ctg gga cta atg acc tca cct gaa aat gta cta	3049
Lys Ala Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val Leu	
880 885 890	
aag gca cta gaa aaa aac tac atg aac tcc ctg gga gaa atc cca gct	3097
Lys Ala Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro Ala	
895 900 905 910	
gga gaa aca agt ttg aat tat gtg tcc cag ttg gct tca ccc atg ttt	3145
Gly Glu Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met Phe	
915 920 925	
gga gac aag gac agt ctc cca aca aac cca gta gag gca cca cac tgt	3193
Gly Asp Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His Cys	
930 935 940	
tca gag tat aaa atg caa atg gca gtc tcc ctg cgt ctt gcc ttg cct	3241
Ser Glu Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu Pro	
945 950 955	
ccc ccg acc gag aat agc agc ctc tcc tca att acc ctt tta gat cca	3289
Pro Pro Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp Pro	
960 965 970	

ggt gaa cac tac tgc taaccagcat gccgatttca taccttatgc tacacagaca 3344  
 Gly Glu His Tyr Cys  
 975

ttaagaagag cagagctggc accctgtcat caccagtggc cttggctcett aatcccagta 3404  
 caatttgcag gtctgggttta tataagacca ctacagtctg gctagggttaa aggccagagg 3464  
 ctatggaact taacactccc cattggagca agcttgcctt agagacggca ggatcatggg 3524  
 agcatgctta ccttctgctg tttgttccag gtcaccttt agaacaggag acttgagctt 3584  
 gacctaagga tatgcattaa ccaactctaca gactcccact cagtactgta caggggtggct 3644  
 gtggctctag aagttcagtt tttactgagg aaatatttcc attaacagca attattatat 3704  
 tgaaggttt aataaaggcc acaggagaca ttactatagc atagattgtc aaatgtaaat 3764  
 ttactgagcg tgttttataa aaaactcaca ggtggttgag gccaaaacag attttagact 3824  
 taccttgaac ggataagaat ctatagttca ctgacacagt aaaattaact ctgtgggtgg 3884  
 gggcgggggg catagctcta atctaataa taaaatgtgt gatgaatcaa caagatttcc 3944  
 acaattcttc tgtcaagctt actacagtga aagaatggga ttggcaagta acttctgact 4004  
 tactgtcagt tgtacttctg ctccatagac atcagtatc tgccatcatt tttgatgact 4064  
 acctcagaac ataaaaagga acgtatatca cataattcca gtcacagttt ttggttcctc 4124  
 ttttcttca agaactatat ataaatgacc tgttttcacg cggccgc 4171

<210> 7  
 <211> 979  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

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

	290				295					300					
Thr	Tyr	Asn	Phe	Thr	Leu	Ile	Ala	Glu	Asn	Tyr	Leu	Arg	Lys	Arg	Ser
305					310					315					320
Val	Asn	Ile	Leu	Phe	Asn	Leu	Thr	His	Arg	Val	Tyr	Leu	Met	Asn	Pro
				325						330					335
Phe	Ser	Val	Asn	Phe	Glu	Asn	Val	Asn	Ala	Thr	Asn	Ala	Ile	Met	Thr
			340					345					350		
Trp	Lys	Val	His	Ser	Ile	Arg	Asn	Asn	Phe	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gln	Ile
		355					360						365		
Glu	Leu	His	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Met	Gln	Tyr	Asn	Val	Ser	Ile	Lys
	370					375						380			
Val	Asn	Gly	Glu	Tyr	Phe	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Glu	Tyr
385					390					395					400
Met	Ala	Arg	Val	Arg	Cys	Ala	Asp	Ala	Ser	His	Phe	Trp	Lys	Trp	Ser
				405					410					415	
Glu	Trp	Ser	Gly	Gln	Asn	Phe	Thr	Thr	Leu	Glu	Ala	Ala	Pro	Ser	Glu
			420					425					430		
Ala	Pro	Asp	Val	Trp	Arg	Ile	Val	Ser	Leu	Glu	Pro	Gly	Asn	His	Thr
		435					440					445			
Val	Thr	Leu	Phe	Trp	Lys	Pro	Leu	Ser	Lys	Leu	His	Ala	Asn	Gly	Lys
	450					455						460			
Ile	Leu	Phe	Tyr	Asn	Val	Val	Val	Glu	Asn	Leu	Asp	Lys	Pro	Ser	Ser
465					470					475					480
Ser	Glu	Leu	His	Ser	Ile	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn	Ser	Thr	Lys	Leu	Ile
				485						490					495
Leu	Asp	Arg	Cys	Ser	Tyr	Gln	Ile	Cys	Val	Ile	Ala	Asn	Asn	Ser	Val
			500					505					510		
Gly	Ala	Ser	Pro	Ala	Ser	Val	Ile	Val	Ile	Ser	Ala	Asp	Pro	Glu	Asn
		515					520					525			
Lys	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Arg	Ile	Ala	Gly	Thr	Glu	Gly	Gly	Phe	Ser
	530					535					540				
Leu	Ser	Trp	Lys	Pro	Gln	Pro	Gly	Asp	Val	Ile	Gly	Tyr	Val	Val	Asp
545					550					555					560
Trp	Cys	Asp	His	Thr	Gln	Asp	Val	Leu	Gly	Asp	Phe	Gln	Trp	Lys	Asn
				565					570					575	
Val	Gly	Pro	Asn	Thr	Thr	Ser	Thr	Val	Ile	Ser	Thr	Asp	Ala	Phe	Arg
			580					585					590		
Pro	Gly	Val	Arg	Tyr	Asp	Phe	Arg	Ile	Tyr	Gly	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg
		595					600					605			
Ile	Ala	Cys	Leu	Leu	Glu	Lys	Lys	Thr	Gly	Tyr	Ser	Gln	Glu	Leu	Ala
	610					615					620				
Pro	Ser	Asp	Asn	Pro	His	Val	Leu	Val	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	His	Ser
625					630					635					640
Phe	Thr	Leu	Ser	Trp	Lys	Asp	Tyr	Ser	Thr	Glu	Ser	Gln	Pro	Gly	Phe
				645					650					655	
Ile	Gln	Gly	Tyr	His	Val	Tyr	Leu	Lys	Ser	Lys	Ala	Arg	Gln	Cys	His
			660					665					670		
Pro	Arg	Phe	Glu	Lys	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Gly	Ser	Glu	Cys	Cys	Lys
		675				680						685			
Tyr	Lys	Ile	Asp	Asn	Pro	Glu	Glu	Lys	Ala	Leu	Ile	Val	Asp	Asn	Leu
	690					695					700				
Lys	Pro	Glu	Ser	Phe	Tyr	Glu	Phe	Phe	Ile	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser	Ala
705					710						715				720
Gly	Glu	Gly	Pro	Ser	Ala	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Thr	Thr	Pro	Asp	Glu
				725						730				735	
His	Ser	Ser	Met	Leu	Ile	His	Ile	Leu	Leu	Pro	Met	Val	Phe	Cys	Val
			740					745					750		
Leu	Leu	Ile	Met	Val	Met	Cys	Tyr	Leu	Lys	Ser	Gln	Trp	Ile	Lys	Glu
		755					760					765			
Thr	Cys	Tyr	Pro	Asp	Ile	Pro	Asp	Pro	Tyr	Lys	Ser	Ser	Ile	Leu	Ser
	770					775						780			
Leu	Ile	Lys	Phe	Lys	Glu	Asn	Pro	His	Leu	Ile	Ile	Met	Asn	Val	Ser
785					790					795					800

Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro Glu Gly Thr  
 805 810 815  
 Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu Thr Glu Leu  
 820 825 830  
 Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys Asn His Ser  
 835 840 845  
 Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr Asn Gln Ala  
 850 855 860  
 Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser Pro Lys Ala  
 865 870 875 880  
 Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val Leu Lys Ala  
 885 890 895  
 Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro Ala Gly Glu  
 900 905 910  
 Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met Phe Gly Asp  
 915 920 925  
 Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His Cys Ser Glu  
 930 935 940  
 Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu Pro Pro Pro  
 945 950 955 960  
 Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp Pro Gly Glu  
 965 970 975  
 His Tyr Cys

<210> 8  
 <211> 2657  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (133)...(2040)

<400> 8

cggagggcggc ctgccgggggt ggttcgggctt cccggttgccg cctcggggcgc tgtaccacaga 60  
 gctcgaagag gacgagcgcg gccgcgcgga cccggcaagg ctgggcccga ctcggggctc 120  
 ccgagggacg cc atg cgg gga ggc agg gcc cct ttc tgg ctg tgg ccg 171  
 Met Arg Gly Gly Arg Gly Ala Pro Phe Trp Leu Trp Pro  
 1 5 10  
 ctg ccc aag ctg gcg ctg ctg cct ctg ttg tgg gtg ctt ttc cag cgg 219  
 Leu Pro Lys Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Trp Val Leu Phe Gln Arg  
 15 20 25  
 acg cgt ccc cag gcc agc gcc ggg cca ctg cag tgc tac gga gtt gga 267  
 Thr Arg Pro Gln Gly Ser Ala Gly Pro Leu Gln Cys Tyr Gly Val Gly  
 30 35 40 45  
 ccc ttg ggc gac ttg aac tgc tcg tgg gag cct ctt ggg gac ctg gga 315  
 Pro Leu Gly Asp Leu Asn Cys Ser Trp Glu Pro Leu Gly Asp Leu Gly  
 50 55 60  
 gcc ccc tcc gag tta cac ctc cag agc caa aag tac cgt tcc aac aaa 363  
 Ala Pro Ser Glu Leu His Leu Gln Ser Gln Lys Tyr Arg Ser Asn Lys  
 65 70 75  
 acc cag act gtg gca gtg gca gcc gga cgg agc tgg gtg gcc att cct 411  
 Thr Gln Thr Val Ala Val Ala Ala Gly Arg Ser Trp Val Ala Ile Pro  
 80 85 90  
 cgg gaa cag ctc acc atg tct gac aaa ctc ctt gtc tgg ggc act aag 459

Arg	Glu	Gln	Leu	Thr	Met	Ser	Asp	Lys	Leu	Leu	Val	Trp	Gly	Thr	Lys	
	95					100					105					
gca	ggc	cag	cct	ctc	tgg	ccc	ccc	gtc	ttc	gtg	aac	cta	gaa	acc	caa	507
Ala	Gly	Gln	Pro	Leu	Trp	Pro	Pro	Val	Phe	Val	Asn	Leu	Glu	Thr	Gln	
110					115					120					125	
atg	aag	cca	aac	gcc	ccc	cgg	ctg	ggc	cct	gac	gtg	gac	ttt	tcc	gag	555
Met	Lys	Pro	Asn	Ala	Pro	Arg	Leu	Gly	Pro	Asp	Val	Asp	Phe	Ser	Glu	
				130					135					140		
gat	gac	ccc	ctg	gag	gcc	act	gtc	cat	tgg	gcc	cca	cct	aca	tgg	cca	603
Asp	Asp	Pro	Leu	Glu	Ala	Thr	Val	His	Trp	Ala	Pro	Pro	Thr	Trp	Pro	
			145					150					155			
tct	cat	aaa	ggt	ctg	atc	tgc	cag	ttc	cac	tac	cga	aga	tgt	cag	gag	651
Ser	His	Lys	Val	Leu	Ile	Cys	Gln	Phe	His	Tyr	Arg	Arg	Cys	Gln	Glu	
		160					165					170				
gcg	gcc	tgg	acc	ctg	ctg	gaa	ccg	gag	ctg	aag	acc	ata	ccc	ctg	acc	699
Ala	Ala	Trp	Thr	Leu	Leu	Glu	Pro	Glu	Leu	Lys	Thr	Ile	Pro	Leu	Thr	
	175					180					185					
cct	ggt	gag	atc	caa	gat	ttg	gag	cta	gcc	act	ggc	tac	aaa	gtg	tat	747
Pro	Val	Glu	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Leu	Ala	Thr	Gly	Tyr	Lys	Val	Tyr	
190					195					200				205		
ggc	cgc	tgc	cgg	atg	gag	aaa	gaa	gag	gat	ttg	tgg	ggc	gag	tgg	agc	795
Gly	Arg	Cys	Arg	Met	Glu	Lys	Glu	Glu	Asp	Leu	Trp	Gly	Glu	Trp	Ser	
				210					215					220		
ccc	att	ttg	tcc	ttc	cag	aca	ccg	cct	tct	gct	cca	aaa	gat	gtg	tgg	843
Pro	Ile	Leu	Ser	Phe	Gln	Thr	Pro	Pro	Ser	Ala	Pro	Lys	Asp	Val	Trp	
			225					230					235			
gta	tca	ggg	aac	ctc	tgt	ggg	acg	cct	gga	gga	gag	gaa	cct	ttg	ctt	891
Val	Ser	Gly	Asn	Leu	Cys	Gly	Thr	Pro	Gly	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	Leu	
		240					245					250				
cta	tgg	aag	gcc	cca	ggg	ccc	tgt	gtg	cag	gtg	agc	tac	aaa	gtc	tgg	939
Leu	Trp	Lys	Ala	Pro	Gly	Pro	Cys	Val	Gln	Val	Ser	Tyr	Lys	Val	Trp	
	255					260					265					
ttc	tgg	ggt	gga	ggt	cgt	gag	ctg	agt	cca	gaa	gga	att	acc	tgc	tgc	987
Phe	Trp	Val	Gly	Gly	Arg	Glu	Leu	Ser	Pro	Glu	Gly	Ile	Thr	Cys	Cys	
270					275					280				285		
tgc	tcc	cta	att	ccc	agt	ggg	gcg	gag	tgg	gcc	agg	gtg	tcc	gct	gtc	1035
Cys	Ser	Leu	Ile	Pro	Ser	Gly	Ala	Glu	Trp	Ala	Arg	Val	Ser	Ala	Val	
				290					295					300		
aac	gcc	aca	agc	tgg	gag	cct	ctc	acc	aac	ctc	tct	ttg	gtc	tgc	ttg	1083
Asn	Ala	Thr	Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Thr	Asn	Leu	Ser	Leu	Val	Cys	Leu	
				305				310					315			
gat	tca	gcc	tct	gcc	ccc	cgt	agc	gtg	gca	gtc	agc	agc	atc	gct	ggg	1131
Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Arg	Ser	Val	Ala	Val	Ser	Ser	Ile	Ala	Gly	
		320					325					330				
agc	acg	gag	cta	ctg	gtg	acc	tgg	caa	ccg	ggg	cct	ggg	gaa	cca	ctg	1179
Ser	Thr	Glu	Leu	Leu	Val	Thr	Trp	Gln	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Pro	Leu	
	335					340					345					

gag	cat	gta	gtg	gac	tgg	gct	cga	gat	ggg	gac	ccc	ctg	gag	aaa	ctc	1227
Glu	His	Val	Val	Asp	Trp	Ala	Arg	Asp	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Lys	Leu	
350					355					360					365	
aac	tgg	gtc	cgg	ctt	ccc	cct	ggg	aac	ctc	agt	gct	ctg	tta	cca	ggg	1275
Asn	Trp	Val	Arg	Leu	Pro	Pro	Gly	Asn	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Pro	Gly	
				370					375						380	
aat	ttc	act	gtc	ggg	gtc	ccc	tat	cga	atc	act	gtg	acc	gca	gtc	tct	1323
Asn	Phe	Thr	Val	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Val	Ser	
			385					390					395			
gct	tca	ggc	ttg	gcc	tct	gca	tcc	tcc	gtc	tgg	ggg	ttc	agg	gag	gaa	1371
Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Trp	Gly	Phe	Arg	Glu	Glu	
		400					405					410				
tta	gca	ccc	cta	gtg	ggg	cca	acg	ctt	tgg	cga	ctc	caa	gat	gcc	cct	1419
Leu	Ala	Pro	Leu	Val	Gly	Pro	Thr	Leu	Trp	Arg	Leu	Gln	Asp	Ala	Pro	
	415					420					425					
cca	ggg	acc	ccc	gcc	ata	gcg	tgg	gga	gag	gtc	cca	agg	cac	cag	ctt	1467
Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Ile	Ala	Trp	Gly	Glu	Val	Pro	Arg	His	Gln	Leu	
430					435					440					445	
cga	ggc	cac	ctc	acc	cac	tac	acc	ttg	tgt	gca	cag	agt	gga	acc	agc	1515
Arg	Gly	His	Leu	Thr	His	Tyr	Thr	Leu	Cys	Ala	Gln	Ser	Gly	Thr	Ser	
				450					455					460		
ccc	tcc	gtc	tgc	atg	aat	gtg	agt	ggc	aac	aca	cag	agt	gtc	acc	ctg	1563
Pro	Ser	Val	Cys	Met	Asn	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Gln	Ser	Val	Thr	Leu	
			465					470					475			
cct	gac	ctt	cct	tgg	ggt	ccc	tgt	gag	ctg	tgg	gtg	aca	gca	tct	acc	1611
Pro	Asp	Leu	Pro	Trp	Gly	Pro	Cys	Glu	Leu	Trp	Val	Thr	Ala	Ser	Thr	
		480					485					490				
atc	gct	gga	cag	ggc	cct	cct	ggt	ccc	atc	ctc	cgg	ctt	cat	cta	cca	1659
Ile	Ala	Gly	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ile	Leu	Arg	Leu	His	Leu	Pro	
	495					500					505					
gat	aac	acc	ctg	agg	tgg	aaa	ggt	ctg	cca	ggc	atc	cta	ttc	ttg	tgg	1707
Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Trp	Lys	Val	Leu	Pro	Gly	Ile	Leu	Phe	Leu	Trp	
510					515					520					525	
ggc	ttg	ttc	ctg	ttg	ggg	tgt	ggc	ctg	agc	ctg	gcc	acc	tct	gga	agg	1755
Gly	Leu	Phe	Leu	Leu	Gly	Cys	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Thr	Ser	Gly	Arg	
				530					535					540		
tgc	tac	cac	cta	agg	cac	aaa	gtg	ctg	ccc	cgc	tgg	gtc	tgg	gag	aaa	1803
Cys	Tyr	His	Leu	Arg	His	Lys	Val	Leu	Pro	Arg	Trp	Val	Trp	Glu	Lys	
			545						550				555			
gtt	cct	gat	cct	gcc	aac	agc	agt	tca	ggc	cag	ccc	cac	atg	gag	caa	1851
Val	Pro	Asp	Pro	Ala	Asn	Ser	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	His	Met	Glu	Gln	
		560					565					570				
gta	cct	gag	gcc	cag	ccc	ctt	ggg	gac	ttg	ccc	atc	ctg	gaa	gtg	gag	1899
Val	Pro	Glu	Ala	Gln	Pro	Leu	Gly	Asp	Leu	Pro	Ile	Leu	Glu	Val	Glu	
		575				580					585					
gag	atg	gag	ccc	ccg	ccg	gtt	atg	gag	tcc	tcc	cag	ccc	gcc	cag	gcc	1947
Glu	Met	Glu	Pro	Pro	Pro	Val	Met	Glu	Ser	Ser	Gln	Pro	Ala	Gln	Ala	
590					595					600					605	



```

acc gcc ccg ctt gac tct ggg tat gag aag cac ttc ctg ccc aca cct 1995
Thr Ala Pro Leu Asp Ser Gly Tyr Glu Lys His Phe Leu Pro Thr Pro
          610                      615                      620

gag gag ctg ggc ctt ctg ggg ccc ccc agg cca cag gtt ctg gcc 2040
Glu Glu Leu Gly Leu Leu Gly Pro Pro Arg Pro Gln Val Leu Ala
          625                      630                      635

tgaaccacac gtctggctgg gggctgccag ccaggctaga gggatgctca tgcaggttgc 2100
accccagtcc tggattagcc ctcttgatgg atgaagacac tgaggactca gagaggctga 2160
gtcacttacc tgaggacacc cagccaggca gagctgggat tgaaggaccc ctatagagaa 2220
gggcttggcc cccatgggga agacacggat ggaaggtgga gcaaaggaaa atacatgaaa 2280
ttgagagtgg cagctgcctg ccaaaatctg ttccgctgta acagaactga atttggaccc 2340
cagcacagtg gctcacgcct gtaatcccag cactttggca ggccaagggtg gaaggatcac 2400
ttagagctag gagtttgaga ccagcctggg caatatagca agaccctca ctacaaaaat 2460
aaaacatcaa aaacaaaaac aattagctgg gcattgatgg acacacctgt agtccgagcc 2520
acttgggagg ctgaggtggg aggatcgggt gagcccagga gttcgaagct gcagggacct 2580
ctgattgcac cactgcactc caggctgggt aacagaatga gaccttatct caaaaataaa 2640
caaactaata aaaagca                                     2657
    
```

<210> 9  
 <211> 636  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 9

```

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

Ile Pro Ser Gly Ala Glu Trp Ala Arg Val Ser Ala Val Asn Ala Thr  
 290 295 300  
 Ser Trp Glu Pro Leu Thr Asn Leu Ser Leu Val Cys Leu Asp Ser Ala  
 305 310 315 320  
 Ser Ala Pro Arg Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Ala Gly Ser Thr Glu  
 325 330 335  
 Leu Leu Val Thr Trp Gln Pro Gly Pro Gly Glu Pro Leu Glu His Val  
 340 345 350  
 Val Asp Trp Ala Arg Asp Gly Asp Pro Leu Glu Lys Leu Asn Trp Val  
 355 360 365  
 Arg Leu Pro Pro Gly Asn Leu Ser Ala Leu Leu Pro Gly Asn Phe Thr  
 370 375 380  
 Val Gly Val Pro Tyr Arg Ile Thr Val Thr Ala Val Ser Ala Ser Gly  
 385 390 395 400  
 Leu Ala Ser Ala Ser Ser Val Trp Gly Phe Arg Glu Glu Leu Ala Pro  
 405 410 415  
 Leu Val Gly Pro Thr Leu Trp Arg Leu Gln Asp Ala Pro Pro Gly Thr  
 420 425 430  
 Pro Ala Ile Ala Trp Gly Glu Val Pro Arg His Gln Leu Arg Gly His  
 435 440 445  
 Leu Thr His Tyr Thr Leu Cys Ala Gln Ser Gly Thr Ser Pro Ser Val  
 450 455 460  
 Cys Met Asn Val Ser Gly Asn Thr Gln Ser Val Thr Leu Pro Asp Leu  
 465 470 475 480  
 Pro Trp Gly Pro Cys Glu Leu Trp Val Thr Ala Ser Thr Ile Ala Gly  
 485 490 495  
 Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ile Leu Arg Leu His Leu Pro Asp Asn Thr  
 500 505 510  
 Leu Arg Trp Lys Val Leu Pro Gly Ile Leu Phe Leu Trp Gly Leu Phe  
 515 520 525  
 Leu Leu Gly Cys Gly Leu Ser Leu Ala Thr Ser Gly Arg Cys Tyr His  
 530 535 540  
 Leu Arg His Lys Val Leu Pro Arg Trp Val Trp Glu Lys Val Pro Asp  
 545 550 555 560  
 Pro Ala Asn Ser Ser Ser Gly Gln Pro His Met Glu Gln Val Pro Glu  
 565 570 575  
 Ala Gln Pro Leu Gly Asp Leu Pro Ile Leu Glu Val Glu Glu Met Glu  
 580 585 590  
 Pro Pro Pro Val Met Glu Ser Ser Gln Pro Ala Gln Ala Thr Ala Pro  
 595 600 605  
 Leu Asp Ser Gly Tyr Glu Lys His Phe Leu Pro Thr Pro Glu Glu Leu  
 610 615 620  
 Gly Leu Leu Gly Pro Pro Arg Pro Gln Val Leu Ala  
 625 630 635

<210> 10  
 <211> 755  
 5 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)...(489)

<400> 10

```

atg atc ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc 48
Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys
 1 5 10 15

tgt ata gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca 96
Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro
 20 25 30

ata tcg aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag 144
Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu
 35 40 45

tct cag gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg 192
Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met
 50 55 60

tca gca gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa 240
Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu
 65 70 75 80

gca tta acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa 288
Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys
 85 90 95

gtg ttg agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta 336
Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu
 100 105 110

aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct 384
Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro
 115 120 125

gga aat act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt 432
Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val
 130 135 140

tta aag cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat 480
Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn
 145 150 155 160

act aca tgc tgagtgatgg gggggggggg ggtgcagtgt cctcagcagt 529
Thr Thr Cys

gcctgtcctt cgagggctga gcttgcaacc caggacttaa ctccaaaggg actgtgceggt 589
cattactagt catgttattt atgtttttat tttgtccact gaaatcttgt tctgctacct 649
tgtagggact ggaagtggca gctatattta tttatztatg tactgagttt gttaacgctc 709
catggaggag ccttcagagt ctatttaata aattatattg acatga 755

```

<210> 11  
 <211> 163  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 11

```

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

```

```

          115          120          125
Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val
      130          135          140
Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn
 145          150          155          160
Thr Thr Cys

```

5 <210> 12  
 <211> 489  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> polinucleótido degenerado zcytor17lig de ratón de la SEC ID N°: 11  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(489)  
 <223> n = A,T,C o G

<400> 12

```

atgathttyc ayacnggnac nacnaarccn acnytngtny tnytntgytg yathggnacln 60
tggytngcna cntgywsnytc nwsnttyggn gcncnathw snaargarga yytnmgnacn 120
acnathgayy tnytnaarca rgarwsncar gayytnaya ayaaytayws nathaarcar 180
gcnwsnggna tgwsngcnga ygarwsnath carytncnt gyttywsnyt ngaymgngar 240
gcnytnacna ayathwsngt nathathgcn cayytngara argtnaargt nytnwsngar 300
aayacngtng ayacnwsntg ggtnathmgn tggytnacna ayathwsntg yttyaayccn 360
ytnaayyna ayathwsngt nccnggnaay acngaygarw sntaygaytg yaargtntty 420
gtnytnacng tnytnaarca rttywsnaay tgyatggcng arytncargc naargayaay 480
acnacntgy

```

15 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC6673

25 <400> 13  
 gcgcaagggtg ccgttcacag c 21

30 <210> 14  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29082

<400> 14  
 caattgttg ggtttttta gcagcagtag gcccg 36

5 <210> 15  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29083

<400> 15  
 ctgggcctac tgctgctaaa aaaaccaac aaattg 36

15 <210> 16  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29145

25 <400> 16  
 gcgtctagag ggttatattg aagttggca ggaaga 36

30 <210> 17  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> etiqueta peptídica Glu-Glu (CEE) modificada con Gly-Ser  
 <400> 17

**Gly Ser Glu Tyr Met Pro Met Glu**  
**1 5**

35 <210> 18  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29359

45 <400> 18  
 gcgggatcca tgaagctctc tccccagcct tca 33

50 <210> 19  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC27899

<400> 19  
 ccagaacttt gactcctga ccg 23

60 <210> 20  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC27895  
 <400> 20  
 gaagtcaact tcgctaagaa ccg 23  
 5  
 <210> 21  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29122  
 <400> 21  
 15 ccgctcgagt tatattgaag ttgggcagga agac 34  
 <210> 22  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29180  
 25 <400> 22  
 cctggagtcc ctgaaacgaa ag 22  
 <210> 23  
 <211> 34  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29122  
 35 <400> 23  
 ccgctcgagt tatattgaag ttgggcagga agac 34  
 <210> 24  
 40 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <223> Cebador oligonucleotídico ZC9791  
 <400> 24  
 cgtccaaca aaaccagac 20  
 50 <210> 25  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC9793  
 <400> 25  
 60 tggcgtgac agcggacac 19  
 <210> 26  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC40109

<400> 26  
 ccattccagc accagccaac 20

5 <210> 27  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC40112

<400> 27  
 15 tacaacttca atagcatctg gg 22

<210> 28  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC13946

25 <400> 28  
 ccctgcagtg atcaacatgg ccaagttgac cagtgccggt 40

<210> 29  
 <211> 45  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC13945

35 <400> 29  
 gcccatggac tagtttcgaa aggtcgagtg tcagtcctgc tctc 45

<210> 30  
 <211> 34  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC18698

<400> 30  
 ttttttctc gagactttt tttttttt tttt 34

50 <210> 31

<400> 31  
 000

55 <210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223>etiqueta peptídica Glu-Glu (CEE) con el par de restos Gly-Ser  
 <400> 32

**Gly Ser Gly Gly Glu Tyr Met Pro Met Glu**

**1 5 10**

- <210> 33
- <211> 33
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador oligonucleotídico ZC29451
- 10 <400> 33
- ccggaattcc cctgatacat gaagctctct ccc 33
- <210> 34
- <211> 33
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador oligonucleotídico ZC29124
- 20 <400> 34
- cgcgatccc tcaaagacac tgaatgacaa tgt 33
- <210> 35
- <211> 6
- 25 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> etiqueta peptídica Glu-Glu (CEE) sin el par de restos Gly-Ser
- <400> 35

**Glu Tyr Met Pro Met Glu**  
**1 5**

- 35 <210> 36
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> secuencia peptídica C-terminal FLAG
- <400> 36

**Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys**  
**1 5**

- 45 <210> 37
- <211> 684
- <212> ADN
- 50 <213> Homo sapiens
- <400> 37



ES 2 546 797 T3

```

tcagacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagccgaggg ggcaccgtca 60
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 120
acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 300

```

```

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca tcctccatcg agaaaacat ctccaagcc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaa 684

```

<210> 38  
 <211> 2295

5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> polinucleótido de fusión zcytor17-Fc4 humano  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(2295)

<400> 38

ES 2 546 797 T3

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

aca gtc aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac cgt	576
Thr Val Asn Ser 180 Thr Ser Trp Met 185 Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg 190	
aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt aca	624
Lys Asp Lys Asn 195 Gln Thr Tyr Asn 200 Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr 205	
gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc tgg	672
Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp 210 215 220	
agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa gct cca	720
Ser Asp Trp Ser 225 Gln Glu Lys Met 230 Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro 235 240	
tgt ggc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag gcg gat gga	768
Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys 245 Pro Ala Glu Ala Asp Gly 250 255	
aga agg cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga gga gcc cca gtc	816
Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val 260 265 270	
cta gag aaa aca ctt ggc tac aac ata tgg tac tat cca gaa agc aac	864
Leu Glu Lys Thr 275 Leu Gly Tyr Asn 280 Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn 285	
act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag cag ctt gaa ctg	912
Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu 290 295 300	
cat ctg gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att tct tat aat tct	960
His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser 305 310 315 320	
ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca gct att caa gaa	1008
Leu Gly Lys Ser 325 Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu 330 335	
aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc gtt gct gag gac	1056
Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp 340 345 350	
cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac gtg aac act tgg	1104
Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp 355 360 365	
atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc acc acc ctt tcc	1152
Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser 370 375 380	
tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag caa gat aaa	1200
Trp Glu Ser Val Ser 385 Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys 390 395 400	
tta aaa ccc ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca atg ttg cat	1248
Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His 405 410 415	
gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc aaa gaa ggc	1296
Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly	

			420					425				430					
ggt	cca	tca	gaa	ggt	cct	gag	acc	aag	gtg	gag	aac	att	ggc	gtg	aag		1344
Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Glu	Thr	Lys	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Val	Lys		
		435				440					445						
acg	gtc	acg	atc	aca	tgg	aaa	gag	att	ccc	aag	agt	gag	aga	aag	ggt		1392
Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Glu	Arg	Lys	Gly		
	450					455					460						
atc	atc	tgc	aac	tac	acc	atc	ttt	tac	caa	gct	gaa	ggt	gga	aaa	gga		1440
Ile	Ile	Cys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Gly		
465					470					475					480		
ttc	tcc	aag	aca	gtc	aat	tcc	agc	atc	ttg	cag	tac	ggc	ctg	gag	tcc		1488
Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Tyr	Gly	Leu	Glu	Ser		
				485					490					495			
ctg	aaa	cga	aag	acc	tct	tac	att	ggt	cag	gtc	atg	gcc	agc	acc	agt		1536
Leu	Lys	Arg	Lys	Thr	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Val	Met	Ala	Ser	Thr	Ser		
			500				505						510				
gct	ggg	gga	acc	aac	ggg	acc	agc	ata	aat	ttc	aag	aca	ttg	tca	ttc		1584
Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Asn	Phe	Lys	Thr	Leu	Ser	Phe		
		515					520					525					
agt	gtc	ttt	gag	gag	ccc	aga	tct	tca	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca		1632
Ser	Val	Phe	Glu	Glu	Pro	Arg	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro		
	530					535					540						
ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	gcc	gag	ggg	gca	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc		1680
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe		
545					550					555					560		
ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc		1728
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val		
				565					570					575			
aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc		1776
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe		
			580					585					590				
aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg		1824
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro		
		595					600					605					
cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc		1872
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr		
	610					615					620						
gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc		1920
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val		
625					630					635					640		
tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	tcc	tcc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc		1968
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala		
				645					650					655			
aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg		2016
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg		
			660					665					670				
gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc		2064

```

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
      675                               680                               685

ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg 2112
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
      690                               695                               700

gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc 2160
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
      705                               710                               715

ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag 2208
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
      725                               730                               735

ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac 2256
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
      740                               745                               750

tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa 2295
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *
      755                               760

```

<210> 39

<211> 764

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido de fusión zcytor17-Fc4 humano

10

<400> 39

```

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

```

Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly  
 245 250 255  
 Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val  
 260 265 270  
 Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn  
 275 280 285  
 Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu  
 290 295 300  
 His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu  
 325 330 335  
 Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp  
 340 345 350  
 Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp  
 355 360 365  
 Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys  
 385 390 395 400  
 Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His  
 405 410 415  
 Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly  
 420 425 430  
 Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys  
 435 440 445  
 Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly  
 450 455 460  
 Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly  
 465 470 475 480  
 Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser  
 485 490 495  
 Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser  
 500 505 510  
 Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe  
 515 520 525  
 Ser Val Phe Glu Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
 530 535 540  
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 545 550 555 560  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 565 570 575  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 580 585 590  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 595 600 605  
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 610 615 620  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 625 630 635 640  
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 645 650 655  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 660 665 670  
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 675 680 685  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 690 695 700  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 705 710 715 720  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 725 730 735  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

ES 2 546 797 T3

740
745
750  
**Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys**  
755
760

5 <210> 40  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29157

<400> 40  
 ctagtatggc cggccatgaa gctctctccc cagc 34

15 <210> 41  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29150

<400> 41  
 gtctgaagat ctgggctcct caaagacact gaatgacaat g 41

25 <210> 42  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41458

<400> 42  
 tggacctcgc actaaaatca t 21

35 <210> 43  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41457

<400> 43  
 aatcacggca gagtcccac ac 22

45 <210> 44  
 <211> 100  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC12749

55 <400> 44

**gtaccttccc gtaaatecct ccccttcccg gaattacacc cgcgtatttc ccagaaaagg 60**  
**aactgtagat ttctaggaat tcaatccttg gccacgcgtc 100**

60 <210> 45  
 <211> 100

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Cebador oligonucleotídico ZC12748

<400> 45

**tcgagacgcg tggccaagga ttgaattcct agaaatctac agttcctttt ctgggaaata 60**  
**cgcggtgta attccgggaa ggggagggat ttacgggaag 100**

10  
 <210> 46  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC10651

<400> 46  
 20 agctttctg cagcagctct 20

<210> 47  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC10565

30 <400> 47  
 tttgcagaaa aggttgcaaa tgc 23

<210> 48  
 <211> 25  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC14063

40  
 <400> 48  
 caccagacat aatagctgac agact 25

<210> 49  
 45 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 50 <223> Cebador oligonucleotídico ZC17574

<400> 49  
 ggtrttgctc agcatgcaca c 21

55 <210> 50  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC17600

<400> 50



catgtaggcc atgaggtcca ccac 24

<210> 51  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC38065

10 <400> 51  
 ctttctctggg aatctgtgtc t 21

<210> 52  
 <211> 18  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Cebador oligonucleotídico ZC38068

<400> 52  
 cctccagctc tgggtgctg 18

25 <210> 53  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC37877

<400> 53  
 caaaaaaccc aacaaattga ctca 24

35 <210> 54  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC37876

<400> 54  
 45 catgtggcta tactacttc agcag 25

<210> 55  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sonda TaqMan® del receptor zcytor17

55 <400> 55  
 ctgtgtggc ccaccgtcc ca 22

<210> 56  
 <211> 20  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador directo de ARNr

65 <400> 56

cggctaccac atccaaggaa 20  
 <210> 57  
 <211> 18  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso de ARNr  
 10 <400> 57  
 gctggaatta ccgcggt 18  
 <210> 58  
 15 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> sonda TaqMan® de ARNr  
 <400> 58  
 tgctggcacc agactgccc tc 22  
 25 <210> 59  
 <400> 59  
 000  
 30 <210> 60  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41458  
 <400> 60  
 40 tggacctcgc actaaatca t 21  
 <210> 61  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41457  
 <400> 61  
 50 aatcacggca gagtccac ac 22  
 <210> 62  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41459  
 60 <400> 62  
 agaagggcgt gctcgtgc 19  
 <210> 63  
 <211> 18  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41460  
 5 <400> 63  
 ccggatggct gggctgtg 18  
 <210> 64  
 <211> 25  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC39982  
 15 <400> 64  
 aatgtctgtg tagcataagg tatga 25  
 <210> 65  
 <211> 22  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Cebador oligonucleotídico ZC39983  
 <400> 65  
 cctgcctacc tgaaaaccag aa 22  
 30 <210> 66  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC39980  
 <400> 66  
 40 ttggaattcg ccaccatggc tctatttgca gtcttt 36  
 <210> 67  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC39981  
 <400> 67  
 50 ctgtctcgag tgctggtag cagtgttc 28  
 <210> 68  
 <211> 2217  
 <212> ADN  
 55 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(2217)  
 60 <400> 68

atg gct cta ttt gca gtc ttt cag aca aca ttc ttc tta aca ttg ctg	48
Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu Thr Leu Leu	
1 5 10 15	
tcc ttg agg act tac cag agt gaa gtc ttg gct gaa cgt tta cca ttg	96
Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg Leu Pro Leu	
20 25 30	
act cct gta tca ctt aaa gtt tcc acc aat tct acg cgt cag agt ttg	144
Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg Gln Ser Leu	
35 40 45	
cac tta caa tgg act gtc cac aac ctt cct tat cat cag gaa ttg aaa	192
His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln Glu Leu Lys	
50 55 60	
atg gta ttt cag atc cag atc agt agg att gaa aca tcc aat gtc atc	240
Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser Asn Val Ile	
65 70 75 80	
tgg gtg ggg aat tac agc acc act gtg aag tgg aac cag gtt ctg cat	288
Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln Val Leu His	
85 90 95	
tgg agc tgg gaa tct gag ctc cct ttg gaa tgt gcc aca cac ttt gta	336
Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr His Phe Val	
100 105 110	
aga ata aag agt ttg gtg gac gat gcc aag ttc cct gag cca aat ttc	384
Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu Pro Asn Phe	
115 120 125	
tgg agc aac tgg agt tcc tgg gag gaa gtc agt gta caa gat tct act	432
Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln Asp Ser Thr	
130 135 140	
gga cag gat ata ttg ttc gtt ttc cct aaa gat aag ctg gtg gaa gaa	480
Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu Val Glu Glu	
145 150 155 160	
ggc acc aat gtt acc att tgt tac gtt tct agg aac att caa aat aat	528
Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile Gln Asn Asn	
165 170 175	
gta tcc tgt tat ttg gaa ggg aaa cag att cat gga gaa caa ctt gat	576
Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu Gln Leu Asp	
180 185 190	
cca cat gta act gca ttc aac ttg aat agt gtg cct ttc att agg aat	624
Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe Ile Arg Asn	
195 200 205	
aaa ggg aca aat atc tat tgt gag gca agt caa gga aat gtc agt gaa	672
Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn Val Ser Glu	
210 215 220	

ggc atg aaa ggc atc gtt ctt ttt gtc tca aaa gta ctt gag gag ccc Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro 225 230 235 240	720
aag gac ttt tct tgt gaa acc gag gac ttc aag act ttg cac tgt act Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu His Cys Thr 245 250 255	768
tgg gat cct ggg acg gac act gcc ttg ggg tgg tct aaa caa cct tcc Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys Gln Pro Ser 260 265 270	816
caa agc tac act tta ttt gaa tca ttt tct ggg gaa aag aaa ctt tgt Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys Lys Leu Cys 275 280 285	864
aca cac aaa aac tgg tgt aat tgg caa ata act caa gac tca caa gaa Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp Ser Gln Glu 290 295 300	912
acc tat aac ttc aca ctc ata gct gaa aat tac tta agg aag aga agt Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg Lys Arg Ser 305 310 315 320	960
gtc aat atc ctt ttt aac ctg act cat cga gtt tat tta atg aat cct Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu Met Asn Pro 325 330 335	1008
ttt agt gtc aac ttt gaa aat gta aat gcc aca aat gcc atc atg acc Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile Met Thr 340 345 350	1056
tgg aag gtg cac tcc ata agg aat aat ttc aca tat ttg tgt cag att Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys Gln Ile 355 360 365	1104
gaa ctc cat ggt gaa gga aaa atg atg caa tac aat gtt tcc atc aag Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val Ser Ile Lys 370 375 380	1152
gtg aac ggt gag tac ttc tta agt gaa ctg gaa cct gcc aca gag tac Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr 385 390 395 400	1200
atg gcg cga gta cgg tgt gct gat gcc agc cac ttc tgg aaa tgg agt Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys Trp Ser 405 410 415	1248
gaa tgg agt ggt cag aac ttc acc aca ctt gaa gct gct ccc tca gag Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro Ser Glu 420 425 430	1296
gcc cct gat gtc tgg aga att gtg agc ttg gag cca gga aat cat act Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn His Thr 435 440 445	1344
gtg acc tta ttc tgg aag cca tta tca aaa ctg cat gcc aat gga aag Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn Gly Lys 450 455 460	1392
atc ctg ttc tat aat gta gtt gta gaa aac cta gac aaa cca tcc agt Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro Ser Ser 465 470 475 480	1440

tca gag ctc cat tcc att cca gca cca gcc aac agc aca aaa cta atc	1488
Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile	
485 490 495	
ctt gac agg tgt tcc tac caa atc tgc gtc ata gcc aac aac agt gtg	1536
Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val	
500 505 510	
ggc gct tct cct gct tct gta ata gtc atc tct gca gac ccc gaa aac	1584
Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn	
515 520 525	
aaa gag gtt gag gaa gaa aga att gca ggc aca gag ggt gga ttc tct	1632
Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Gly Phe Ser	
530 535 540	
ctg tct tgg aaa ccc caa cct gga gat gtt ata ggc tat gtt gtg gac	1680
Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp	
545 550 555 560	
tgg tgt gac cat acc cag gat gtg ctc ggt gat ttc cag tgg aag aat	1728
Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn	
565 570 575	
gta ggt ccc aat acc aca agc aca gtc att agc aca gat gct ttt agg	1776
Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg	
580 585 590	
cca gga gtt cga tat gac ttc aga att tat ggg tta tct aca aaa agg	1824
Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg	
595 600 605	
att gct tgt tta tta gag aaa aaa aca gga tac tct cag gaa ctt gct	1872
Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala	
610 615 620	
cct tca gac aac cct cac gtg ctg gtg gat aca ttg aca tcc cac tcc	1920
Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser	
625 630 635 640	
ttc act ctg agt tgg aaa gat tac tct act gaa tct caa cct ggt ttt	1968
Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe	
645 650 655	
ata caa ggg tac cat gtc tat ctg aaa tcc aag gcg agg cag tgc cac	2016
Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His	
660 665 670	
cca cga ttt gaa aag gca gtt ctt tca gat ggt tca gaa tgt tgc aaa	2064
Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys	
675 680 685	
tac aaa att gac aac ccg gaa gaa aag gca ttg att gtg gac aac cta	2112
Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu	
690 695 700	
aag cca gaa tcc ttc tat gag ttt ttc atc act cca ttc act agt gct	2160
Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala	
705 710 715 720	
ggc gaa ggc ccc agt gct acg ttc acg aag gtc acg act ccg gat gaa	2208
Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu	

725

730

735

2217

cac tcc tcg  
His Ser Ser

<210> 69  
<211> 739  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 69

Met	Ala	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Gln	Thr	Thr	Phe	Phe	Leu	Thr	Leu	Leu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Thr	Tyr	Gln	Ser	Glu	Val	Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	Pro	Leu
			20					25					30		
Thr	Pro	Val	Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Thr	Asn	Ser	Thr	Arg	Gln	Ser	Leu
		35					40					45			
His	Leu	Gln	Trp	Thr	Val	His	Asn	Leu	Pro	Tyr	His	Gln	Glu	Leu	Lys
	50					55				60					
Met	Val	Phe	Gln	Ile	Gln	Ile	Ser	Arg	Ile	Glu	Thr	Ser	Asn	Val	Ile
65					70					75					80
Trp	Val	Gly	Asn	Tyr	Ser	Thr	Thr	Val	Lys	Trp	Asn	Gln	Val	Leu	His
			85						90					95	
Trp	Ser	Trp	Glu	Ser	Glu	Leu	Pro	Leu	Glu	Cys	Ala	Thr	His	Phe	Val
			100					105					110		
Arg	Ile	Lys	Ser	Leu	Val	Asp	Asp	Ala	Lys	Phe	Pro	Glu	Pro	Asn	Phe
		115					120					125			
Trp	Ser	Asn	Trp	Ser	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Ser	Val	Gln	Asp	Ser	Thr
	130					135					140				
Gly	Gln	Asp	Ile	Leu	Phe	Val	Phe	Pro	Lys	Asp	Lys	Leu	Val	Glu	Glu
145					150					155					160
Gly	Thr	Asn	Val	Thr	Ile	Cys	Tyr	Val	Ser	Arg	Asn	Ile	Gln	Asn	Asn
			165						170					175	
Val	Ser	Cys	Tyr	Leu	Glu	Gly	Lys	Gln	Ile	His	Gly	Glu	Gln	Leu	Asp
			180					185					190		
Pro	His	Val	Thr	Ala	Phe	Asn	Leu	Asn	Ser	Val	Pro	Phe	Ile	Arg	Asn
		195					200					205			
Lys	Gly	Thr	Asn	Ile	Tyr	Cys	Glu	Ala	Ser	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Glu
	210					215					220				
Gly	Met	Lys	Gly	Ile	Val	Leu	Phe	Val	Ser	Lys	Val	Leu	Glu	Glu	Pro
225					230					235					240
Lys	Asp	Phe	Ser	Cys	Glu	Thr	Glu	Asp	Phe	Lys	Thr	Leu	His	Cys	Thr
			245						250					255	
Trp	Asp	Pro	Gly	Thr	Asp	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Ser	Lys	Gln	Pro	Ser
			260					265					270		
Gln	Ser	Tyr	Thr	Leu	Phe	Glu	Ser	Phe	Ser	Gly	Glu	Lys	Lys	Leu	Cys
		275					280						285		
Thr	His	Lys	Asn	Trp	Cys	Asn	Trp	Gln	Ile	Thr	Gln	Asp	Ser	Gln	Glu
	290					295					300				
Thr	Tyr	Asn	Phe	Thr	Leu	Ile	Ala	Glu	Asn	Tyr	Leu	Arg	Lys	Arg	Ser
305					310					315					320
Val	Asn	Ile	Leu	Phe	Asn	Leu	Thr	His	Arg	Val	Tyr	Leu	Met	Asn	Pro
			325						330					335	
Phe	Ser	Val	Asn	Phe	Glu	Asn	Val	Asn	Ala	Thr	Asn	Ala	Ile	Met	Thr
			340					345					350		
Trp	Lys	Val	His	Ser	Ile	Arg	Asn	Asn	Phe	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gln	Ile
		355					360					365			
Glu	Leu	His	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Met	Gln	Tyr	Asn	Val	Ser	Ile	Lys
	370					375					380				
Val	Asn	Gly	Glu	Tyr	Phe	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Glu	Tyr
385					390					395					400

```

Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys Trp Ser
              405                      410                      415
Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro Ser Glu
              420                      425                      430
Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn His Thr
              435                      440                      445
Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn Gly Lys
              450                      455                      460
Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro Ser Ser
465                      470                      475                      480
Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile
              485                      490                      495
Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val
              500                      505                      510
Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn
              515                      520                      525
Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Gly Phe Ser
              530                      535                      540
Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp
545                      550                      555                      560
Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn
              565                      570                      575
Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg
              580                      585                      590
Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg
              595                      600                      605
Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala
              610                      615                      620
Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser
625                      630                      635                      640
Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe
              645                      650                      655
Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His
              660                      665                      670
Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys
              675                      680                      685
Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu
              690                      695                      700
Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala
705                      710                      715                      720
Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu
              725                      730                      735
His Ser Ser

```

<210> 70  
 <211> 1557  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)...(1557)

<400> 70

```

atg atg tgg acc tgg gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc      48
Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe
  1              5              10              15

```

```

agc ctg gca gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac      96
Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr
              20              25              30

```



tac	tat	agg	aaa	aat	tta	acc	tgc	act	tgg	agt	cca	gga	aag	gaa	acc	144
Tyr	Tyr	Arg	Lys	Asn	Leu	Thr	Cys	Thr	Trp	Ser	Pro	Gly	Lys	Glu	Thr	
		35					40					45				
agt	tat	acc	cag	tac	aca	gtt	aag	aga	act	tac	gct	ttt	gga	gaa	aaa	192
Ser	Tyr	Thr	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Arg	Thr	Tyr	Ala	Phe	Gly	Glu	Lys	
	50					55					60					
cat	gat	aat	tgt	aca	acc	aat	agt	tct	aca	agt	gaa	aat	cgt	gct	tcg	240
His	Asp	Asn	Cys	Thr	Thr	Asn	Ser	Ser	Thr	Ser	Glu	Asn	Arg	Ala	Ser	
	65				70					75					80	
tgc	tct	ttt	ttc	ctt	cca	aga	ata	acg	atc	cca	gat	aat	tat	acc	att	288
Cys	Ser	Phe	Phe	Leu	Pro	Arg	Ile	Thr	Ile	Pro	Asp	Asn	Tyr	Thr	Ile	
				85				90						95		
gag	gtg	gaa	gct	gaa	aat	gga	gat	ggt	gta	att	aaa	tct	cat	atg	aca	336
Glu	Val	Glu	Ala	Glu	Asn	Gly	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Ser	His	Met	Thr	
			100					105					110			
tac	tgg	aga	tta	gag	aac	ata	gcg	aaa	act	gaa	cca	cct	aag	att	ttc	384
Tyr	Trp	Arg	Leu	Glu	Asn	Ile	Ala	Lys	Thr	Glu	Pro	Pro	Lys	Ile	Phe	
		115				120						125				
cgt	gtg	aaa	cca	gtt	ttg	ggc	atc	aaa	cga	atg	att	caa	att	gaa	tgg	432
Arg	Val	Lys	Pro	Val	Leu	Gly	Ile	Lys	Arg	Met	Ile	Gln	Ile	Glu	Trp	
	130					135					140					
ata	aag	cct	gag	ttg	gcg	cct	gtt	tca	tct	gat	tta	aaa	tac	aca	ctt	480
Ile	Lys	Pro	Glu	Leu	Ala	Pro	Val	Ser	Ser	Asp	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	
	145				150					155					160	
cga	ttc	agg	aca	gtc	aac	agt	acc	agc	tgg	atg	gaa	gtc	aac	ttc	gct	528
Arg	Phe	Arg	Thr	Val	Asn	Ser	Thr	Ser	Trp	Met	Glu	Val	Asn	Phe	Ala	
				165					170					175		
aag	aac	cgt	aag	gat	aaa	aac	caa	acg	tac	aac	ctc	acg	ggg	ctg	cag	576
Lys	Asn	Arg	Lys	Asp	Lys	Asn	Gln	Thr	Tyr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	
			180					185					190			
cct	ttt	aca	gaa	tat	gtc	ata	gct	ctg	cga	tgt	gcg	gtc	aag	gag	tca	624
Pro	Phe	Thr	Glu	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu	Arg	Cys	Ala	Val	Lys	Glu	Ser	
		195				200						205				
aag	ttc	tgg	agt	gac	tgg	agc	caa	gaa	aaa	atg	gga	atg	act	gag	gaa	672
Lys	Phe	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Gln	Glu	Lys	Met	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	
	210					215					220					
gaa	gct	cca	tgt	ggc	ctg	gaa	ctg	tgg	aga	gtc	ctg	aaa	cca	gct	gag	720
Glu	Ala	Pro	Cys	Gly	Leu	Glu	Leu	Trp	Arg	Val	Leu	Lys	Pro	Ala	Glu	
	225				230					235					240	
gcg	gat	gga	aga	agg	cca	gtg	cgg	ttg	tta	tgg	aag	aag	gca	aga	gga	768
Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	
				245				250						255		
gcc	cca	gtc	cta	gag	aaa	aca	ctt	ggc	tac	aac	ata	tgg	tac	tat	cca	816
Ala	Pro	Val	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Trp	Tyr	Tyr	Pro	
			260					265					270			
gaa	agc	aac	act	aac	ctc	aca	gaa	aca	atg	aac	act	act	aac	cag	cag	864
Glu	Ser	Asn	Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Thr	Met	Asn	Thr	Thr	Asn	Gln	Gln	

ES 2 546 797 T3

275				280				285								
ctt	gaa	ctg	cat	ctg	gga	ggc	gag	agc	ttt	tgg	gtg	tct	atg	att	tct	912
Leu	Glu	Leu	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Ser	Phe	Trp	Val	Ser	Met	Ile	Ser	
	290					295					300					
tat	aat	tct	ctt	ggg	aag	tct	cca	gtg	gcc	acc	ctg	agg	att	cca	gct	960
Tyr	Asn	Ser	Leu	Gly	Lys	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Ile	Pro	Ala	
305					310					315					320	
att	caa	gaa	aaa	tca	ttt	cag	tgc	att	gag	gtc	atg	cag	gcc	tgc	gtt	1008
Ile	Gln	Glu	Lys	Ser	Phe	Gln	Cys	Ile	Glu	Val	Met	Gln	Ala	Cys	Val	
				325					330					335		
gct	gag	gac	cag	cta	gtg	gtg	aag	tgg	caa	agc	tct	gct	cta	gac	gtg	1056
Ala	Glu	Asp	Gln	Leu	Val	Val	Lys	Trp	Gln	Ser	Ser	Ala	Leu	Asp	Val	
			340					345					350			
aac	act	tgg	atg	att	gaa	tgg	ttt	ccg	gat	gtg	gac	tca	gag	ccc	acc	1104
Asn	Thr	Trp	Met	Ile	Glu	Trp	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Ser	Glu	Pro	Thr	
		355					360					365				
acc	ctt	tcc	tgg	gaa	tct	gtg	tct	cag	gcc	acg	aac	tgg	acg	atc	cag	1152
Thr	Leu	Ser	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Gln	
	370					375					380					
caa	gat	aaa	tta	aaa	cct	ttc	tgg	tgc	tat	aac	atc	tct	gtg	tat	cca	1200
Gln	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Phe	Trp	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	
385					390					395					400	
atg	ttg	cat	gac	aaa	gtt	ggc	gag	cca	tat	tcc	atc	cag	gct	tat	gcc	1248
Met	Leu	His	Asp	Lys	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	
				405					410					415		
aaa	gaa	ggc	gtt	cca	tca	gaa	ggt	cct	gag	acc	aag	gtg	gag	aac	att	1296
Lys	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Glu	Thr	Lys	Val	Glu	Asn	Ile	
			420					425					430			
ggc	gtg	aag	acg	gtc	acg	atc	aca	tgg	aaa	gag	att	ccc	aag	agt	gag	1344
Gly	Val	Lys	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Glu	
		435					440					445				
aga	aag	ggt	atc	atc	tgc	aac	tac	acc	atc	ttt	tac	caa	gct	gaa	ggt	1392
Arg	Lys	Gly	Ile	Ile	Cys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	
	450					455					460					
gga	aaa	gga	ttc	tcc	aag	aca	gtc	aat	tcc	agc	atc	ttg	cag	tac	ggc	1440
Gly	Lys	Gly	Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Tyr	Gly	
465					470					475					480	
ctg	gag	tcc	ctg	aaa	cga	aag	acc	tct	tac	att	gtt	cag	gtc	atg	gcc	1488
Leu	Glu	Ser	Leu	Lys	Arg	Lys	Thr	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Val	Met	Ala	
				485					490					495		
agc	acc	agt	gct	ggg	gga	acc	aac	ggg	acc	agc	ata	aat	ttc	aag	aca	1536
Ser	Thr	Ser	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Asn	Phe	Lys	Thr	
			500					505					510			
ttg	tca	ttc	agt	gtc	ttt	gag										1557
Leu	Ser	Phe	Ser	Val	Phe	Glu										
		515														

<210> 71  
 <211> 519  
 <212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 71

```

Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe
 1      5      10      15
Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr
      20      25      30
Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr
      35      40      45
Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys
      50      55      60
His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser
65      70      75      80
Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile
      85      90      95
Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr
      100      105      110
Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe
      115      120      125
Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp
      130      135      140
Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu
145      150      155      160
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala
      165      170      175
Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln
      180      185      190
Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser
      195      200      205
Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu
      210      215      220
Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu
225      230      235      240
Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly
      245      250      255
Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro
      260      265      270
Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln
      275      280      285
Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser
      290      295      300
Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala
305      310      315      320
Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val
      325      330      335
Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val
      340      345      350
Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr
      355      360      365
Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln
      370      375      380
Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro
385      390      395      400
Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala
      405      410      415
Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile
      420      425      430
Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu
      435      440      445
Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly

```

```

          450              455              460
    Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly
    465          470          475          480
    Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala
          485          490          495
    Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr
          500          505          510
    Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu
          515
  
```

5 <210> 72  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> etiqueta peptídica de His en el extremo C.  
 <400> 72

```

          Gly Ser Gly Gly His His His His His His
          1              5              10
  
```

15 <210> 73  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> espaciador Gly-Ser de 12 aminoácidos  
 <400> 73

```

          Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Pro Arg Ser
          1              5              10
  
```

25 <210> 74  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41557

35 <400> 74  
 ttatagatct cgaggagtgt tcatccggag t 31

40 <210> 75  
 <211> 65  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29232

45 <400> 75

```

    cgactgactc gagtcagtga tggatgatggt gatggccacc tgatccttta cccggagaca 60
    gggag                                           65
  
```

50 <210> 76  
 <211> 3196  
 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 76

tgatgtctg	cacagtttgt	gtatgectgg	tgcccacaga	ggctcgagag	tgtcagattc	60
ccccaaaaac	tggagttaca	gttttgagcc	gccccatgct	tgatagcaat	caaacctggg	120
tcctctgaaa	gagcatccag	tgcattgtaac	cactgaacca	tctctccaaa	ccatgaacat	180
cactttaatt	tttttaata	gttaaaggat	atthttgattc	taaagatgta	aaagaacgctc	240
tcacctatth	tgaatttgg	taataaatgt	ttcttcaaag	cttaaaaaaa	ttagttcagg	300
tttttttttt	ttttcagtc	gtgatttgct	aagctgcccc	aactggctta	gaatttgtga	360
ccctcttgct	tcagcactc	gagtgttaag	attacaagtg	cacccccctac	ccagttccca	420
taattaactg	atccaccccc	acccccatcc	caccccactc	ccattgcctg	ggcaagtaac	480
tcttgagccc	cattctgggt	ctagagtctg	aagtcacaaa	ggtcgaggtg	agaacgcaag	540
gacaagggca	ggccctggag	cacagatgcc	ttctccttat	gccttccctg	tgttcaactag	600
agccatcccc	ctgcctccgg	aattcccaca	gatggatcgc	tctgtggctt	cttaaaactt	660
ccctgcaggg	cactgaccct	cagccccctc	aagtcacttc	ttccccagtg	attgtacttt	720
tcaatcgggc	ttcaaaactt	cctctcatta	aatcagcaag	cactttccaa	gaaaagagag	780
atgctcaaga	tgccttctg	tgtggtatgt	tgatgctgtt	gtgtgtgtgc	acgcatgtgt	840
gtgcatgtga	ctcaatcttc	tgccttgctt	tgagggtaac	ctcagcattt	ccctccagcc	900
ctgctttccc	caggccgagc	cgaggctggc	aaccttttga	aaatgttttc	tggagaaaag	960
ctgagcaatg	gttttgccat	gggggggect	ttgatctgct	tcctcatgac	aaccttttat	1020
atattgcctg	gtggccatgg	cgaacacacc	aggctccaga	gaccacaggc	aaagcgggcc	1080
ttcctcactc	tcttaccgtc	gccatgatct	tccacacagg	taccgctggc	tccacacgca	1140
gctcagcatg	gcttcagctc	catggctctt	atcatgttag	gggaaggagc	cggaatggc	1200
tgcctcaggt	ggttgctgga	cagaggctgt	tgtaactgaa	gctgggatgg	gcaggggcat	1260
ctgacctatc	agctccatgg	tatccttctt	ttctccagg	aacaacgaag	cctaccctgg	1320
tgctgctttg	ctgtatagga	acctggctgg	ccacctgcag	cttgtccttc	ggtgccccaa	1380
tatcgaagga	agacttaaga	actacaattg	acctcttgaa	acaagagtct	caggatcttt	1440
ataacaacta	tgtaagtgcc	cttgagattg	ttttttctta	accatttctt	taaaatgtct	1500
tatttttgcta	tctaagcaca	gctatccttt	ctcgaataaa	agccagctat	ggaagccaga	1560
gaggcatggg	gaaacattgg	aattcgggtg	gggtgaaatg	tttccaaggg	ggtaaatgca	1620
ctagcagaag	aggcagaggc	agactggctc	agggactgaa	accttggcag	cttacgaaac	1680
actacaggat	gtatgctccc	tgaattcttt	atctcaaate	cacccggctc	acagtcctta	1740
ctaaacgagc	attcttgctg	aaagggcctc	cttagagaag	ggccagcttg	attcaggaat	1800
cccccaagag	caatgagagc	cagtttcagc	agccaaagat	gtcctagtgg	aagcaggggtg	1860
tgaggatctt	cctttggggtc	tccgttgact	aactaggcaa	ctgtctgtgt	gttcttggag	1920
catcctggag	ggccctctgc	ctggccagag	cctggcacag	gtacagcaca	ggaccagaa	1980
agtgtgaata	cttcatttcc	ttgggaccgc	ttagataact	tcagttgaag	caagtaacag	2040
ggaactgat	ggagacacag	ataacctccc	tgcccccttc	acttcagtca	ctgagcctcc	2100
gagaacaggt	tgcagatggc	taggggcagc	ctcagccaga	taggcggagg	cagactgggt	2160
agaagcatcc	ttaggaacca	cggccaacct	gggtgggtat	gccatgtctt	ctagctcata	2220
agccaactag	accttcgatt	cctgtagaca	cagagttagt	gatggcccaa	gcttcagaag	2280
gttgttgtac	caattagata	aggctctgag	caggctagac	acagaggaag	ccctggaaat	2340
gagctgttct	gagctgtagg	gttgttacia	atgtcttctt	tacaatattt	caaacctcct	2400
ctttctacag	agcataaagc	aggcatctgg	gatgtcagca	gacgaatcaa	tacagctgcc	2460
gtgtttcagc	ctggaccggg	aagcattaac	caacatctcg	gtcatcatag	cacatctgga	2520
gaaagtcaaa	gtgttgagcg	agaacacagt	agatacttct	tgggtgataa	gatggctaac	2580
aaacatcagc	tgtttcaacc	cactgaattt	aaacatttct	gtgcctggaa	atactgatga	2640
atcctatgat	tgtaaagtgt	tcgtgcttac	ggttttaag	cagttctcaa	actgcatggc	2700
agaactgcag	gctaaggaca	atactacatg	ctgagtgatg	gggggggggg	ggtgcagtgt	2760
cctcagcagt	gcctgtcctt	cgagggctga	gcttgcaacc	caggacttaa	ctccaaaggg	2820
actgtgcggt	cattactagt	catgttattt	atgtttttat	tttgtccact	gaaatcttgt	2880
tctgtacccc	tgtagggact	ggaagtggca	gctatattta	tttattttatg	tactgagttt	2940
gttaacgctc	cttgaggag	ccttcagagt	ctatttaata	aattatattg	acatgatcac	3000
ataatcagtt	ttggaatttg	tgatggggtt	gaaatcaaag	attaggaatg	ttctggaaat	3060
agtttatgct	accctctccc	tccattagac	agactcatga	gcaaataatc	ccagcagcat	3120
cacgtgcatg	ataaacatct	ttgttccagg	tcataagtac	aatcactgtc	cttttggtat	3180
gtaggctgga	aactaa					3196

5

<210> 77

<211> 24

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC28575  
 <400> 77  
 ccaggaagg aaaccagta tacc 24  
 5  
 <210> 78  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC21195  
 <400> 78  
 15 gaggagacca taacccccga cag 23  
 <210> 79  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC21196  
 25 <400> 79  
 catagctccc accacacgat ttt 23  
 <210> 80  
 <211> 25  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC26358  
 35 <400> 80  
 aaaaccaaac gtacaacctc acggg 25  
 <210> 81  
 40 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <223> Cebador oligonucleotídico ZC26359  
 <400> 81  
 ggcagccat acaccagagc agaca 25  
 50 <210> 82  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29179  
 <400> 82  
 60 gcagggttgg gaacggtgg 19  
 <210> 83  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC28917  
 <400> 83  
 5 tgcaagatgc tggaattgac 20  
 <210> 84  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28916  
 <400> 84  
 15 agtcaattcc agcatcttgc 20  
 <210> 85  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28918  
 25 <400> 85  
 tcacagagtc atcagactcc 20  
 <210> 86  
 <211> 18  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41498  
 35 <400> 86  
 ggctccagag accacagg 18  
 <210> 87  
 40 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41496  
 <400> 87  
 atgactagta atgaccgcac ag 22  
 50 <210> 88  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41583  
 <400> 88  
 60 cgtacgggcc ggccacatg atctccaca caggaacaa 39  
 <210> 89  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC41584

<400> 89

tgacgaggcg cgctcagca tgtagattg tccta 36

5

<210> 90

<211> 650

<212> ADN

<213> Mus musculus

10

<220>

<221> CDS

<222> (53)...(542)

15

<400> 90



```

ggctccagag accacaggca aagcgggcct tcctcactct cttaccgctcg cc atg atc 58
                                     Met Ile
                                     1

ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc tgt ata 106
Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys Cys Ile
                    5                                10                                15

gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca ata tcg 154
Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro Ile Ser
                    20                                25                                30

aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag tct cag 202
Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu Ser Gln
                    35                                40                                45                                50

gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg tca gca 250
Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met Ser Ala
                    55                                60                                65

gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa gca tta 298
Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu Ala Leu
                    70                                75                                80

acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa gtg ttg 346
Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys Val Leu
                    85                                90                                95

agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta aca aac 394
Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu Thr Asn
                    100                                105                                110

atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct gga aat 442
Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro Gly Asn
                    115                                120                                125                                130

act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt tta aag 490
Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val Leu Lys
                    135                                140                                145

cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat act aca 538

Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn Thr Thr
                    150                                155                                160

tgc t gagtgatggg ggggggggtgc agtgtcctca gcagtgctg tccttcgagg 592
Cys

gctgagcttg caaccagga cttaactcca aagggactgt gcggtcatta ctagtcat 650

```

- <210> 91
- <211> 163
- 5 <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 91

```

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

<210> 92

<211> 511

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de ADNc murina (SEC ID N°: 90) y sitios de restricción w/FseI and Ascl y una secuencia Kozak parcial para la fase de lectura abieta y codon de terminación de mcytor17lig

<400> 92

```

ggcgggccac catgatcttc cacacaggaa caacgaagcc taccctgggtg ctgctttgct 60
gtataggaac ctggctggcc acctgcagct tgtccttcgg tgccccaata tcgaaggaag 120
acttaagaac tacaattgac ctcttgaaac aagagtctca ggatctttat aacaactata 180
gcataaagca ggcattctggg atgtcagcag acgaatcaat acagctgccg tgtttcagcc 240
tggaccggga agcattaacc aacatctcgg tcatcatagc acatctggag aaagtcaaag 300
tgttgagcga gaacacagta gatacttctt ggggtgataag atggctaaca aacatcagct 360
gtttcaacc actgaattta aacatttctg tgcctggaaa tactgatgaa tcctatgatt 420
gtaaagtgtt cgtgcttacg gttttaaagc agttctcaaa ctgcatggca gaactgcagg 480
ctaaggacaa tactacatgc tgaggcgcgc c 511
    
```

15

<210> 93

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC41438

<400> 93

25 gccatggcct ctactcagg c 21

<210> 94

<211> 24

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC41437

35

<400> 94

ccaggagca ttgacaactc ttag 24

ES 2 546 797 T3

<210> 95  
 <211> 516  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> polinucleótido zCyt17Lig-CEE humano  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(516)

10

<400> 95

```

atg gcc tct cac tca ggc ccc tcg acg tct gtg ctc ttt ctg ttc tgc 48
Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys
1 5 10 15

tgc ctg gga ggc tgg ctg gcc tcc cac acg ttg ccc gtc cgt tta cta 96
Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu
20 25 30

cga cca agt gat gat gta cag aaa ata gtc gag gaa tta cag tcc ctc 144
Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu
35 40 45

tcg aag atg ctt ttg aaa gat gtg gag gaa gag aag ggc gtg ctc gtg 192
Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu Glu Glu Lys Gly Val Leu Val
50 55 60

tcc cag aat tac acg ctg ccg tgt ctc agc cct gac gcc cag ccg cca 240
Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro
65 70 75 80

aac aac atc cac agc cca gcc atc cgg gca tat ctc aag aca atc aga 288
Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg
85 90 95

cag cta gac aac aaa tct gtt att gat gag atc ata gag cac ctc gac 336
Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp Glu Ile Ile Glu His Leu Asp
100 105 110

aaa ctc ata ttt caa gat gca cca gaa aca aac att tct gtg cca aca 384
Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr
115 120 125

gac acc cat gaa tgt aaa cgc ttc atc ctg act att tct caa cag ttt 432
Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe
130 135 140

tca gag tgc atg gac ctc gca cta aaa tca ttg acc tct gga gcc caa 480
Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln
145 150 155 160

cag gcc acc act gaa gaa tac atg ccg atg gaa taa 516
Gln Ala Thr Thr Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu *
165 170
    
```

15 <210> 96  
 <211> 171  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> polipéptido zCyt17Lig-CEE humano

<400> 96

```

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

```

5 <210> 97  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41607

<400> 97  
 tccaggaat tcatataggc cggccacat ggcctctcac tcaggcccc 49

15 <210> 98  
 <211> 82  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41605

<400> 98

25 **caaccccaga gctgttttaa ggcgcgcctc tagattatta ttccatcggc atgtattctt 60**  
**cagtgggtggc ctgttgggct cc 82**

<210> 99  
 <211> 629  
 30 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 35 <222> (28)...(528)

<400> 99

```

aacccttgaggaccagaa cgagaca atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc 54
      Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser
      1                               5

atc cac acc atg ctg ctc ctg ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc 102
Ile His Thr Met Leu Leu Leu Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu
 10                               15                               20                               25

caa gct tca atc agt ggc cgg gat acc cac cgt tta acc aga acg ttg 150
Gln Ala Ser Ile Ser Gly Arg Asp Thr His Arg Leu Thr Arg Thr Leu
                               30                               35                               40

aat tgc agc tct att gtc aag gag att ata ggg aag ctc cca gaa cct 198
Asn Cys Ser Ser Ile Val Lys Glu Ile Ile Gly Lys Leu Pro Glu Pro
                               45                               50                               55

gaa ctc aaa act gat gat gaa gga ccc tct ctg agg aat aag agc ttt 246
Glu Leu Lys Thr Asp Asp Glu Gly Pro Ser Leu Arg Asn Lys Ser Phe
                               60                               65                               70

cgg aga gta aac ctg tcc aaa ttc gtg gaa agc caa gga gaa gtg gat 294
Arg Arg Val Asn Leu Ser Lys Phe Val Glu Ser Gln Gly Glu Val Asp
 75                               80                               85

cct gag gac aga tac gtt atc aag tcc aat ctt cag aaa ctt aac tgt 342
Pro Glu Asp Arg Tyr Val Ile Lys Ser Asn Leu Gln Lys Leu Asn Cys
 90                               95                               100                               105

tgc ctg cct aca tct gcg aat gac tct gcg ctg cca ggg gtc ttc att 390
Cys Leu Pro Thr Ser Ala Asn Asp Ser Ala Leu Pro Gly Val Phe Ile
                               110                               115                               120

cga gat ctg gat gac ttt cgg aag aaa ctg aga ttc tac atg gtc cac 438
Arg Asp Leu Asp Asp Phe Arg Lys Lys Leu Arg Phe Tyr Met Val His
                               125                               130                               135

ctt aac gat ctg gag aca gtg cta acc tct aga cca cct cag ccc gca 486
Leu Asn Asp Leu Glu Thr Val Leu Thr Ser Arg Pro Pro Gln Pro Ala
                               140                               145                               150

tct ggc tcc gtc tct cct aac cgt gga acc gtg gaa tgt taa 528
Ser Gly Ser Val Ser Pro Asn Arg Gly Thr Val Glu Cys *
                               155                               160                               165

aacagcaggc agagcaccta aagtctgaat gttcctcatg gcccatggtc aaaaggattt 588
tacattcctt tatgccatca aatgtcttat caatttatct a 629

```

<210> 100

<211> 166

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 100

```

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

```

<210> 101  
 <211> 674  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (10)...(464)  
 <400> 101

```

gatccaaac atg agc cgc ctg ccc gtc ctg ctc ctg ctc caa ctc ctg gtc 51
      Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val
      1          5          10

cgc ccc gga ctc caa gct ccc atg acc cag aca acg tcc ttg aag aca 99
Arg Pro Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Ser Leu Lys Thr
 15          20          25          30

agc tgg gtt aac tgc tct aac atg atc gat gaa att ata aca cac tta 147
Ser Trp Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu
 35          40          45

aag cag cca cct ttg cct ttg ctg gac ttc aac aac ctc aat ggg gaa 195
Lys Gln Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu
 50          55          60

gac caa gac att ctg atg gaa aat aac ctt cga agg cca aac ctg gag 243
Asp Gln Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu
 65          70          75

gca ttc aac agg gct gtc aag agt tta cag aac gca tca gca att gag 291
Ala Phe Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu

```

ES 2 546 797 T3

```

      80              85              90
agc att ctt aaa aat ctc ctg cca tgt ctg ccc ctg gcc acg gcc gca 339
Ser Ile Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala
  95              100              105              110

ccc acg cga cat cca atc cat atc aag gac ggt gac tgg aat gaa ttc 387
Pro Thr Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe
      115              120              125

cgg agg aaa ctg acg ttc tat ctg aaa acc ctt gag aat gcg cag gct 435
Arg Arg Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala
      130              135              140

caa cag acg act ttg agc ctc gcg atc tt ttagtccaac gtccagctcg 484
Gln Gln Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile
      145              150

ttctctgggc cttctcacca cagcgcctcg ggacatcaaa aacagcagaa cttctgaaac 544
ctctgggtca tctctcacac attccaggac cagaagcatt tcaccttttc ctgcggcattc 604
agatgaattg ttaattatct aatttctgaa atgtgcagct cccatttggc cttgtgcggt 664
tgtgttctca 674

```

<210> 102  
 <211> 151  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 102

```

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

```

10  
 <210> 103  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> etiqueta peptídica Glu-Glu (CEE) alternativa sin el par de restos Gly-Ser

20 <400> 103

Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu  
 1 5

<210> 104  
 <211> 513  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> polinucleótido zCyt17Lig(m)-CEE de ratón  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(513)

10

<400> 104

```

atg atc ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc 48
Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys
 1                    5                    10                    15

tgt ata gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca 96
Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro
                20                    25                    30

ata tcg aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag 144
Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu
                35                    40                    45

tct cag gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg 192
Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met
                50                    55                    60

tca gca gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa 240
Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu
        65                    70                    75                    80

gca tta acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa 288
Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys
                85                    90                    95

gtg ttg agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta 336
Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu
                100                    105                    110

aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct 384
Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro
                115                    120                    125

gga aat act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt 432
Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val
                130                    135                    140

tta aag cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat 480
Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn
        145                    150                    155                    160

act aca tgc gaa gaa tac atg ccg atg gaa tga 513
Thr Thr Cys Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu *
                165                    170
    
```

15 <210> 105  
 <211> 170  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> polipéptido zCyt17Lig(m)-CEE de ratón



<400> 105

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

5 <210> 106  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41643

<400> 106  
 tccaggaat tcatataggc cggccacat gatctccac acaggaaca 49

15 <210> 107  
 <211> 85  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41641

<400> 107

25 **caaccccaga gctgttttaa ggcgcgcctc tagattatca ttccatcggc atgtattcct 60**  
**cgcattgtagt attgtcctta gctg 85**

<210> 108  
 <211> 2529  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (162)...(2108)

35 <400> 108

**tgtgtgtgca gtatgaaaat tgagacagga aggcagagtg tcagcttggt ccacctcagc 60**

tggaatgtg catcaggcaa ctcaagtttt tcaccacggc atgtgtctgt gaatgtccgc	120
aaaacattct ctctcccag ccttcatgtg ttaacctggg g atg atg tgg acc tgg	176
	Met Met Trp Thr Trp 1 5
gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gct ctg	224
Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Ala Leu	20
	10 15
cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg aaa aat	272
Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn	35
	25 30
tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc cag tac	320
Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr Gln Tyr	50
	40 45
aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat aat tgt aca	368
Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn Cys Thr	60
	55 65
acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tcg tgc tct ttt ttc ctt	416
Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe Phe Leu	85
	70 75 80
cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg gaa gct gaa	464
Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu Ala Glu	100
	90 95
aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg aga tta gag	512
Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg Leu Glu	115
	105 110
aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg aaa cca gtt	560
Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys Pro Val	130
	120 125 130
ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag cct gag ttg	608
Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro Glu Leu	145
	135 140
gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc agg aca gtc	656
Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg Thr Val	165
	150 155 160 165
aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac cgt aag gat	704
Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg Lys Asp	180
	170 175 180
aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt aca gaa tat	752
Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr Glu Tyr	195
	185 190 195
gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc tgg agt gac	800
Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp Ser Asp	210
	200 205 210
tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa gct cca tgt ggc	848
Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Ala Pro Cys Gly	225
	215 220 225
ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag gcg gat gga aga agg	896
Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly Arg Arg	

ES 2 546 797 T3

230		235		240		245										
cca	gtg	cgg	ttg	tta	tgg	aag	aag	gca	aga	gga	gcc	cca	gtc	cta	gag	944
Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val	Leu	Glu	
				250					255					260		
aaa	aca	ctt	ggc	tac	aac	ata	tgg	tac	tat	cca	gaa	agc	aac	act	aac	992
Lys	Thr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Trp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Ser	Asn	Thr	Asn	
			265					270					275			
ctc	aca	gaa	aca	atg	aac	act	act	aac	cag	cag	ctt	gaa	ctg	cat	ctg	1040
Leu	Thr	Glu	Thr	Met	Asn	Thr	Thr	Asn	Gln	Gln	Leu	Glu	Leu	His	Leu	
			280				285					290				
gga	ggc	gag	agc	ttt	tgg	gtg	tct	atg	att	tct	tat	aat	tct	ctt	ggg	1088
Gly	Gly	Glu	Ser	Phe	Trp	Val	Ser	Met	Ile	Ser	Tyr	Asn	Ser	Leu	Gly	
	295					300					305					
aag	tct	cca	gtg	gcc	acc	ctg	agg	att	cca	gct	att	caa	gaa	aaa	tca	1136
Lys	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Ile	Pro	Ala	Ile	Gln	Glu	Lys	Ser	
310					315					320					325	
ttt	cag	tgc	att	gag	gtc	atg	cag	gcc	tgc	ggt	gct	gag	gac	cag	cta	1184
Phe	Gln	Cys	Ile	Glu	Val	Met	Gln	Ala	Cys	Val	Ala	Glu	Asp	Gln	Leu	
				330					335					340		
gtg	gtg	aag	tgg	caa	agc	tct	gct	cta	gac	gtg	aac	act	tgg	atg	att	1232
Val	Val	Lys	Trp	Gln	Ser	Ser	Ala	Leu	Asp	Val	Asn	Thr	Trp	Met	Ile	
			345					350					355			
gaa	tgg	ttt	ccg	gat	gtg	gac	tca	gag	ccc	acc	acc	ctt	tcc	tgg	gaa	1280
Glu	Trp	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Ser	Glu	Pro	Thr	Thr	Leu	Ser	Trp	Glu	
		360					365					370				
tct	gtg	tct	cag	gcc	acg	aac	tgg	acg	atc	cag	caa	gat	aaa	tta	aaa	1328
Ser	Val	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Gln	Gln	Asp	Lys	Leu	Lys	
	375					380					385					
cct	ttc	tgg	tgc	tat	aac	atc	tct	gtg	tat	cca	atg	ttg	cat	gac	aaa	1376
Pro	Phe	Trp	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	Met	Leu	His	Asp	Lys	
390					395					400				405		
gtt	ggc	gag	cca	tat	tcc	atc	cag	gct	tat	gcc	aaa	gaa	ggc	gtt	cca	1424
Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	Lys	Glu	Gly	Val	Pro	
				410					415					420		
tca	gaa	ggt	cct	gag	acc	aag	gtg	gag	aac	att	ggc	gtg	aag	acg	gtc	1472
Ser	Glu	Gly	Pro	Glu	Thr	Lys	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Val	Lys	Thr	Val	
			425					430					435			
acg	atc	aca	tgg	aaa	gag	att	ccc	aag	agt	gag	aga	aag	ggt	atc	atc	1520
Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Glu	Arg	Lys	Gly	Ile	Ile	
		440					445					450				
tgc	aac	tac	acc	atc	ttt	tac	caa	gct	gaa	ggt	gga	aaa	gga	ttc	tcc	1568
Cys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Gly	Phe	Ser	
	455					460					465					
aag	aca	gtc	aat	tcc	agc	atc	ttg	cag	tac	ggc	ctg	gag	tcc	ctg	aaa	1616
Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Tyr	Gly	Leu	Glu	Ser	Leu	Lys	
470					475					480					485	
cga	aag	acc	tct	tac	att	gtt	cag	gtc	atg	gcc	agc	acc	agt	gct	ggg	1664

```

Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser Ala Gly
          490                      495                      500

gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca ttg tca ttc agt gtc 1712
Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe Ser Val
          505                      510                      515

ttt gag att atc ctc ata act tct ctg att ggt gga ggc ctt ctt att 1760
Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly Leu Leu Ile
          520                      525                      530

ctc att atc ctg aca gtg gca tat ggt ctc aaa aaa ccc aac aaa ttg 1808
Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro Asn Lys Leu
          535                      540                      545

act cat ctg tgt tgg ccc acc gtt ccc aac cct gct gaa agt agt ata 1856
Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser Ser Ile
          550                      555                      560

gcc aca tgg cat gga gat gat ttc aag gat aag cta aac ctg aag gag 1904
Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys Leu Asn Leu Lys Glu
          570                      575                      580

tct gat gac tct gtg aac aca gaa gac agg atc tta aaa cca tgt tcc 1952
Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile Leu Lys Pro Cys Ser
          585                      590                      595

acc ccc agt gac aag ttg gtg att gac aag ttg gtg gtg aac ttt ggg 2000
Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Gly
          600                      605                      610

aat gtt ctg caa gaa att ttc aca gat gaa gcc aga acg ggt cag gaa 2048
Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala Arg Thr Gly Gln Glu
          615                      620                      625

aac aat tta gga ggg gaa aag aat ggg act aga att ctg tct tcc tgc 2096
Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr Arg Ile Leu Ser Ser Cys
          630                      635                      640                      645

cca act tca ata taagtgtgga ctaaaatgcg agaaaggtgt cctgtggtct 2148
Pro Thr Ser Ile

atgcaaatta gaaaggacat gcagagtttt ccaactagga agactgaatc tgtggcccca 2208
agagaacctat ctctgaagac tgggtatgtg gtcttttcca cacatggacc acctacggat 2268
gcaatctgta atgcatgtgc atgagaagtc tgttattaag tagagtgtga aacatgggtt 2328
atggtaatag gaacagcttt taaaatgctt ttgtatttgg gcctttcata caaaaagcc 2388
ataataccat tttcatgtaa tgctatactt ctatactatt ttcatgtaat actatacttc 2448
tatactattt tcatgtaata ctatacttct atactatttt catgtaatac tatacttcta 2508
tattaaagtt ttaccactc a 2529

```

<210> 109  
 <211> 649  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 109

```

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

```

Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys  
50 55 60  
His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser  
65 70 75 80  
Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile  
85 90 95  
Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr  
100 105 110  
Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe  
115 120 125  
Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp  
130 135 140  
Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu  
145 150 155 160  
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala  
165 170 175  
Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln  
180 185 190  
Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser  
195 200 205  
Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu  
210 215 220  
Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu  
225 230 235 240  
Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly  
245 250 255  
Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro  
260 265 270  
Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln  
275 280 285  
Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser  
290 295 300  
Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala  
305 310 315 320  
Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val  
325 330 335  
Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val  
340 345 350  
Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr  
355 360 365  
Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln  
370 375 380  
Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro  
385 390 395 400  
Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala  
405 410 415  
Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile  
420 425 430  
Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu  
435 440 445  
Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly  
450 455 460  
Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly  
465 470 475 480  
Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala  
485 490 495  
Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr  
500 505 510  
Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly  
515 520 525  
Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys  
530 535 540  
Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro

```

545          550          555          560
Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys
                    565
Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile
                    570
                    575
                    580
Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu
                    585
                    590
                    595
Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala
                    600
                    605
                    610
Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr Arg
                    615
                    620
                    625
Ile Leu Ser Ser Cys Pro Thr Ser Ile
                    630
                    635
                    640
                    645

```

<210> 110  
 <211> 2402  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (171)...(2366)  
 <400> 110

```

ggcaccgaggt gtgtgtgcag tatgaaaatt gagacaggaa ggcagagtgt cagcttgctc 60
cacctcagct gggaatgtgc atcaggcaac tcaagttttt caccacggca tgtgtctgtg 120
aatgtccgca aaacattctc tctcccagc cttcatgtgt taacctgggg atg atg 176
Met Met
1

tgg acc tgg gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc agc ctg 224
Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu
5 10 15

gca gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat 272
Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr
20 25 30

agg aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat 320
Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr
35 40 45 50

acc cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat 368
Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp
55 60 65

aat tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tcc tgc tct 416
Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser
70 75 80

ttt ttc ctt cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg 464
Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val
85 90 95

gaa gct gaa aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg 512
Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp
100 105 110

aga tta gag aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg 560
Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val
115 120 125 130

```

aaa cca gtt ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag	608
Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys	
135 140 145	
cct gag ttg gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc	656
Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe	
150 155 160	
agg aca gtc aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac	704
Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn	
165 170 175	
cgt aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt	752
Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe	
180 185 190	
aca gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc	800
Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe	
195 200 205 210	
tgg agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa gct	848
Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala	
215 220 225	
cca tgt ggc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag gcg gat	896
Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp	
230 235 240	
gga aga agg cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga gga gcc cca	944
Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro	
245 250 255	
gtc cta gag aaa aca ctt ggc tac aac ata tgg tac tat cca gaa agc	992
Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser	
260 265 270	
aac act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag cag ctt gaa	1040
Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu	
275 280 285 290	
ctg cat ctg gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att tct tat aat	1088
Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn	
295 300 305	
tct ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca gct att caa	1136
Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln	
310 315 320	
gaa aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc gtt gct gag	1184
Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu	
325 330 335	
gac cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac gtg aac act	1232
Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr	
340 345 350	
tgg atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc acc acc ctt	1280
Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu	
355 360 365 370	
tcc tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag caa gat	1328
Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp	
375 380 385	

aaa tta aaa cct ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca atg ttg	1376
Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu	
390 395 400	
cat gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc aaa gaa	1424
His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu	
405 410 415	
ggc gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac att ggc gtg	1472
Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val	
420 425 430	
aag acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt gag aga aag	1520
Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys	
435 440 445 450	
ggt atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa	1568
Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys	
455 460 465	
gga ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac ggc ctg gag	1616
Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu	
470 475 480	
tcc ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc agc acc	1664
Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr	
485 490 495	
agt gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca ttg tca	1712
Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser	
500 505 510	
ttc agt gtc ttt gag att atc ctc ata act tct ctg att ggt gga ggc	1760
Phe Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly	
515 520 525 530	
ctt ctt att ctc att atc ctg aca gtg gca tat ggt ctc aaa aaa ccc	1808
Leu Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro	
535 540 545	
aac aaa ttg act cat ctg tgt tgg ccc acc gtt ccc aac cct gct gaa	1856
Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro Ala Glu	
550 555 560	
agt agt ata gcc aca tgg cat gga gat gat ttc aag gat aag cta aac	1904
Ser Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys Leu Asn	
565 570 575	
ctg aag gag tct gat gac tct gtg aac aca gaa gac agg atc tta aaa	1952
Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile Leu Lys	
580 585 590	
cca tgt tcc acc ccc agt gac aag ttg gtg att gac aag ttg gtg gtg	2000
Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu Val Val	
595 600 605 610	
aac ttt ggg aat gtt ctg caa gaa att ttc aca gat gaa gcc aga acg	2048
Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala Arg Thr	
615 620 625	
ggt cag gaa aac aat tta gga ggg gaa aag aat ggg tat gtg acc tgc	2096
Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Tyr Val Thr Cys	



ES 2 546 797 T3

630					635					640						
ccc	ttc	agg	cct	gat	tgt	ccc	ctg	ggg	aaa	agt	ttt	gag	gag	ctc	cca	2144
Pro	Phe	Arg	Pro	Asp	Cys	Pro	Leu	Gly	Lys	Ser	Phe	Glu	Glu	Leu	Pro	
		645					650					655				
ggt	tca	cct	gag	att	ccg	ccc	aga	aaa	tcc	caa	tac	cta	cgt	tcg	agg	2192
Val	Ser	Pro	Glu	Ile	Pro	Pro	Arg	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Arg	Ser	Arg	
	660					665				670						
atg	cca	gag	ggg	acc	cgc	cca	gaa	gcc	aaa	gag	cag	ctt	ctc	ttt	tct	2240
Met	Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	Pro	Glu	Ala	Lys	Glu	Gln	Leu	Leu	Phe	Ser	
675					680					685					690	
ggt	caa	agt	tta	gta	cca	gat	cat	ctg	tgt	gag	gaa	gga	gcc	cca	aat	2288
Gly	Gln	Ser	Leu	Val	Pro	Asp	His	Leu	Cys	Glu	Glu	Gly	Ala	Pro	Asn	
				695				700						705		
cca	tat	ttg	aaa	aat	tca	gtg	aca	gcc	agg	gaa	ttt	ctt	gtg	tct	gaa	2336
Pro	Tyr	Leu	Lys	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Arg	Glu	Phe	Leu	Val	Ser	Glu	
			710					715						720		
aaa	ctt	cca	gag	cac	acc	aag	gga	gaa	gtc	taa atg cgac cat agc at ga					2386	
Lys	Leu	Pro	Glu	His	Thr	Lys	Gly	Glu	Val							
		725					730									
gaccctcggg gcctca															2402	

- <210> 111
- <211> 732
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 111

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

225					230					235				240
Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg
				245					250					255
Ala	Pro	Val	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Trp	Tyr	Tyr
			260					265					270	Pro
Glu	Ser	Asn	Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Thr	Met	Asn	Thr	Thr	Asn	Gln
			275				280					285		Gln
Leu	Glu	Leu	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Ser	Phe	Trp	Val	Ser	Met	Ile
	290					295					300			Ser
Tyr	Asn	Ser	Leu	Gly	Lys	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Ile	Pro
305					310					315				320
Ile	Gln	Glu	Lys	Ser	Phe	Gln	Cys	Ile	Glu	Val	Met	Gln	Ala	Cys
				325					330					335
Ala	Glu	Asp	Gln	Leu	Val	Val	Lys	Trp	Gln	Ser	Ser	Ala	Leu	Asp
			340					345				350		Val
Asn	Thr	Trp	Met	Ile	Glu	Trp	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Ser	Glu	Pro
		355					360					365		Thr
Thr	Leu	Ser	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile
	370					375					380			Gln
Gln	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Phe	Trp	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr
385					390					395				400
Met	Leu	His	Asp	Lys	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr
			405						410					415
Lys	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Glu	Thr	Lys	Val	Glu	Asn
			420					425					430	Ile
Gly	Val	Lys	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser
		435				440						445		Glu
Arg	Lys	Gly	Ile	Ile	Cys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu
	450					455					460			Gly
Gly	Lys	Gly	Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Tyr
465					470					475				480
Leu	Glu	Ser	Leu	Lys	Arg	Lys	Thr	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Val	Met
			485						490					495
Ser	Thr	Ser	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Asn	Phe	Lys
			500					505				510		Thr
Leu	Ser	Phe	Ser	Val	Phe	Glu	Ile	Ile	Leu	Ile	Thr	Ser	Leu	Ile
		515				520						525		Gly
Gly	Gly	Leu	Leu	Ile	Leu	Ile	Leu	Thr	Val	Ala	Tyr	Gly	Leu	Lys
	530					535					540			
Lys	Pro	Asn	Lys	Leu	Thr	His	Leu	Cys	Trp	Pro	Thr	Val	Pro	Asn
545					550					555				560
Ala	Glu	Ser	Ser	Ile	Ala	Thr	Trp	His	Gly	Asp	Asp	Phe	Lys	Asp
			565						570					575
Leu	Asn	Leu	Lys	Glu	Ser	Asp	Asp	Ser	Val	Asn	Thr	Glu	Asp	Arg
			580					585					590	Ile
Leu	Lys	Pro	Cys	Ser	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Leu	Val	Ile	Asp	Lys
		595					600					605		Leu
Val	Val	Asn	Phe	Gly	Asn	Val	Leu	Gln	Glu	Ile	Phe	Thr	Asp	Glu
	610					615						620		Ala
Arg	Thr	Gly	Gln	Glu	Asn	Asn	Leu	Gly	Gly	Glu	Lys	Asn	Gly	Tyr
625					630					635				640
Thr	Cys	Pro	Phe	Arg	Pro	Asp	Cys	Pro	Leu	Gly	Lys	Ser	Phe	Glu
			645						650					655
Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Ile	Pro	Pro	Arg	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu
			660					665					670	Arg
Ser	Arg	Met	Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	Pro	Glu	Ala	Lys	Glu	Gln	Leu
	675					680						685		Leu
Phe	Ser	Gly	Gln	Ser	Leu	Val	Pro	Asp	His	Leu	Cys	Glu	Glu	Gly
	690					695					700			Ala
Pro	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Arg	Glu	Phe	Leu
705					710					715				720
Ser	Glu	Lys	Leu	Pro	Glu	His	Thr	Lys	Gly	Glu	Val			
			725						730					

ES 2 546 797 T3

<211> 1299  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (162)...(1133)

<400> 112

10

```

tgtgtgtgca gtatgaaaat tgagacagga aggcagagtg tcagcttggt ccacctcagc 60
tgggaatgtg catcaggcaa ctcaagtttt tcaccacggc atgtgtctgt gaatgtccgc 120
aaaacattct ctctccccag ccttcatgtg ttaacctggg g atg atg tgg acc tgg 176
                                         Met Met Trp Thr Trp
                                         1                               5

gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gct ctg 224
Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Ala Leu
                               10                               15                               20

cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg aaa aat 272
Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn
                               25                               30                               35

tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc cag tac 320
Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr Gln Tyr
                               40                               45                               50

aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat aat tgt aca 368
Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn Cys Thr
                               55                               60                               65

acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tgc tgc tct ttt ttc ctt 416
Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe Phe Leu
                               70                               75                               80                               85

cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg gaa gct gaa 464
Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu Ala Glu
                               90                               95                               100

aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg aga tta gag 512
Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg Leu Glu
                               105                               110                               115

aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg aaa cca gtt 560
Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys Pro Val
                               120                               125                               130

ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag cct gag ttg 608
Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro Glu Leu
                               135                               140                               145

gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc agg aca gtc 656
Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg Thr Val
                               150                               155                               160                               165

aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac cgt aag gat 704
Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg Lys Asp
                               170                               175                               180

aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt aca gaa tat 752
    
```

Lys	Asn	Gln	Thr	Tyr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Phe	Thr	Glu	Tyr		
			185					190					195				
gtc	ata	gct	ctg	cga	tgt	gcg	gtc	aag	gag	tca	aag	ttc	tgg	agt	gac	800	
Val	Ile	Ala	Leu	Arg	Cys	Ala	Val	Lys	Glu	Ser	Lys	Phe	Trp	Ser	Asp		
		200					205					210					
tgg	agc	caa	gaa	aaa	atg	gga	atg	act	gag	gaa	gaa	gct	cca	tgt	ggc	848	
Trp	Ser	Gln	Glu	Lys	Met	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Cys	Gly		
	215					220					225						
ctg	gaa	ctg	tgg	aga	gtc	ctg	aaa	cca	gct	gag	gcg	gat	gga	aga	agg	896	
Leu	Glu	Leu	Trp	Arg	Val	Leu	Lys	Pro	Ala	Glu	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg		
	230				235					240					245		
cca	gtg	cgg	ttg	tta	tgg	aag	aag	gca	aga	gga	gcc	cca	gtc	cta	gag	944	
Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val	Leu	Glu		
				250				255						260			
aaa	aca	ctt	ggc	tac	aac	ata	tgg	tac	tat	cca	gaa	agc	aac	act	aac	992	
Lys	Thr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Trp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Ser	Asn	Thr	Asn		
			265					270					275				
ctc	aca	gaa	aca	atg	aac	act	act	aac	cag	cag	ctt	gaa	ctg	cat	ctg	1040	
Leu	Thr	Glu	Thr	Met	Asn	Thr	Thr	Asn	Gln	Gln	Leu	Glu	Leu	His	Leu		
		280					285					290					
gga	ggc	gag	agc	ttt	tgg	gtg	tct	atg	att	tct	tat	aat	tct	ctt	ggg	1088	
Gly	Gly	Glu	Ser	Phe	Trp	Val	Ser	Met	Ile	Ser	Tyr	Asn	Ser	Leu	Gly		
	295					300					305						
aag	tct	cca	gtg	gcc	acc	ctg	agg	att	cca	gct	att	caa	gaa	aaa		1133	
Lys	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Ile	Pro	Ala	Ile	Gln	Glu	Lys			
	310				315					320							
tagaaacttt	acagatgcta	gtcccagaca	taaaagaaaa	taatgttctg	gatgtgcacg	1193											
atggctcagc	cctgtaatcc	cagcactttg	aggccaagac	gggtggatcg	ctgagttcag	1253											
gagttcaaga	caagtcagg	caacatagtg	aaaccttggt	tctaca		1299											

<210> 113  
 <211> 324  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 113

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

Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu  
 145 150 155 160  
 Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala  
 165 170 175  
 Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln  
 180 185 190  
 Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser  
 195 200 205  
 Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu  
 210 215 220  
 Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu  
 225 230 235 240  
 Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly  
 245 250 255  
 Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro  
 260 265 270  
 Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln  
 275 280 285  
 Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser  
 290 295 300  
 Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala  
 305 310 315 320  
 Ile Gln Glu Lys

<210> 114  
 <211> 1476  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (162)...(878)

<400> 114

ES 2 546 797 T3

tgtgtgtgca	gtatgaaaat	tgagacagga	aggcagagtg	tcagcttggt	ccacctcagc	60
tgggaatgtg	catcaggcaa	ctcaagtttt	tcaccacggc	atgtgtctgt	gaatgtccgc	120
aaaacattct	ctctccccag	ccttcatgtg	ttaacctggg	g atg atg tgg acc tgg		176
				Met Met Trp Thr Trp		
				1	5	
gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gct ctg						224
Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Ala Leu						
	10		15		20	
cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg aaa aat						272
Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn						
	25		30		35	
tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc cag tac						320
Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr Gln Tyr						
	40		45		50	
aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat aat tgt aca						368
Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn Cys Thr						
	55		60		65	
acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tcg tgc tct ttt ttc ctt						416
Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe Phe Leu						
	70		75		80	85
cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg gaa gct gaa						464

```

Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu Ala Glu
          90                      95                      100

aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg aga tta gag 512
Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg Leu Glu
          105                      110                      115

aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg aaa cca gtt 560
Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys Pro Val
          120                      125                      130

ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag cct gag ttg 608
Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro Glu Leu
          135                      140                      145

gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc agg aca gtc 656
Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg Thr Val
          150                      155                      160                      165

aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac cgt aag gat 704
Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg Lys Asp
          170                      175                      180

aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt aca gaa tat 752
Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr Glu Tyr
          185                      190                      195

gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc tgg agt gac 800
Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp Ser Asp
          200                      205                      210

tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa ggc aag cta ctc 848
Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Gly Lys Leu Leu
          215                      220                      225

cct gcg att ccc gtc ctg tct gct ctg gtg tagggctgct ttgggctaga 898
Pro Ala Ile Pro Val Leu Ser Ala Leu Val
          230                      235

cttgggtgggg tttgtcacca cctgggtggg aatcatggaa tctcatgacc ccaggggccc 958
cctgtaccat cgagagtgag cctgcacaac tttgtgcccc aaaggcaaag gatcacattt 1018
taatactcat gaggttctta tactatacat gaaagggtat catatcattt gttttgtttt 1078
gttttgtttt tgagatggag tcttactctg tcaccagga tggagtgcag tgatgtgatc 1138
tcggctcact gccaccacca cctcccagat tcaagcaatt cttgtgcctc agcctcccaa 1198
gtagctggga ttacaggggc ccacgaccat gcccggttga tttttgtatt tttagtagag 1258
aagggatatic accatggttg ctaggctagt cttgaactcc tgacctcagg taatctgccc 1318
accttgacct cccaaagtgt tgggattaca ggcgtgagcc actgtgcccc gccagtatca 1378
tatcatctga aggtatcctg tgataaatta aagatacata ttgtgaatcc tggagctact 1438
actcaaaaaa taataaagg tgtaactaat acaattta 1476

```

<210> 115  
 <211> 239  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 115



```

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

      50      55      60
His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser
65      70      75      80
Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile
      85      90      95
Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr
      100      105      110
Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe
      115      120      125
Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp
      130      135      140
Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu
145      150      155      160
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala
      165      170      175
Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln
      180      185      190
Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser
      195      200      205
Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu
      210      215      220
Glu Gly Lys Leu Leu Pro Ala Ile Pro Val Leu Ser Ala Leu Val
225      230      235

```

<210> 116

<211> 2748

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

10 <222> (237)...(222)

<400> 116

ES 2 546 797 T3

```

gatggggccc tgaatggtga tctgacagaa ttccagacca acctggtggt tattgtcctt 60
ttcatctggt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaaggtgct gctgtccggg 120
ctctcagaga aggcagtgct ggaggcgctt ctggcccggg tctctccta ctgttctctg 180
tagcccagcc ttctcggggg ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239
Met
1

ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac 287
Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His
5 10 15

gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg 335
Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu
20 25 30

tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act 383
Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr
35 40 45

aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act 431
Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Thr
50 55 60 65

tgc act tgg aga cca gag aag gaa acc aat gat acc agc tac att gtg 479
Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Val
70 75 80

act ttg act tac tcc tat gga aaa agc aat tat agt gac aat gct aca 527

```

Thr	Leu	Thr	Tyr 85	Ser	Tyr	Gly	Lys	Ser 90	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asn 95	Ala	Thr		
gag	gct	tca	tat	tct	ttt	ccc	cgt	tcc	tgt	gca	atg	ccc	cca	gac	atc		575
Glu	Ala	Ser	Tyr	Ser	Phe	Pro	Arg	Ser	Cys	Ala	Met	Pro	Pro	Asp	Ile		
		100					105					110					
tgc	agt	gtt	gaa	gta	caa	gct	caa	aat	gga	gat	ggt	aaa	gtt	aaa	tct		623
Cys	Ser	Val	Glu	Val	Gln	Ala	Gln	Asn	Gly	Asp	Gly	Lys	Val	Lys	Ser		
		115				120					125						
gac	atc	aca	tat	tgg	cat	tta	atc	tcc	ata	gca	aaa	acc	gaa	cca	cct		671
Asp	Ile	Thr	Tyr	Trp	His	Leu	Ile	Ser	Ile	Ala	Lys	Thr	Glu	Pro	Pro		
					135					140					145		
ata	att	tta	agt	gtg	aat	cca	att	tgt	aat	aga	atg	ttc	cag	ata	caa		719
Ile	Ile	Leu	Ser	Val	Asn	Pro	Ile	Cys	Asn	Arg	Met	Phe	Gln	Ile	Gln		
				150					155						160		
tgg	aaa	ccg	cgt	gaa	aag	act	cgt	ggg	ttt	cct	tta	gta	tgc	atg	ctt		767
Trp	Lys	Pro	Arg	Glu	Lys	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	Leu	Val	Cys	Met	Leu		
			165					170					175				
cgg	ttc	aga	act	gtc	aac	agt	agc	cgc	tgg	acg	gaa	gtc	aat	ttt	gaa		815
Arg	Phe	Arg	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Arg	Trp	Thr	Glu	Val	Asn	Phe	Glu		
		180					185					190					
aac	tgt	aaa	cag	gtc	tgc	aac	ctc	aca	gga	ctt	cag	gct	ttc	aca	gaa		863
Asn	Cys	Lys	Gln	Val	Cys	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Phe	Thr	Glu		
		195				200					205						
tat	gtc	ctg	gct	cta	cga	ttc	agg	ttc	aat	gac	tca	aga	tat	tgg	agc		911
Tyr	Val	Leu	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg	Phe	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Trp	Ser		
		210			215					220					225		
aag	tgg	agc	aaa	gaa	gaa	acc	aga	gtg	act	atg	gag	gaa	gtt	cca	cat		959
Lys	Trp	Ser	Lys	Glu	Glu	Thr	Arg	Val	Thr	Met	Glu	Glu	Val	Pro	His		
				230				235						240			
gtc	ctg	gac	ctg	tgg	aga	att	ctg	gaa	cca	gca	gac	atg	aac	gga	gac		1007
Val	Leu	Asp	Leu	Trp	Arg	Ile	Leu	Glu	Pro	Ala	Asp	Met	Asn	Gly	Asp		
			245					250						255			
agg	aag	gtg	cga	ttg	ctg	tgg	aag	aag	gca	aga	gga	gcc	ccc	gtc	ttg		1055
Arg	Lys	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val	Leu		
		260				265						270					
gag	aaa	aca	ttt	ggc	tac	cac	ata	cag	tac	ttt	gca	gag	aac	agc	act		1103
Glu	Lys	Thr	Phe	Gly	Tyr	His	Ile	Gln	Tyr	Phe	Ala	Glu	Asn	Ser	Thr		
		275				280					285						
aac	ctc	aca	gag	ata	aac	aac	atc	acc	acc	cag	cag	tat	gaa	ctg	ctt		1151
Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Gln	Gln	Tyr	Glu	Leu	Leu		
					295					300					305		
ctg	atg	agc	cag	gca	cac	tct	gtg	tcc	gtg	act	tct	ttt	aat	tct	ctt		1199
Leu	Met	Ser	Gln	Ala	His	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Ser	Phe	Asn	Ser	Leu		
				310				315							320		
ggc	aag	tcc	caa	gag	acc	atc	ctg	agg	atc	cca	gat	gtc	cat	gag	aag		1247
Gly	Lys	Ser	Gln	Glu	Thr	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Asp	Val	His	Glu	Lys		
			325					330						335			

acc ttc cag tac att aag agc atg cag gcc tac ata gcc gag ccc ctg	1295
Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro Leu	
340 345 350	
ttg gtg gtg aac tgg caa agc tcc att cct gcg gtg gac act tgg ata	1343
Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp Ile	
355 360 365	
gtg gag tgg ctc cca gaa gct gcc atg tcg aag ttc cct gcc ctt tcc	1391
Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu Ser	
370 375 380 385	
tgg gaa tct gtg tct cag gtc acg aac tgg acc atc gag caa gat aaa	1439
Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp Lys	
390 395 400	
cta aaa cct ttc aca tgc tat aat ata tca gtg tat cca gtg ttg gga	1487
Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu Gly	
405 410 415	
cac cga gtt gga gag ccg tat tca atc caa gct tat gcc aaa gaa gga	1535
His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly	
420 425 430	
act cca tta aaa ggt cct gag acc agg gtg gag aac atc ggt ctg agg	1583
Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu Arg	
435 440 445	
aca gcc acg atc aca tgg aag gag att cct aag agt gct agg aat gga	1631
Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn Gly	
450 455 460 465	
ttt atc aac aat tac act gta ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gaa	1679
Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Glu	
470 475 480	
ctc tcc aag act gtt aac tct cat gcc ctg cag tgt gac ctg gag tct	1727
Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu Ser	
485 490 495	
ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga	1775
Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg	
500 505 510	
gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc	1823
Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile	
515 520 525	
agt gtg ttt gaa att gtc ctt cta aca tct cta gtt gga gga ggc ctt	1871
Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu	
530 535 540 545	
ctt cta ctt agc atc aaa aca gtg act ttt ggc ctc aga aag cca aac	1919
Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro Asn	
550 555 560	
cgg ttg act ccc ctg tgt tgt cct gat gtt ccc aac cct gct gaa agt	1967
Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser	
565 570 575	
agt tta gcc aca tgg ctc gga gat ggt ttc aag aag tca aat atg aag	2015
Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met Lys	
580 585 590	

```

gag act gga aac tct ggg aac aca gaa gac gtg gtc cta aaa cca tgt 2063
Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro Cys
    595                600                605

ccc gtc ccc gcg gat ctc att gac aag ctg gta gtg aac ttt gag aat 2111
Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Asn
    610                615                620                625

ttt ctg gaa gta gtt ttg aca gag gaa gct gga aag ggt cag gcg agc 2159
Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala Ser
    630                635                640

att ttg gga gga gaa gcg aat gag tat atc tta tcc cag gaa cca agc 2207
Ile Leu Gly Glu Glu Ala Asn Glu Tyr Ile Leu Ser Gln Glu Pro Ser
    645                650                655

tgt cct ggc cat tgc tgaagctacc ctcaggggtcc aggacagctg tcttggtggc 2262
Cys Pro Gly His Cys
    660

acttgactct ggcaggaacc tgatctctac ttttcttctc cctgtctccg gacactttct 2322
ctccttcatg cagagaccag gactagagcg gattcctcat ggtttgccag gctcctcagt 2382
ccttgctcgg gctcaggatc ttcaacaatg ccctttctgg gacactccat catecactta 2442
tatttatctt ttgcaacatt gtggattgaa cccagggact tgtttatgcg cgcaacttca 2502
gtaactgtgg cagagactta ggaatggaga tctgaccctt tgcagaaggt ttctggacat 2562
ccgtccctgt gtgagcctca gacagcattg tctttacttt gaatcagctt ccaagttaat 2622
aaaagaaaaa cagagaggtg gcataacagc tctgtcttcc tgacctgctt gagttccagt 2682
tctgacttcc tttggtgatg aacagcaatg tgggaagtgt aagctgaata aaccctttcc 2742
tccccca
    2748

```

<210> 117  
 <211> 662  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 117

```

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

```

10

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

<210> 118  
 <211> 2728  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

5

<220>

<221> CDS  
 <222> (237)...(1877)

<400> 118

5

```

gatggggccc tgaatgttga tctgacagaa ttccagacca acctgggtggt tattgtcctt 60
ttcatctggt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaaggtgct gctgtccggg 120
ctctcagaga aggcagtgct ggagggcttc ctggcccggg tctcctccta ctgttcctgg 180
tagcccagcc ttctcgggggt ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239
                                                    Met
                                                    1

ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac 287
Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His
                    5                                10                                15

gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg 335
Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu
                    20                                25                                30

tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act 383
Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr
                    35                                40                                45

aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act 431
Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Thr
                    50                                55                                60                                65

tgc act tgg aga cca gag aag gaa acc aat gat acc agc tac att gtg 479
Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Val
                    70                                75                                80

act ttg act tac tcc tat gga aaa agc aat tat agt gac aat gct aca 527
Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala Thr
                    85                                90                                95

gag gct tca tat tct ttt ccc cgt tcc tgt gca atg ccc cca gac atc 575
Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp Ile
                    100                                105                                110

tgc agt gtt gaa gta caa gct caa aat gga gat ggt aaa gtt aaa tct 623
Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys Ser
                    115                                120                                125

gac atc aca tat tgg cat tta atc tcc ata gca aaa acc gaa cca cct 671
Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro
                    130                                135                                140                                145

ata att tta agt gtg aat cca att tgt aat aga atg ttc cag ata caa 719
Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile Gln
                    150                                155                                160

tgg aaa ccg cgt gaa aag act cgt ggg ttt cct tta gta tgc atg ctt 767
Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met Leu
                    165                                170                                175

cgg ttc aga act gtc aac agt agc cgc tgg acg gaa gtc aat ttt gaa 815
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu
                    180                                185                                190

aac tgt aaa cag gtc tgc aac ctc aca gga ctt cag gct ttc aca gaa 863
    
```

Asn 195	Cys	Lys	Gln	Val	Cys	Asn 200	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln 205	Ala	Phe	Thr	Glu	
tat 210	gtc Val	ctg Leu	gct Ala	cta Leu	cga Arg	ttc Phe	agg Arg	ttc Phe	aat Asn	gac Asp	tca Ser	aga Arg	tat Tyr	tgg Trp	agc Ser	911
aag Lys	tgg Trp	agc Ser	aaa Lys	gaa Glu	gaa Glu	acc Thr	aga Arg	gtg Val	act Thr	atg Met	gag Glu	gaa Glu	gtt Val	cca Pro	cat His	959
gtc Val	ctg Leu	gac Asp	ctg Leu	tgg Trp	aga Arg	att Ile	ctg Leu	gaa Glu	cca Pro	gca Ala	gac Asp	atg Met	aac Asn	gga Gly	gac Asp	1007
agg Arg	aag Lys	gtg Val	cga Arg	ttg Leu	ctg Leu	tgg Trp	aag Lys	aag Lys	gca Ala	aga Arg	gga Gly	gcc Ala	ccc Pro	gtc Val	ttg Leu	1055
gag Glu	aaa Lys	aca Thr	ttt Phe	ggc Gly	tac Tyr	cac His	ata Ile	cag Gln	tac Tyr	ttt Phe	gca Ala	gag Glu	aac Asn	agc Ser	act Thr	1103
aac Asn	ctc Leu	aca Thr	gag Glu	ata Ile	aac Asn	aac Asn	atc Ile	acc Thr	acc Thr	cag Gln	cag Gln	tat Tyr	gaa Glu	ctg Leu	ctt Leu	1151
ctg Leu	atg Met	agc Ser	cag Gln	gca Ala	cac His	tct Ser	gtg Val	tcc Ser	gtg Val	act Thr	tct Ser	ttt Phe	aat Asn	tct Ser	ctt Leu	1199
ggc Gly	aag Lys	tcc Ser	caa Gln	gag Glu	acc Thr	atc Ile	ctg Leu	agg Arg	atc Ile	cca Pro	gat Asp	gtc Val	cat His	gag Glu	aag Lys	1247
acc Thr	ttc Phe	cag Gln	tac Tyr	att Ile	aag Lys	agc Ser	atg Met	cag Gln	gcc Ala	tac Tyr	ata Ile	gcc Ala	gag Glu	ccc Pro	ctg Leu	1295
ttg Leu	gtg Val	gtg Val	aac Asn	tgg Trp	caa Gln	agc Ser	tcc Ser	att Ile	cct Pro	gcg Ala	gtg Val	gac Asp	act Thr	tgg Trp	ata Ile	1343
gtg Val	gag Glu	tgg Trp	ctc Leu	cca Pro	gaa Glu	gct Ala	gcc Ala	atg Met	tcg Ser	aag Lys	ttc Phe	cct Pro	gcc Ala	ctt Leu	tcc Ser	1391
tgg Trp	gaa Glu	tct Ser	gtg Val	tct Ser	cag Gln	gtc Val	acg Thr	aac Asn	tgg Trp	acc Thr	atc Ile	gag Glu	caa Gln	gat Asp	aaa Lys	1439
cta Leu	aaa Lys	cct Pro	ttc Phe	aca Thr	tgc Cys	tat Tyr	aat Asn	ata Ile	tca Ser	gtg Val	tat Tyr	cca Pro	gtg Val	ttg Leu	gga Gly	1487
cac His	cga Arg	ggt Val	gga Gly	gag Glu	ccg Pro	tat Tyr	tca Ser	atc Ile	caa Gln	gct Ala	tat Tyr	gcc Ala	aaa Lys	gaa Glu	gga Gly	1535
act Thr	cca Pro	tta Leu	aaa Lys	ggt Gly	cct Pro	gag Glu	acc Thr	agg Arg	gtg Val	gag Glu	aac Asn	atc Ile	ggt Gly	ctg Leu	agg Arg	1583



```

aca gcc acg atc aca tgg aag gag att cct aag agt gct agg aat gga 1631
Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn Gly
450 455 460 465

ttt atc aac aat tac act gta ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gaa 1679
Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Glu
470 475 480

ctc tcc aag act gtt aac tct cat gcc ctg cag tgt gac ctg gag tct 1727
Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu Ser
485 490 495

ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga 1775
Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg
500 505 510

gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc 1823
Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile
515 520 525

agt gag tac tgg ctt cag gcc tca ttc tgg agt tta ctt cgg gtt gga 1871
Ser Glu Tyr Trp Leu Gln Ala Ser Phe Trp Ser Leu Leu Arg Val Gly
530 535 540 545

aat gtt tgacaggagc aaggagagcc agcagagggc agcagagcat ggcttctctc 1927
Asn Val

```

```

gctctctctg gctcactcac ctcccaggag ttactgagga gctggcaaag ggagggctga 1987
gtagaccaaa caggccattt tgatccttgc tggtaagcag ccacaaataa tcttaagatg 2047
aagcaagcaa catccacttc agcctcagcc acgtcaaagg ctgttgccctg agctcacact 2107
ggccagttcc taaatgtcag gagttgtgca atagaacctg ggaaggaaca actggttgat 2167
cagaggtcac tgacaagggg cttaatgtta ccatctgceg tggggctttt gtttcgtttt 2227
gtttgtttgt tatgtgtatt caacttatca gcttttacgt tgaaaacatg aaaagcaaga 2287
caaatttggt agatatacaca tataatgtga aatataatag ttaataaatt gagtaggaaa 2347
gctgagggca tgtaatagac agaggggaaaa gaagaggaaa gccagtctgg tctacaaagt 2407
gagttccagg acagccaggg ctacatggag aaaccctgtc tcaatcaatc aatcaatcaa 2467
tcaatcagtc aatcaatcaa aattcaagca gcattgacaa gttttgcaat aactactata 2527
aaccacaaaa gtcatcttga tgtatctcag aagccccttg ttatttatgt tcctgaagac 2587
taaagtagac cgtggctctg agaaccatga gcaagataac acgttctgtc ctgcagccta 2647
acaatgcctt cttggtatcc tttttgatac aacttctaaa ataacttttt tttacacacaa 2707
ataaaaatca tgttacagct a 2728

```

- <210> 119
- <211> 547
- 5 <212> PRT
- <213> Mus musculus
  
- <400> 119

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

Ile Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys  
 115 120 125  
 Ser Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro  
 130 135 140  
 Pro Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile  
 145 150 155 160  
 Gln Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met  
 165 170 175  
 Leu Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe  
 180 185 190  
 Glu Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr  
 195 200 205  
 Glu Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp  
 210 215 220  
 Ser Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro  
 225 230 235 240  
 His Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly  
 245 250 255  
 Asp Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val  
 260 265 270  
 Leu Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser  
 275 280 285  
 Thr Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu  
 290 295 300  
 Leu Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro  
 340 345 350  
 Leu Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp  
 355 360 365  
 Ile Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu  
 370 375 380  
 Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp  
 385 390 395 400  
 Lys Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu  
 405 410 415  
 Gly His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu  
 420 425 430  
 Gly Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu  
 435 440 445  
 Arg Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn  
 450 455 460  
 Gly Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys  
 465 470 475 480  
 Glu Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu  
 485 490 495  
 Ser Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr  
 500 505 510  
 Arg Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser  
 515 520 525  
 Ile Ser Glu Tyr Trp Leu Gln Ala Ser Phe Trp Ser Leu Leu Arg Val  
 530 535 540  
 Gly Asn Val  
 545

<210> 120  
 <211> 2196  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> polinucleótido degenerado de la SEC ID N°: 111

<221> misc\_feature  
 <222> (1)...(2196)  
 <223> n = A, T, C o G

5 <400> 120

```

atgatgtgga cntgggcnyt ntggatgytn ccnwsnytnt gyaarttyws nytngcngcn 60
ytnccngcna arccngaraa yathwsntgy gtntaytayt aymgnaaraa yytnacntgy 120
acntggwsnc cnggnaarga racnwsntay acncartaya cngtnaarmg nacntaygcn 180
ttyggngara arcaygayaa ytgyacnacn aaywsnwsna cnwsngaraa ymgngcnwsn 240
tgywsnttyt tyytnccnmg nathacnath ccngayaayt ayacnathga rgtngargcn 300
garaayggng ayggngtnat haarwsncay atgacntayt ggmngnytnga raayathgcn 360
aaracngarc cncnnaarat httymngtn aarccngtny tnggnathaa rmgntatgath 420
carathgart ggathaarcc ngarytngcn ccngtnwsnw sngayytnaa rtayacnytn 480
mgnttymgna cngtnaayws nacnwsntgg atggargtna ayttygcnaa raaymgnaar 540
gayaaraayc aracntayaa yytnacnggn ytnarcnt tyacngarta ygtnathgcn 600
ytngmngtgyg cngtnaarga rwsnaartty tggwsngayt ggwsncarga raaratgggn 660
atgacngarg argargcncc ntgyggnytn garyntggm gngtnytnaa rccngcngar 720
gcngayggnm gnmngcngt nmngnytnytn tggaraarg cnmngngngc nccngtnytn 780
garaaracny tngntayaa yathtggtay tayccngarw snaayacnaa yytnacngar 840
acnatgaaya cnacnaayca rcarytngar ytncayytng gngnggarws ntttygggt 900
wsnatgathw sntayaayws nytnggnaar wsnccngtny cncnytnmg nathccngcn 960
athcargara arwsnttyca rtgyathgar gtatgcarg cntgygtngc ngargaycar 1020
ytngtngtna artggcarws nwsngcnyn yagytnaaya cntggatgat hgartggty 1080
ccngaygtng aywsngarcc nacnacnytn wsntgggarw sngtnwsnca rgcnacnaay 1140
tggacnathc arcargayaa rytnaarccn ttytggtyt ayaayathws ngntayccn 1200
atgytncayg ayaargtngg ngarccntay wsnathcarg cntaygcnaa rgarggngtn 1260
ccnwsngarg gncngarac naargtngar aayathggng tnaaracngt nacnathacn 1320
tggargara thccnaarws ngarmgnaar ggnathatht gyaaytayac nathhttyay 1380
cargcngarg gnggnaargg nttywsnaar acngtnaayw snwsnathyt ncartayggn 1440
ytngngnytn tnaarmgnaa racnwsntay athgtncarg tnatggcnws nacnwsngcn 1500
gngngnacna ayggnacnws nathaaytty aaracnytnw snttywsngt ntttygarath 1560
athytnatha cnwsnytnat hggngngngn ytnytnathy tnathathyt nacngtngcn 1620
tayggnytna araarccnaa yaarytnacn cayytnygyt ggcncacngt nccnaayccn 1680
gcngarwsnw snathgcnac ntggcayggn gaygayt tya argayaaryt naayytnaar 1740
garwsngayg aywsngtnaa yacngargay mgnathytna arccntgyws nacnccnwsn 1800
gayaarytng tnathgayaa rytngtngtn aaytgygna aygtnytnca rgarathty 1860
acngaygarg cnmgnacngg ncargaraay aaytngngng gngaraaraa yggntaygtn 1920
acntgyccnt tymgncnga ytgyccnytn ggnaarwsnt tygargaryt nccngtnwsn 1980
ccngarathc cncnmgnaa rwsncartay ytnmgnwsnm gnatgccnga rggnacngmgn 2040
ccngargcna argarcaryt nytnttywsn ggncarwsny tngtncnga ycayytnygy 2100
gargarggng cncnnaaycc ntayytnaar aaywsngtna cngcnmgnga rtttytngtn 2160
wsngaraary tncngaraca yacnaarggn gargtn 2196
    
```

<210> 121  
 10 <211> 1947  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> polinucleótido degenerado de la SEC ID N°: 109  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(1947)  
 <223> n = A, G, C o G

20 <400> 121

```

atgatgtgga cntgggcnyt ntggatgytn ccnwsnytnt gyaarttyws nytngcngcn 60
ytnccngcna arccngaraa yathwsntgy gtntaytayt aymgnaaraa yytnacntgy 120
acntggwsnc cnggnaarga racnwsntay acncartaya cngtnaarmg nacntaygcn 180
ttyggngara arcaygayaa ytgyacnacn aaywsnwsna cnwsngaraa ymgngcnwsn 240
    
```

tgywsnttyt	tyytnccnmg	nathacnath	ccngayaayt	ayacnathga	rgtngargcn	300
garaayggng	ayggngtnat	haarwsncay	atgacntayt	ggmgnytnga	raayathgcn	360
aaracngarc	cncnnaarat	httymgngtn	aarccngtny	tnggnathaa	rmgnatgath	420
carathgart	ggathaarcc	ngarytngcn	ccngtnwsnw	sngayytnaa	rtayacnytn	480
mgnttymgna	cngtnaayws	nacnwsntgg	atggargtga	ayttygcnaa	raaymgnaar	540
gayaaraayc	aracntayaa	yytnacnggn	ytncarcnt	tyacngarta	ygtnathgcn	600
ytrmgntgyg	cngtnaarga	rwsnaartty	tggwsngayt	ggwsncarga	raaratgggn	660
atgacngarg	argargcnc	ntgyggnytn	garytntggm	gngtnytnaa	rccngcngar	720
gcngayggnm	gnmgncngt	nmgnytnytn	tggaaraarg	cnmgnggngc	nccngtnytn	780
garaaracny	tnggntayaa	yathtggtay	tayccngarw	snaayacnaa	yytnacngar	840
acnatgaaya	cnacnaayca	rcarytngar	ytncayytng	gnggngarws	nttytgggtg	900
wsnatgathw	sntayaayws	nytnngnaar	wsnccngtng	cnacnytnmg	nathccngcn	960
athcargara	arwsnttyca	rtgyathgar	gtnatgcarg	cntgygtngc	ngargaycar	1020
ytngtngtna	artggcarws	nwsngcnytn	gaygtnaaya	cntggatgat	hgartggtty	1080
ccngaygtng	aywsngarcc	nacnacnytn	wsntgggarw	sngtnwsnca	rgcnacnaay	1140
tggaacnathc	arcargayaa	rytnaarccn	ttytgggtgyt	ayaayathws	ngtntayccn	1200
atgytncaayg	ayaargtngg	ngarccntay	wsnathcarg	cntaygcnaa	rgarggngtn	1260
ccnwsngarg	gnccngarac	naargtngar	aayathggng	tnaaracngt	nacnathacn	1320
tggaargara	thccnaarws	ngarmgnaar	ggcnathatht	gyaaytayac	nathtttytay	1380
cargcngarg	gnggnaargg	nttywsnaar	acngtnaayw	snwsnathyt	ncartayggg	1440
ytngarwsny	tnaarmgnaa	racnwsntay	athgtncarg	tnatggcnws	nacnwsngcn	1500
ggnggnacna	ayggnacnws	nathaaytty	aaracnytnw	snttywsngt	nttygarath	1560
athytnatha	cnwsnytnat	hggnggnggn	ytnytnathy	tnathathyt	nacngtngcn	1620
taygnytna	araarccnaa	yaarytnacn	cayytntgyt	ggccnacngt	nccnaayccn	1680
gcngarwsnw	snathgcnac	ntggcayggg	gaygayttya	argayaaryt	naayytnaar	1740
garwsngayg	aywsngtnaa	yacngargay	mgnathytna	arccntgyws	nacnccnwsn	1800
gayaarytng	tnathgayaa	rytngtngtn	aayttyggna	aygtnytnca	rgarathtty	1860
acngaygarg	cnmgnacngg	ncargaraay	aayytnggng	gngaraaraa	yggnacnmgn	1920
athytnwsnw	sntgyccnac	nwsnath				1947

<210> 122  
 <211> 1986  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> polinucleótido degenerado de la SEC ID N°: 5  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(1986)  
 <223> n = A, T, C o G

<400> 122  
 15

atgaarytnw	sncncarcc	nwsntgygtn	aayytnggna	tgatgtggac	ntgggcnytn	60
tggatgytnc	cnwsnytnng	yaarttywsn	ytngcngcny	tncncngcnaa	rccngaraay	120
athwsntgyg	tnataytaya	ymgnaaraay	ytncntgya	cntggwsncc	nggnaargar	180
acnwsntaya	cncartayac	ngtnaarmgn	acntaygcnt	tyggngaraa	rcaygayaay	240
tgyacnacna	aywsnwsnac	nwsngaraay	mngncnwsnt	gywsnttytt	yytnccnmgn	300
athacnathc	cngayaayta	yacnathgar	gtngargcng	araayggnga	yggngtnath	360
aarwsncaya	tgacontaytg	gmgnytngar	aayathgcna	aracngarcc	nccnaarath	420
ttymngntna	arccngtnyt	nggnathaar	mgnatgathc	arathgartg	gathaarccn	480
garytngcnc	cngtnwsnws	ngayytnaar	tayacnytnm	gnttymgnac	ngtnaaywsn	540
acnwsntgga	tggargtnaa	ytttygcnaar	aaymgnaarg	ayaaraayca	racntayaay	600
ytncacnggny	tnarccontt	yacngartay	gtathgcny	tnmgntgygc	ngtnaargar	660
wsnaarttyt	ggwsngaytg	gwsncargar	aaaratgggna	tgacngarga	rgargcncn	720
tgyggnytnng	arytntggmg	ngtnytnaar	ccngcngarg	cngayggngm	nmgnccngtn	780
mgnytntyt	ggaaraargc	nmgnngngcn	ccngtntng	araaracnyt	nggntayaay	840
athtggtayt	ayccngarws	naayacnaay	ytncngara	cnatgaayac	nacnaaycar	900
carytngary	tncaaytngg	nggngarwsn	tttygggtnw	snatgathws	ntayaaywsn	960
ytnggnaarw	sncncngtngc	nacnytnmgn	athccngcna	thcargaraa	rwsnttycar	1020
tgyathgarg	tnatgcargc	ntgygtngcn	gargaycary	tngtngtnaa	rtggcarwsn	1080
wsngcnytnng	aygtnaayac	ntggatgath	gartggttyc	cngaygtnga	ywsngarccn	1140
acnacnytnw	sntgggarws	ngtnwsncar	gcnacnaayt	ggacnathca	rcargayaar	1200

ytnaarccnt	tytgggtgyta	yaayathwsn	gtntayccna	tgytncayga	yaargtnggn	1260
garccntayw	snathcargc	ntaygcnaar	gargngtnc	cnwsngargg	nccngaracn	1320
aargtngara	ayathggngt	naaracngtn	acnathacnt	ggaargarat	hccnaarwsn	1380
garmgnaarg	gnathathtg	yaaytayaacn	athhtytayc	argcngargg	nggnaarggn	1440
ttywsnaara	cngtnaayws	nwsnathytn	cartayggny	tngarwsnyt	naarmgnaar	1500
acnwsntaya	thgtncargt	natggcnwsn	acnwsngcng	gnggnacnaa	yggnacnwsn	1560
athaayctya	aracnytnws	nttywsngtn	tygaratha	thytnathac	nwsnytnath	1620
ggngngngny	tnytathyt	nathathytn	acngtngcnt	ayggnytnaa	raarccnaay	1680
aarytnacnc	aytntgytg	gccnacngtn	ccnaayccng	cngarwsnws	nathgcnacn	1740
tggcayggng	aygayttyaa	rgayaarytn	aayytnaarg	arwsngayga	ywsngtnaay	1800
acngargaym	gnathytnaa	rccntgywsn	acnccnwsng	ayaarytngt	nathgayaar	1860
ytngtngtna	ayttyggnaa	ygtnytnar	garathhtya	cngaygargc	nmgnacnggn	1920
cargaraaya	aytngggngg	ngaraaraay	ggnacnmgna	thytnwsnws	ntgyccnacn	1980
wsnath						1986

- <210> 123
- <211> 19
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 10 <223> Cebador oligonucleotídico ZC38.239
  
- <400> 123
- gccgactaag ccagagaac 19
  
- <210> 124
- 15 <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 20 <223> Cebador oligonucleotídico ZC38.245
  
- <400> 124
- ctgttgacag ttctgaaccg 20
  
- 25 <210> 125
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 546 797 T3

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC38,238

<400> 125

5 cgcggttcc attgatctg 20

<210> 126

<211> 2748

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (237)...(2222)

15

<400> 126

```
gatggggccc tgaatggtga tctgacagaa ttccagacca acctggtggt tattgtcctt 60
ttcatctggt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaagggtgct gctgtccggg 120
ctctcagaga aggcagtgct ggaggcgctc ctggcccggg tctcctccta ctgttcctgg 180
tagcccagcc ttctcggggg ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239
Met
```

ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac	287
Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His	
5 10 15	
gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg	335
Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu	
20 25 30	
tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act	383
Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr	
35 40 45	
aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act	431
Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Thr	
50 55 60 65	
tgc act tgg aga cca gag aag gaa acc aat gat acc agc tac att gtg	479
Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Val	
70 75 80	
act ttg act tac tcc tat gga aaa agc aat tat agt gac aat gct aca	527
Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala Thr	
85 90 95	
gag gct tca tat tct ttt ccc cgt tcc tgt gca atg ccc cca gac atc	575
Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp Ile	
100 105 110	
tgc agt gtt gaa gta caa gct caa aat gga gat ggt aaa gtt aaa tct	623
Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys Ser	
115 120 125	
gac atc aca tat tgg cat tta atc tcc ata gca aaa acc gaa cca cct	671
Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro	
130 135 140 145	
ata att tta agt gtg aat cca att tgt aat aga atg ttc cag ata caa	719
Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile Gln	
150 155 160	
tgg aaa ccg cgt gaa aag act cgt ggg ttt cct tta gta tgc atg ctt	767
Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met Leu	
165 170 175	
cgg ttc aga act gtc aac agt agc cgc tgg acg gaa gtc aat ttt gaa	815
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu	
180 185 190	
aac tgt aaa cag gtc tgc aac ctc aca gga ctt cag gct ttc aca gaa	863
Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr Glu	
195 200 205	
tat gtc ctg gct cta cga ttc agg ttc aat gac tca aga tat tgg agc	911
Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp Ser	
210 215 220 225	
aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtg act atg gag gaa gtt cca cat	959
Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro His	
230 235 240	
gtc ctg gac ctg tgg aga att ctg gaa cca gca gac atg aac gga gac	1007



Val	Leu	Asp	Leu	Trp	Arg	Ile	Leu	Glu	Pro	Ala	Asp	Met	Asn	Gly	Asp		
			245					250					255				
agg	aag	gtg	cga	ttg	ctg	tgg	aag	aag	gca	aga	gga	gcc	ccc	gtc	ttg	1055	
Arg	Lys	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val	Leu		
		260					265					270					
gag	aaa	aca	ttt	ggc	tac	cac	ata	cag	tac	ttt	gca	gag	aac	agc	act	1103	
Glu	Lys	Thr	Phe	Gly	Tyr	His	Ile	Gln	Tyr	Phe	Ala	Glu	Asn	Ser	Thr		
	275					280					285						
aac	ctc	aca	gag	ata	aac	aac	atc	acc	acc	cag	cag	tat	gaa	ctg	ctt	1151	
Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Gln	Gln	Tyr	Glu	Leu	Leu		
290					295					300					305		
ctg	atg	agc	cag	gca	cac	tct	gtg	tcc	gtg	act	tct	ttt	aat	tct	ctt	1199	
Leu	Met	Ser	Gln	Ala	His	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Ser	Phe	Asn	Ser	Leu		
				310					315					320			
ggc	aag	tcc	caa	gag	acc	atc	ctg	agg	atc	cca	gat	gtc	cat	gag	aag	1247	
Gly	Lys	Ser	Gln	Glu	Thr	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Asp	Val	His	Glu	Lys		
			325					330					335				
acc	ttc	cag	tac	att	aag	agc	atg	cag	gcc	tac	ata	gcc	gag	ccc	ctg	1295	
Thr	Phe	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ser	Met	Gln	Ala	Tyr	Ile	Ala	Glu	Pro	Leu		
		340					345					350					
ttg	gtg	gtg	aac	tgg	caa	agc	tcc	att	cct	gcg	gtg	gac	act	tgg	ata	1343	
Leu	Val	Val	Asn	Trp	Gln	Ser	Ser	Ile	Pro	Ala	Val	Asp	Thr	Trp	Ile		
	355					360					365						
gtg	gag	tgg	ctc	cca	gaa	gct	gcc	atg	tcg	aag	ttc	cct	gcc	ctt	tcc	1391	
Val	Glu	Trp	Leu	Pro	Glu	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Phe	Pro	Ala	Leu	Ser		
370					375					380					385		
tgg	gaa	tct	gtg	tct	cag	gtc	acg	aac	tgg	acc	atc	gag	caa	gat	aaa	1439	
Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Val	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Glu	Gln	Asp	Lys		
				390					395					400			
cta	aaa	cct	ttc	aca	tgc	tat	aat	ata	tca	gtg	tat	cca	gtg	ttg	gga	1487	
Leu	Lys	Pro	Phe	Thr	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	Val	Leu	Gly		
			405					410					415				
cac	cga	ggt	gga	gag	ccg	tat	tca	atc	caa	gct	tat	gcc	aaa	gaa	gga	1535	
His	Arg	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	Lys	Glu	Gly		
		420					425					430					
act	cca	tta	aaa	ggt	cct	gag	acc	agg	gtg	gag	aac	atc	ggt	ctg	agg	1583	
Thr	Pro	Leu	Lys	Gly	Pro	Glu	Thr	Arg	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Leu	Arg		
	435					440					445						
aca	gcc	acg	atc	aca	tgg	aag	gag	att	cct	aag	agt	gct	agg	aat	gga	1631	
Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn	Gly		
450					455					460					465		
ttt	atc	aac	aat	tac	act	gta	ttt	tac	caa	gct	gaa	ggt	gga	aaa	gaa	1679	
Phe	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Val	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Glu		
				470					475					480			
ctc	tcc	aag	act	ggt	aac	tct	cat	gcc	ctg	cag	tgt	gac	ctg	gag	tct	1727	
Leu	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	His	Ala	Leu	Gln	Cys	Asp	Leu	Glu	Ser		
			485					490					495				

```

ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga 1775
Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg
      500                      505                      510

gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc 1823
Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile
      515                      520                      525

agt gtg ttt gaa att gtc ctt cta aca tct cta gtt gga gga ggc ctt 1871
Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu
530                      535                      540                      545

ctt cta ctt agc atc aaa aca gtg act ttt ggc ctc aga aag cca aac 1919
Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro Asn
      550                      555                      560

cgg ttg act ccc ctg tgt tgt cct gat gtt ccc aac cct gct gaa agt 1967
Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser
      565                      570                      575

agt tta gcc aca tgg ctc gga gat ggt ttc aag aag tca aat atg aag 2015
Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met Lys
      580                      585                      590

gag act gga aac tct ggg aac aca gaa gac gtg gtc cta aaa cca tgt 2063
Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro Cys
      595                      600                      605

ccc gtc ccc gcg gat ctc att gac aag ctg gta gtg aac ttt gag aat 2111
Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Asn
610                      615                      620                      625

ttt ctg gaa gta gtt ttg aca gag gaa gct gga aag ggt cag gcg agc 2159
Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala Ser
      630                      635                      640

att ttg gga gga gaa gcg aat gag tat atc tta tcc cag gaa cca agc 2207
Ile Leu Gly Glu Glu Ala Asn Glu Tyr Ile Leu Ser Gln Glu Pro Ser
      645                      650                      655

tgt cct ggc cat tgc tgaagctacc ctcagggctcc aggacagctg tcttggtggc 2262
Cys Pro Gly His Cys
      660

acttgactct ggcaggaacc tgaactctac ttttcttctc cctgtctccg gacactttct 2322
ctccttcctg cagagaccag gactagagcg gattcctcat ggtttgccag gtcctcagc 2382
ccttgctcgg gctcaggatc ttcaacaatg ccctttctgg gacactccat catccactta 2442
tatttatttt ttgcaacatt gtggattgaa cccagggact tgtttatgcg cgcaacttca 2502
gtaactgtgg cagagactta ggaatggaga tctgaccctt tgcagaaggt ttctggacat 2562
ccgtccctgt gtgagcctca gacagcattg tctttacttt gaatcagctt ccaagttaat 2622
aaaagaaaaa cagagagggtg gcataacagc tcttgcttcc tgacctgctt gagttccagt 2682
tctgacttcc tttggtgatg aacagcaatg tgggaagtgt aagctgaata aaccctttcc 2742
tccccca
      2748

```

<210> 127  
 <211> 662  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 127

```

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

```

10

			20					25				30			
Leu	Trp	Ala	Phe	Ser	Phe	Leu	Cys	Lys	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Leu	Pro
		35					40					45			
Thr	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Cys	Val	Phe	Tyr	Phe	Asp	Arg	Asn	Leu
	50					55					60				
Thr	Cys	Thr	Trp	Arg	Pro	Glu	Lys	Glu	Thr	Asn	Asp	Thr	Ser	Tyr	Ile
65					70					75				80	
Val	Thr	Leu	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Lys	Ser	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asn	Ala
				85						90				95	
Thr	Glu	Ala	Ser	Tyr	Ser	Phe	Pro	Arg	Ser	Cys	Ala	Met	Pro	Pro	Asp
			100					105					110		
Ile	Cys	Ser	Val	Glu	Val	Gln	Ala	Gln	Asn	Gly	Asp	Gly	Lys	Val	Lys
	115					120						125			
Ser	Asp	Ile	Thr	Tyr	Trp	His	Leu	Ile	Ser	Ile	Ala	Lys	Thr	Glu	Pro
	130					135					140				
Pro	Ile	Ile	Leu	Ser	Val	Asn	Pro	Ile	Cys	Asn	Arg	Met	Phe	Gln	Ile
145					150					155				160	
Gln	Trp	Lys	Pro	Arg	Glu	Lys	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	Leu	Val	Cys	Met
				165					170					175	
Leu	Arg	Phe	Arg	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Arg	Trp	Thr	Glu	Val	Asn	Phe
			180					185					190		
Glu	Asn	Cys	Lys	Gln	Val	Cys	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Phe	Thr
	195						200					205			
Glu	Tyr	Val	Leu	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg	Phe	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Trp
	210					215					220				
Ser	Lys	Trp	Ser	Lys	Glu	Glu	Thr	Arg	Val	Thr	Met	Glu	Glu	Val	Pro
225					230					235					240
His	Val	Leu	Asp	Leu	Trp	Arg	Ile	Leu	Glu	Pro	Ala	Asp	Met	Asn	Gly
			245						250					255	
Asp	Arg	Lys	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val
			260					265					270		
Leu	Glu	Lys	Thr	Phe	Gly	Tyr	His	Ile	Gln	Tyr	Phe	Ala	Glu	Asn	Ser
	275						280					285			
Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Gln	Gln	Tyr	Glu	Leu
	290					295					300				
Leu	Leu	Met	Ser	Gln	Ala	His	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Ser	Phe	Asn	Ser
305					310					315					320
Leu	Gly	Lys	Ser	Gln	Glu	Thr	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Asp	Val	His	Glu
				325					330					335	
Lys	Thr	Phe	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ser	Met	Gln	Ala	Tyr	Ile	Ala	Glu	Pro
			340					345					350		
Leu	Leu	Val	Val	Asn	Trp	Gln	Ser	Ser	Ile	Pro	Ala	Val	Asp	Thr	Trp
		355					360					365			
Ile	Val	Glu	Trp	Leu	Pro	Glu	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Phe	Pro	Ala	Leu
	370					375					380				
Ser	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Val	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Glu	Gln	Asp
385					390					395					400
Lys	Leu	Lys	Pro	Phe	Thr	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	Val	Leu
				405					410					415	
Gly	His	Arg	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	Lys	Glu
			420					425					430		
Gly	Thr	Pro	Leu	Lys	Gly	Pro	Glu	Thr	Arg	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Leu
		435					440					445			
Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn
	450					455						460			
Gly	Phe	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Val	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys
465					470					475					480
Glu	Leu	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	His	Ala	Leu	Gln	Cys	Asp	Leu	Glu
				485					490					495	
Ser	Leu	Thr	Arg	Arg	Thr	Ser	Tyr	Thr	Val	Trp	Val	Met	Ala	Ser	Thr
			500					505					510		
Arg	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Val	Arg	Ile	Asn	Phe	Lys	Thr	Leu	Ser
		515					520					525			

```

Ile Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Gly
 530          535          540
Leu Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro
545          550          555          560
Asn Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu
          565          570          575
Ser Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met
          580          585          590
Lys Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro
          595          600          605
Cys Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu
610          615          620
Asn Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala
625          630          635          640
Ser Ile Leu Gly Gly Glu Ala Asn Glu Tyr Ile Leu Ser Gln Glu Pro
          645          650          655
Ser Cys Pro Gly His Cys
          660
    
```

<210> 128  
 <211> 2728  
 5 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (237)...(1877)

<400> 128

```

gatggggccc tgaatgttga tctgacagaa ttccagacca acctggtggt tattgtcctt 60
ttcatctggt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaaggtgct gctgtccggg 120
ctctcagaga aggcagtgct ggaggcgctc ctggcccggg tctctccta ctgttcctgg 180
tagcccagcc ttctcgggggt ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239
                                                    Met
                                                    1

ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac 287
Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His
          5          10          15

gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg 335
Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu
          20          25          30

tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act 383
Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr
          35          40          45

aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act 431
Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Thr
          50          55          60          65

tgc act tgg aga cca gag aag gaa acc aat gat acc agc tac att gtg 479
Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Val
          70          75          80

act ttg act tac tcc tat gga aaa agc aat tat agt gac aat gct aca 527
Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala Thr
          85          90          95

gag gct tca tat tct ttt ccc cgt tcc tgt gca atg ccc cca gac atc 575
Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp Ile
    
```

100	105	110	
tgc agt gtt gaa gta caa gct caa aat gga gat ggt aaa gtt aaa tct 623			
Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys Ser			
115	120	125	
gac atc aca tat tgg cat tta atc tcc ata gca aaa acc gaa cca cct 671			
Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro			
130	135	140	145
ata att tta agt gtg aat cca att tgt aat aga atg ttc cag ata caa 719			
Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile Gln			
	150	155	160
tgg aaa ccg cgt gaa aag act cgt ggg ttt cct tta gta tgc atg ctt 767			
Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met Leu			
	165	170	175
cgg ttc aga act gtc aac agt agc cgc tgg acg gaa gtc aat ttt gaa 815			
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu			
	180	185	190
aac tgt aaa cag gtc tgc aac ctc aca gga ctt cag gct ttc aca gaa 863			
Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr Glu			
	195	200	205
tat gtc ctg gct cta cga ttc agg ttc aat gac tca aga tat tgg agc 911			
Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp Ser			
210	215	220	225
aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtg act atg gag gaa gtt cca cat 959			
Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro His			
	230	235	240
gtc ctg gac ctg tgg aga att ctg gaa cca gca gac atg aac gga gac 1007			
Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly Asp			
	245	250	255
agg aag gtg cga ttg ctg tgg aag aag gca aga gga gcc ccc gtc ttg 1055			
Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val Leu			
	260	265	270
gag aaa aca ttt ggc tac cac ata cag tac ttt gca gag aac agc act 1103			
Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser Thr			
	275	280	285
aac ctc aca gag ata aac aac atc acc acc cag cag tat gaa ctg ctt 1151			
Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu Leu			
	290	295	300
ctg atg agc cag gca cac tct gtg tcc gtg act tct ttt aat tct ctt 1199			
Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser Leu			
	310	315	320
ggc aag tcc caa gag acc atc ctg agg atc cca gat gtc cat gag aag 1247			
Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu Lys			
	325	330	335
acc ttc cag tac att aag agc atg cag gcc tac ata gcc gag ccc ctg 1295			
Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro Leu			
	340	345	350
ttg gtg gtg aac tgg caa agc tcc att cct gcg gtg gac act tgg ata 1343			

Leu	Val	Val	Asn	Trp	Gln	Ser	Ser	Ile	Pro	Ala	Val	Asp	Thr	Trp	Ile		
	355					360					365						
gtg	gag	tgg	ctc	cca	gaa	gct	gcc	atg	tcg	aag	ttc	cct	gcc	ctt	tcc	1391	
Val	Glu	Trp	Leu	Pro	Glu	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Phe	Pro	Ala	Leu	Ser		
370					375					380					385		
tgg	gaa	tct	gtg	tct	cag	gtc	acg	aac	tgg	acc	atc	gag	caa	gat	aaa	1439	
Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Val	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Glu	Gln	Asp	Lys		
				390					395					400			
cta	aaa	cct	ttc	aca	tgc	tat	aat	ata	tca	gtg	tat	cca	gtg	ttg	gga	1487	
Leu	Lys	Pro	Phe	Thr	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	Val	Leu	Gly		
			405					410					415				
cac	cga	gtt	gga	gag	ccg	tat	tca	atc	caa	gct	tat	gcc	aaa	gaa	gga	1535	
His	Arg	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	Lys	Glu	Gly		
		420					425					430					
act	cca	tta	aaa	ggt	cct	gag	acc	agg	gtg	gag	aac	atc	ggt	ctg	agg	1583	
Thr	Pro	Leu	Lys	Gly	Pro	Glu	Thr	Arg	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Leu	Arg		
	435					440					445						
aca	gcc	acg	atc	aca	tgg	aag	gag	att	cct	aag	agt	gct	agg	aat	gga	1631	
Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn	Gly		
	450				455					460					465		
ttt	atc	aac	aat	tac	act	gta	ttt	tac	caa	gct	gaa	ggt	gga	aaa	gaa	1679	
Phe	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Val	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Glu		
				470					475					480			
ctc	tcc	aag	act	gtt	aac	tct	cat	gcc	ctg	cag	tgt	gac	ctg	gag	tct	1727	
Leu	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	His	Ala	Leu	Gln	Cys	Asp	Leu	Glu	Ser		
			485					490					495				
ctg	aca	cga	agg	acc	tct	tat	act	gtt	tgg	gtc	atg	gcc	agc	acc	aga	1775	
Leu	Thr	Arg	Arg	Thr	Ser	Tyr	Thr	Val	Trp	Val	Met	Ala	Ser	Thr	Arg		
		500					505					510					
gct	gga	ggt	acc	aac	ggg	gtg	aga	ata	aac	ttc	aag	aca	ttg	tca	atc	1823	
Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Val	Arg	Ile	Asn	Phe	Lys	Thr	Leu	Ser	Ile		
	515					520					525						
agt	gag	tac	tgg	ctt	cag	gcc	tca	ttc	tgg	agt	tta	ctt	cgg	ggt	gga	1871	
Ser	Glu	Tyr	Trp	Leu	Gln	Ala	Ser	Phe	Trp	Ser	Leu	Leu	Arg	Val	Gly		
	530				535					540				545			
aat	gtt	tgacaggagc	aaggagagcc	agcagagggc	agcagagcat	ggcttctcct										1927	
Asn	Val																
gctctctctg	gctcactcac	ctcccaggag	ttactgagga	gctggcaaag	ggagggctga	1987											
gtagaccaa	caggccattt	tgatccttgc	tggttaagcag	ccacaaataa	tcttaagatg	2047											
aagcaagcaa	catccacttc	agcctcagcc	acgtcaaagg	ctggtgctg	agctcacact	2107											
ggccagttcc	taaatgtcag	gagttgtgca	atagaacctg	ggaaggaaca	actggttgat	2167											
cagaggtcac	tgacaaggga	cttaagtgtta	ccatctgcgg	tggggctttt	gtttcgtttt	2227											
gtttgtttgt	tatgtgtatt	caacttatca	gcttttacgt	tgaaaacatg	aaaagcaaga	2287											
caaatttgtt	agatatcaca	tataatgtga	aatataatag	tttaataatt	gagtaggaaa	2347											
gctgagggca	tgtaatagac	agagggaaaa	gaagaggaaa	gccagtctgg	tctacaaagt	2407											
gagttccagg	acagccaggg	ctacatggag	aaacctgtc	tcaatcaatc	aatcaatcaa	2467											
tcaatcagtc	aatcaatcaa	aattcaagca	gcattgacaa	gttttgcaat	aactactata	2527											
aaccaaaaaa	gtcatcttga	tgtatctcag	aagccccttg	ttatttatgt	tcctgaagac	2587											
taaagtagac	cgtggctctg	agaacctatga	gcaagataac	acgttctgtc	ctgcagccta	2647											

acaatgcctt cctggatttc tttttgatac aacttctaaa ataacttttt tttaaaaaaa 2707  
ataaaaaatca tgttacagct a 2728

- <210> 129
- <211> 547
- 5 <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 129

Met	Leu	Ser	Ser	Gln	Lys	Gly	Ser	Cys	Ser	Gln	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala
1				5					10					15	
His	Val	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	Asn	Ala	Gly	Ile	Met	Trp	Thr	Leu	Ala
			20					25					30		
Leu	Trp	Ala	Phe	Ser	Phe	Leu	Cys	Lys	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Leu	Pro
		35					40					45			
Thr	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Cys	Val	Phe	Tyr	Phe	Asp	Arg	Asn	Leu
	50					55					60				
Thr	Cys	Thr	Trp	Arg	Pro	Glu	Lys	Glu	Thr	Asn	Asp	Thr	Ser	Tyr	Ile
65				70						75					80
Val	Thr	Leu	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Lys	Ser	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asn	Ala
				85					90					95	
Thr	Glu	Ala	Ser	Tyr	Ser	Phe	Pro	Arg	Ser	Cys	Ala	Met	Pro	Pro	Asp
			100					105					110		
Ile	Cys	Ser	Val	Glu	Val	Gln	Ala	Gln	Asn	Gly	Asp	Gly	Lys	Val	Lys
		115					120					125			
Ser	Asp	Ile	Thr	Tyr	Trp	His	Leu	Ile	Ser	Ile	Ala	Lys	Thr	Glu	Pro
	130					135					140				
Pro	Ile	Ile	Leu	Ser	Val	Asn	Pro	Ile	Cys	Asn	Arg	Met	Phe	Gln	Ile
145					150					155					160
Gln	Trp	Lys	Pro	Arg	Glu	Lys	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	Leu	Val	Cys	Met
				165					170					175	
Leu	Arg	Phe	Arg	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Arg	Trp	Thr	Glu	Val	Asn	Phe
			180					185					190		
Glu	Asn	Cys	Lys	Gln	Val	Cys	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Phe	Thr
		195					200					205			
Glu	Tyr	Val	Leu	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg	Phe	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Trp
	210					215					220				
Ser	Lys	Trp	Ser	Lys	Glu	Glu	Thr	Arg	Val	Thr	Met	Glu	Glu	Val	Pro
225					230					235					240
His	Val	Leu	Asp	Leu	Trp	Arg	Ile	Leu	Glu	Pro	Ala	Asp	Met	Asn	Gly
			245						250					255	
Asp	Arg	Lys	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val
			260					265					270		
Leu	Glu	Lys	Thr	Phe	Gly	Tyr	His	Ile	Gln	Tyr	Phe	Ala	Glu	Asn	Ser
		275					280					285			
Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Gln	Gln	Tyr	Glu	Leu
	290					295					300				
Leu	Leu	Met	Ser	Gln	Ala	His	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Ser	Phe	Asn	Ser
305					310					315				320	
Leu	Gly	Lys	Ser	Gln	Glu	Thr	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Asp	Val	His	Glu
				325					330					335	
Lys	Thr	Phe	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ser	Met	Gln	Ala	Tyr	Ile	Ala	Glu	Pro
			340					345					350		
Leu	Leu	Val	Val	Asn	Trp	Gln	Ser	Ser	Ile	Pro	Ala	Val	Asp	Thr	Trp
		355					360						365		
Ile	Val	Glu	Trp	Leu	Pro	Glu	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Phe	Pro	Ala	Leu
	370					375					380				
Ser	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Val	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Glu	Gln	Asp
385					390					395					400
Lys	Leu	Lys	Pro	Phe	Thr	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	Val	Leu
				405					410					415	
Gly	His	Arg	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	Lys	Glu
			420					425					430		

Gly	Thr	Pro	Leu	Lys	Gly	Pro	Glu	Thr	Arg	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Leu
		435					440					445			
Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn
	450					455					460				
Gly	Phe	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Val	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys
465					470					475					480
Glu	Leu	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	His	Ala	Leu	Gln	Cys	Asp	Leu	Glu
				485					490					495	
Ser	Leu	Thr	Arg	Arg	Thr	Ser	Tyr	Thr	Val	Trp	Val	Met	Ala	Ser	Thr
			500					505					510		
Arg	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Val	Arg	Ile	Asn	Phe	Lys	Thr	Leu	Ser
		515					520					525			
Ile	Ser	Glu	Tyr	Trp	Leu	Gln	Ala	Ser	Phe	Trp	Ser	Leu	Leu	Arg	Val
	530					535					540				
Gly	Asn	Val													
545															

- <210> 130
- <211> 30
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 10 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41.764
  
- <400> 130
- atcgaattca gaccaatggc tttctctgtg 30
  
- <210> 131
- 15 <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 20 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41.598
  
- <400> 131
- acagtagtgt tctgactcag ttgg 24
  
- <210> 132
- 25 <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 30 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41.948
  
- <400> 132
- 35 ggtactgttc tctttgtctc g 21
  
- <210> 133
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 40
  
- <220>
- <223> Cebador oligonucleotídico ZC41.766
  
- <400> 133
- 45 atctctagat gtttactgtt caccttg 27
  
- <210> 134
- <211> 4026
- <212> ADN
- 50 <213> Mus musculus



<220>  
 <221> CDS  
 <222> (780)...(3692)

5 <400> 134

```

ctgtggacat tttaccatgc agccataaag agagggtcaaa aatgtctttc aagtgcccg 60
ttagtaaaga tctgatggcg ttctaaggag agaaaggaac ttggatcttc gtggacaaag 120
aattcaggtc ttagctgaa ggaggcgtgg ccacacaggg cgtttccagg tctttagag 180
gaagcacagt tcatagatct ctgttctaac acgtctgtct tgctctgaac gccgaaagtc 240
aactcgatca caagtttgat ccaacagttt gacatttcag gtaattttca gacggagcgc 300
tggtggttga tctcccaagc aacacaattg gctctgtgca ggacacctgg cacggggcac 360
tggttcgcag ctctgtcccct ctccctccag gaacaacgat gctcaaggac cagcttttcc 420
tcccaggcct ctcccacttc ccttctcacc ggtgctgccc gcccggtccc gggaaaccgcg 480
cccgtcgcag ggtcccgatc gttccccta catcccttgg gaccaggagc aaattcctgt 540
gggtcccagg agtgccaaaa gtgctcagcg agacgggaaa ttgcaacagt acttggccct 600
tcggccctcc cccggcgctt tcccgtaat cccgcccctg gacacttgtc ccgtagtga 660
ttcatagctg gggcgcgggg ccgctccac acgctcggac agacgtccgc gcccgttccc 720
ctgtgaggcc gaggaccggc aaggctccgg agcaggctgc caggcgggta atcagacca 779
atg gct ttc tct gtg gtc ctt cat cca gcc ttc ctc ctg gca gtg ctg 827
Met Ala Phe Ser Val Val Leu His Pro Ala Phe Leu Leu Ala Val Leu
1 5 10 15

tcc ctg agg gca tcc cga agc gaa gtc ttg gag gag cct tta cca ttg 875
Ser Leu Arg Ala Ser Arg Ser Glu Val Leu Glu Glu Pro Leu Pro Leu
20 25 30

act cct gag ata cat aaa gtt tct ttt caa ttg aaa ctt caa gaa gtg 923
Thr Pro Glu Ile His Lys Val Ser Phe Gln Leu Lys Leu Gln Glu Val
35 40 45

aat tta gaa tgg act gtc cca gcc ctt act cat gaa gaa tta aac atg 971
Asn Leu Glu Trp Thr Val Pro Ala Leu Thr His Glu Glu Leu Asn Met
50 55 60

ata ttt cag ata gag atc agt aga ctg aac ata tcc aac acc atc tgg 1019
Ile Phe Gln Ile Glu Ile Ser Arg Leu Asn Ile Ser Asn Thr Ile Trp
65 70 75 80

gtg gag aat tat agc acc act gtg aag cgt gaa gaa gct gtg cgt tgg 1067
Val Glu Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Arg Glu Glu Ala Val Arg Trp
85 90 95

aac tgg acg tct gat atc cct ttg gag tgt gtc aaa cat ttc ata aga 1115
Asn Trp Thr Ser Asp Ile Pro Leu Glu Cys Val Lys His Phe Ile Arg
100 105 110

atc agg gct ctg gta gat gac acc aag tcc ctt cca cag agt tcc tgg 1163
Ile Arg Ala Leu Val Asp Asp Thr Lys Ser Leu Pro Gln Ser Ser Trp
115 120 125

ggc aac tgg agt tcc tgg aaa gaa gtt aat gca aag gtt tcc gtt gaa 1211
Gly Asn Trp Ser Ser Trp Lys Glu Val Asn Ala Lys Val Ser Val Glu
130 135 140

cct gat aaa tca tta ata ttt cct aaa gac aaa gtg ttg gaa gaa ggc 1259
Pro Asp Lys Ser Leu Ile Phe Pro Lys Asp Lys Val Leu Glu Glu Gly
145 150 155 160

tcc aat gtc acc atc tgt ctg atg tat ggg cag aat gta tat aat gta 1307
    
```

Ser	Asn	Val	Thr	Ile	Cys	Leu	Met	Tyr	Gly	Gln	Asn	Val	Tyr	Asn	Val	
				165					170					175		
tcc	tgt	aag	ttg	caa	gat	gag	cca	atc	cat	gga	gaa	caa	ctt	gat	tcc	1355
Ser	Cys	Lys	Leu	Gln	Asp	Glu	Pro	Ile	His	Gly	Glu	Gln	Leu	Asp	Ser	
			180					185					190			
cac	gtg	tca	tta	tta	aaa	ttg	aac	aat	gta	ggt	ttc	ctt	agt	gac	aca	1403
His	Val	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	Asn	Asn	Val	Val	Phe	Leu	Ser	Asp	Thr	
		195					200					205				
ggg	aca	aac	atc	aat	tgt	caa	gcc	acg	aag	ggt	cct	aaa	aga	ata	ttt	1451
Gly	Thr	Asn	Ile	Asn	Cys	Gln	Ala	Thr	Lys	Gly	Pro	Lys	Arg	Ile	Phe	
	210					215					220					
ggt	act	ggt	ctc	ttt	gtc	tcg	aaa	gtg	ctc	gag	gaa	cct	aag	aat	ggt	1499
Gly	Thr	Val	Leu	Phe	Val	Ser	Lys	Val	Leu	Glu	Glu	Pro	Lys	Asn	Val	
225					230					235					240	
tcc	tgt	gaa	acc	cga	gac	ttt	aag	act	ttg	gac	tgt	tca	tgg	gaa	cct	1547
Ser	Cys	Glu	Thr	Arg	Asp	Phe	Lys	Thr	Leu	Asp	Cys	Ser	Trp	Glu	Pro	
				245					250					255		
ggg	gta	gat	acg	act	ttg	act	tgg	cgt	aaa	caa	aga	ttc	caa	aac	tac	1595
Gly	Val	Asp	Thr	Thr	Leu	Thr	Trp	Arg	Lys	Gln	Arg	Phe	Gln	Asn	Tyr	
			260					265					270			
act	tta	tgt	gaa	tcg	ttc	tct	aag	aga	tgt	gag	ggt	tct	aac	tac	agg	1643
Thr	Leu	Cys	Glu	Ser	Phe	Ser	Lys	Arg	Cys	Glu	Val	Ser	Asn	Tyr	Arg	
		275					280					285				
aac	tcc	tat	acc	tgg	caa	atc	act	gaa	ggc	tca	cag	gaa	atg	tat	aac	1691
Asn	Ser	Tyr	Thr	Trp	Gln	Ile	Thr	Glu	Gly	Ser	Gln	Glu	Met	Tyr	Asn	
	290					295					300					
ttt	act	ctc	aca	gct	gaa	aac	caa	cta	agg	aaa	aga	agt	gtc	aac	att	1739
Phe	Thr	Leu	Thr	Ala	Glu	Asn	Gln	Leu	Arg	Lys	Arg	Ser	Val	Asn	Ile	
305					310					315					320	
aat	ttt	aac	ctg	acc	cat	aga	ggt	cat	cca	aag	gct	ccg	cag	gac	gtc	1787
Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	His	Arg	Val	His	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Asp	Val	
				325					330					335		
acc	ctt	aaa	att	ata	ggt	gct	aca	aaa	gcc	aac	atg	act	tgg	aag	ggt	1835
Thr	Leu	Lys	Ile	Ile	Gly	Ala	Thr	Lys	Ala	Asn	Met	Thr	Trp	Lys	Val	
			340				345						350			
cac	tcc	cat	gga	aac	aac	tac	aca	ctt	ttg	tgt	cag	ggt	aaa	ctc	caa	1883
His	Ser	His	Gly	Asn	Asn	Tyr	Thr	Leu	Leu	Cys	Gln	Val	Lys	Leu	Gln	
		355					360					365				
tat	gga	gaa	gtg	att	cat	gag	cac	aat	ggt	tct	gtc	cac	atg	agc	gca	1931
Tyr	Gly	Glu	Val	Ile	His	Glu	His	Asn	Val	Ser	Val	His	Met	Ser	Ala	
	370					375					380					
aac	tac	ctc	ttc	agt	gat	ctg	gat	cca	gac	aca	aag	tac	aag	gct	ttt	1979
Asn	Tyr	Leu	Phe	Ser	Asp	Leu	Asp	Pro	Asp	Thr	Lys	Tyr	Lys	Ala	Phe	
385					390					395					400	
gtg	cgc	tgt	gca	agt	gcc	aac	cac	ttc	tgg	aaa	tgg	agc	gac	tgg	acc	2027
Val	Arg	Cys	Ala	Ser	Ala	Asn	His	Phe	Trp	Lys	Trp	Ser	Asp	Trp	Thr	
				405					410					415		

caa	aaa	gag	ttc	agc	aca	ccc	gag	act	gct	ccc	tca	cag	gct	ctt	gat	2075
Gln	Lys	Glu	Phe	Ser	Thr	Pro	Glu	Thr	Ala	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Asp	
			420					425					430			
gta	tgg	aga	caa	gtg	tgg	tcg	gag	aat	gga	aga	cgc	att	gtg	act	tta	2123
Val	Trp	Arg	Gln	Val	Trp	Ser	Glu	Asn	Gly	Arg	Arg	Ile	Val	Thr	Leu	
			435				440					445				
ttc	tgg	aag	cca	cta	tta	aaa	tca	cag	gcc	aat	ggc	aaa	atc	ata	tcc	2171
Phe	Trp	Lys	Pro	Leu	Leu	Lys	Ser	Gln	Ala	Asn	Gly	Lys	Ile	Ile	Ser	
		450				455					460					
tat	aat	ata	gtt	gta	gaa	aat	gaa	gcc	aaa	cca	act	gag	tca	gaa	cac	2219
Tyr	Asn	Ile	Val	Val	Glu	Asn	Glu	Ala	Lys	Pro	Thr	Glu	Ser	Glu	His	
					470					475					480	
tac	tgt	gtc	tgg	gca	cca	gcc	ctc	agc	aca	aac	ctg	agc	ctt	gac	ctg	2267
Tyr	Cys	Val	Trp	Ala	Pro	Ala	Leu	Ser	Thr	Asn	Leu	Ser	Leu	Asp	Leu	
				485					490					495		
caa	cct	tac	aag	att	cgc	atc	aca	gcc	aac	aac	agc	atg	ggg	gca	tct	2315
Gln	Pro	Tyr	Lys	Ile	Arg	Ile	Thr	Ala	Asn	Asn	Ser	Met	Gly	Ala	Ser	
			500					505					510			
cct	gag	tcc	ttg	atg	gtc	ctt	tct	aat	gat	tct	gga	cac	gag	gtc	aag	2363
Pro	Glu	Ser	Leu	Met	Val	Leu	Ser	Asn	Asp	Ser	Gly	His	Glu	Val	Lys	
			515				520					525				
gaa	aag	aca	att	aaa	ggt	ata	aag	gat	gca	ttc	aat	att	tct	tgg	gag	2411
Glu	Lys	Thr	Ile	Lys	Gly	Ile	Lys	Asp	Ala	Phe	Asn	Ile	Ser	Trp	Glu	
			530			535					540					
ccc	gta	tct	gga	gac	acg	atg	ggc	tat	gtt	gtg	gac	tgg	tgt	gca	cat	2459
Pro	Val	Ser	Gly	Asp	Thr	Met	Gly	Tyr	Val	Val	Asp	Trp	Cys	Ala	His	
			545		550					555					560	
tcc	cag	gac	caa	cgc	tgt	gat	ttg	cag	tgg	aag	aac	ctt	ggt	ccc	aat	2507
Ser	Gln	Asp	Gln	Arg	Cys	Asp	Leu	Gln	Trp	Lys	Asn	Leu	Gly	Pro	Asn	
				565					570					575		
acc	aca	agc	acc	acc	atc	acc	tca	gat	gat	ttt	aaa	cca	ggc	gtc	cgt	2555
Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ile	Thr	Ser	Asp	Asp	Phe	Lys	Pro	Gly	Val	Arg	
			580					585					590			
tac	aac	ttc	aga	att	ttt	gaa	agg	tct	gtg	gaa	cac	aaa	gct	cgg	tta	2603
Tyr	Asn	Phe	Arg	Ile	Phe	Glu	Arg	Ser	Val	Glu	His	Lys	Ala	Arg	Leu	
			595				600					605				
gta	gag	aaa	caa	aga	gga	tac	acc	cag	gaa	ctg	gct	cct	ttg	gtg	aat	2651
Val	Glu	Lys	Gln	Arg	Gly	Tyr	Thr	Gln	Glu	Leu	Ala	Pro	Leu	Val	Asn	
			610			615					620					
cca	aaa	gtg	gag	att	cct	tac	tcg	acc	cct	aac	tcc	ttc	gtt	cta	aga	2699
Pro	Lys	Val	Glu	Ile	Pro	Tyr	Ser	Thr	Pro	Asn	Ser	Phe	Val	Leu	Arg	
			625			630				635					640	
tgg	cca	gat	tat	gac	agc	gac	ttc	cag	gct	ggt	ttt	ata	aaa	ggg	tac	2747
Trp	Pro	Asp	Tyr	Asp	Ser	Asp	Phe	Gln	Ala	Gly	Phe	Ile	Lys	Gly	Tyr	
				645					650					655		
ctc	gtg	tat	gtg	aaa	tcc	aag	gag	atg	cag	tgc	aac	caa	ccc	tgg	gaa	2795
Leu	Val	Tyr	Val	Lys	Ser	Lys	Glu	Met	Gln	Cys	Asn	Gln	Pro	Trp	Glu	
			660					665					670			

agg acc ctc ctt cca gat aat tca gtc ctc tgt aaa tac gac atc aat	2843
Arg Thr Leu Leu Pro Asp Asn Ser Val Leu Cys Lys Tyr Asp Ile Asn	
675 680 685	
ggc tca gag aca aag aca ctc acc gtg gaa aac ctt cag cca gag tcc	2891
Gly Ser Glu Thr Lys Thr Leu Thr Val Glu Asn Leu Gln Pro Glu Ser	
690 695 700	
ctc tat gag ttt ttc gtc act ccg tac acc agc gct ggc cca gga ccc	2939
Leu Tyr Glu Phe Phe Val Thr Pro Tyr Thr Ser Ala Gly Pro Gly Pro	
705 710 715 720	
aat gaa acg ttc aca aag gtc aca act cca gat gca cgc tcc cac atg	2987
Asn Glu Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Ala Arg Ser His Met	
725 730 735	
ctg ctg cag atc ata cta ccc atg acc ctc tgc gtc ttg ctc agc atc	3035
Leu Leu Gln Ile Ile Leu Pro Met Thr Leu Cys Val Leu Leu Ser Ile	
740 745 750	
att gtc tgc tac tgg aaa agt cag tgg gtg aag gag aag tgc tac cct	3083
Ile Val Cys Tyr Trp Lys Ser Gln Trp Val Lys Glu Lys Cys Tyr Pro	
755 760 765	
gac att ccc aat ccg tac aag agc agc att ctg tca ctc ata aaa tcc	3131
Asp Ile Pro Asn Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser Leu Ile Lys Ser	
770 775 780	
aag aag aat cct cac tta ata atg aat gtc aaa gac tgc att cca gat	3179
Lys Lys Asn Pro His Leu Ile Met Asn Val Lys Asp Cys Ile Pro Asp	
785 790 795 800	
gtc ctt gaa gtg ata aac aaa gca gaa ggc agc aag aca cag tgt gta	3227
Val Leu Glu Val Ile Asn Lys Ala Glu Gly Ser Lys Thr Gln Cys Val	
805 810 815	
ggc tct ggg aaa ctt cac att gaa gat gta ccc act aag ccg cca atc	3275
Gly Ser Gly Lys Leu His Ile Glu Asp Val Pro Thr Lys Pro Pro Ile	
820 825 830	
gtg cca aca gaa aag gat tcc tca ggg cct gtg ccc tgc atc ttc ttt	3323
Val Pro Thr Glu Lys Asp Ser Ser Gly Pro Val Pro Cys Ile Phe Phe	
835 840 845	
gag aat ttt act tac gat cag tca gct ttt gac tct ggt tcc cat ggc	3371
Glu Asn Phe Thr Tyr Asp Gln Ser Ala Phe Asp Ser Gly Ser His Gly	
850 855 860	
ctc att cca ggt ccc cta aaa gac aca gca cac caa ctt gga cta ttg	3419
Leu Ile Pro Gly Pro Leu Lys Asp Thr Ala His Gln Leu Gly Leu Leu	
865 870 875 880	
gct cca cct aac aag ttc cag aac gta tta aaa aat gac tac atg aag	3467
Ala Pro Pro Asn Lys Phe Gln Asn Val Leu Lys Asn Asp Tyr Met Lys	
885 890 895	
ccc ctg gtc gaa agt cca act gaa gaa act agc ttg att tat gtg tca	3515
Pro Leu Val Glu Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ser Leu Ile Tyr Val Ser	
900 905 910	
cag ctg gct tca ccc atg tgc gga gac aag gac acg ctt gcc aca gaa	3563
Gln Leu Ala Ser Pro Met Cys Gly Asp Lys Asp Thr Leu Ala Thr Glu	

ES 2 546 797 T3

915	920	925	
cca ccc gtg cca gtg cat ggt tca gag tat aaa agg caa atg gta gtt			3611
Pro Pro Val Pro Val His Gly Ser Glu Tyr Lys Arg Gln Met Val Val			
930	935	940	
ccc ggg agc ctc gca tca cct tct ctg aag gag gat aac agc ttg acc			3659
Pro Gly Ser Leu Ala Ser Pro Ser Leu Lys Glu Asp Asn Ser Leu Thr			
945	950	955	960
tca acg gtc ctc tta ggc caa ggt gaa cag taa acaccacgca gcacaaataa			3712
Ser Thr Val Leu Leu Gly Gln Gly Glu Gln *			
965	970		
atgcactcca cacactatag gcactttggg agatgtagct gttaccatgc caacaccacg			3772
tgccctgggt gggtccaggg gtggggggtg aggggagact cattatctgc agtgctgatt			3832
tatcaacgat cactacagac caacagactt aaggaccata taatatggtg ttcaccctga			3892
aggcgttccc tagaaatggc agatccgaga gcatgctgac cttgctatta tttgggccag			3952
gctcaccctt attgcagtag cttgacatag ggtgtacacc agtcatttcg cagagcctac			4012
ctactcaaaa ctac			4026

<210> 135

<211> 970

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 135

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

Asn Ser Tyr Thr Trp Gln Ile Thr Glu Gly Ser Gln Glu Met Tyr Asn  
 290 295 300  
 Phe Thr Leu Thr Ala Glu Asn Gln Leu Arg Lys Arg Ser Val Asn Ile  
 305 310 315  
 Asn Phe Asn Leu Thr His Arg Val His Pro Lys Ala Pro Gln Asp Val  
 325 330 335  
 Thr Leu Lys Ile Ile Gly Ala Thr Lys Ala Asn Met Thr Trp Lys Val  
 340 345 350  
 His Ser His Gly Asn Asn Tyr Thr Leu Leu Cys Gln Val Lys Leu Gln  
 355 360 365  
 Tyr Gly Glu Val Ile His Glu His Asn Val Ser Val His Met Ser Ala  
 370 375 380  
 Asn Tyr Leu Phe Ser Asp Leu Asp Pro Asp Thr Lys Tyr Lys Ala Phe  
 385 390 395 400  
 Val Arg Cys Ala Ser Ala Asn His Phe Trp Lys Trp Ser Asp Trp Thr  
 405 410 415  
 Gln Lys Glu Phe Ser Thr Pro Glu Thr Ala Pro Ser Gln Ala Leu Asp  
 420 425 430  
 Val Trp Arg Gln Val Trp Ser Glu Asn Gly Arg Arg Ile Val Thr Leu  
 435 440 445  
 Phe Trp Lys Pro Leu Leu Lys Ser Gln Ala Asn Gly Lys Ile Ile Ser  
 450 455 460  
 Tyr Asn Ile Val Val Glu Asn Glu Ala Lys Pro Thr Glu Ser Glu His  
 465 470 475 480  
 Tyr Cys Val Trp Ala Pro Ala Leu Ser Thr Asn Leu Ser Leu Asp Leu  
 485 490 495  
 Gln Pro Tyr Lys Ile Arg Ile Thr Ala Asn Asn Ser Met Gly Ala Ser  
 500 505 510  
 Pro Glu Ser Leu Met Val Leu Ser Asn Asp Ser Gly His Glu Val Lys  
 515 520 525  
 Glu Lys Thr Ile Lys Gly Ile Lys Asp Ala Phe Asn Ile Ser Trp Glu  
 530 535 540  
 Pro Val Ser Gly Asp Thr Met Gly Tyr Val Val Asp Trp Cys Ala His  
 545 550 555 560  
 Ser Gln Asp Gln Arg Cys Asp Leu Gln Trp Lys Asn Leu Gly Pro Asn  
 565 570 575  
 Thr Thr Ser Thr Thr Ile Thr Ser Asp Asp Phe Lys Pro Gly Val Arg  
 580 585 590  
 Tyr Asn Phe Arg Ile Phe Glu Arg Ser Val Glu His Lys Ala Arg Leu  
 595 600 605  
 Val Glu Lys Gln Arg Gly Tyr Thr Gln Glu Leu Ala Pro Leu Val Asn  
 610 615 620  
 Pro Lys Val Glu Ile Pro Tyr Ser Thr Pro Asn Ser Phe Val Leu Arg  
 625 630 635 640  
 Trp Pro Asp Tyr Asp Ser Asp Phe Gln Ala Gly Phe Ile Lys Gly Tyr  
 645 650 655  
 Leu Val Tyr Val Lys Ser Lys Glu Met Gln Cys Asn Gln Pro Trp Glu  
 660 665 670  
 Arg Thr Leu Leu Pro Asp Asn Ser Val Leu Cys Lys Tyr Asp Ile Asn  
 675 680 685  
 Gly Ser Glu Thr Lys Thr Leu Thr Val Glu Asn Leu Gln Pro Glu Ser  
 690 695 700  
 Leu Tyr Glu Phe Phe Val Thr Pro Tyr Thr Ser Ala Gly Pro Gly Pro  
 705 710 715 720  
 Asn Glu Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Ala Arg Ser His Met  
 725 730 735  
 Leu Leu Gln Ile Ile Leu Pro Met Thr Leu Cys Val Leu Leu Ser Ile  
 740 745 750  
 Ile Val Cys Tyr Trp Lys Ser Gln Trp Val Lys Glu Lys Cys Tyr Pro  
 755 760 765  
 Asp Ile Pro Asn Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser Leu Ile Lys Ser  
 770 775 780  
 Lys Lys Asn Pro His Leu Ile Met Asn Val Lys Asp Cys Ile Pro Asp

785					790					795				800	
Val	Leu	Glu	Val	Ile	Asn	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Lys	Thr	Gln	Cys	Val
				805					810					815	
Gly	Ser	Gly	Lys	Leu	His	Ile	Glu	Asp	Val	Pro	Thr	Lys	Pro	Pro	Ile
			820					825					830		
Val	Pro	Thr	Glu	Lys	Asp	Ser	Ser	Gly	Pro	Val	Pro	Cys	Ile	Phe	Phe
			835				840					845			
Glu	Asn	Phe	Thr	Tyr	Asp	Gln	Ser	Ala	Phe	Asp	Ser	Gly	Ser	His	Gly
	850					855				860					
Leu	Ile	Pro	Gly	Pro	Leu	Lys	Asp	Thr	Ala	His	Gln	Leu	Gly	Leu	Leu
865					870					875					880
Ala	Pro	Pro	Asn	Lys	Phe	Gln	Asn	Val	Leu	Lys	Asn	Asp	Tyr	Met	Lys
			885					890						895	
Pro	Leu	Val	Glu	Ser	Pro	Thr	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Ile	Tyr	Val	Ser
			900					905					910		
Gln	Leu	Ala	Ser	Pro	Met	Cys	Gly	Asp	Lys	Asp	Thr	Leu	Ala	Thr	Glu
		915					920					925			
Pro	Pro	Val	Pro	Val	His	Gly	Ser	Glu	Tyr	Lys	Arg	Gln	Met	Val	Val
	930					935					940				
Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Glu	Asp	Asn	Ser	Leu	Thr
945					950					955					960
Ser	Thr	Val	Leu	Leu	Gly	Gln	Gly	Glu	Gln						
			965					970							

<210> 136  
 <211> 2910  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia polinucleotídica degenerada que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 135.

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2910)  
 <223> n = A, T, G o C

15 <400> 136

```

atgggenttyw sngtngtnyt ncayccngcn ttyytnytng cngtnyt nws nyt nmgngcn 60
wsnmg nwsng argtnytnga rgarcnytn ccnytnacnc cngarathca yaargt nwsn 120
ttycarytna arytncarga rgtnaaytn gartggacng tncngcnytn nacncaygar 180
garytnaaya tgathttyca rathgarath wsnmgnytne ayathwsnaa yacnathtg 240
gtngaraayt aywsnacnac ngtnaarmgn gargargcng tnmngtgga ytggacnwsn 300
gayathccny tngartgyt naarcaytty athmgnathm gngcnytngt ngaygayacn 360
aarwsnytn cncarwsnws ntggggnaay tggwsnwsnt ggaargargt naaygcnaar 420
gt nwsngtng arccngayaa rwsnytnath ttyccnaarg ayaargtnyt ngargarggn 480
wsnaaygtna cnathtgyyt natgtayggn caraaygtnt ayaaygt nws ntgyaarytn 540
cargaygarc cnathcaygg ngarcarytn gaywsncayg tnwsnytnyt naarytnaay 600
aaygtngtnt tyytnwsnga yacnggnacn aayathaayt gycargcnac naarggnccn 660
aarmgnatht tyggnacngt nytnttygt nwsnaargtny tngargarcc naaraaygt n 720
wsntgygara cnmgngaytt yaaracnytn gaytgywsnt gggarccngg ngtngayacn 780
acnytnacnt gmgnaarca rmngnttycar aaytayacny tntgygarws nttywsnaar 840
mgntgygarg tnwsnaayta ymgnaaywsn tayacntggc arathacnga rgnwsncar 900
garatgtaya aytyacnytn nacngcngar aaycarytnm gnaarmgnws ngtnaayath 960
aayttyaayy tnacncaymg ngtncaayccn aargcncnc argaygtnac nytnaarath 1020
athggngcna cnaargcnaa yatgacntgg aargtncaayw sncaayggnaa yaaytayacn 1080
ytnytnngyc argtnaaryt ncartayggn gargtnathc aygarcaayaa ygt nwsngtn 1140
cayataygng cnaaytayt ntywsngay ytngaycng ayacnaarta yargcnytn 1200
gt nmgntgyg cnwsngcnaa ycayt tytg aartggwsng aytggacnca raargartty 1260
wsnacncng aracngcnc nwsncargcn ytngaygtnt gmgncargt ntggwsngar 1320
aayggnmgnm gnathgtnac nytnttytg aarccnytny tnaarwsnca rgcnaayggn 1380
aarathathw sntayaayat hgtngtngar aaygargcna arccnacnga rwsngarcay 1440
    
```



taytgygtnt	gggcncncgc	nytnwsnacn	aayytwnsny	tngayytnc	rcCNTayaar	1500
athmgnatha	cngcnaayaa	ywsnatgggn	gcnwsncng	arwsnytnat	ggtnytnwsn	1560
aaygaywsng	gnCaygargt	naargaraar	acnathaarg	gnathaarga	ygcnttyaay	1620
athwsntggg	arccngtnws	ngnggayacn	atgggntayg	tngtngaytg	gtgygcncay	1680
wsncargayc	armgntgyga	yytncartgg	aaraayytng	gnccnaayac	nacnwsnacn	1740
acnathacnw	sngaygaytt	yaarccnggn	gtnmgtaya	ayttymgnat	httygarmgn	1800
wsngtngarc	ayaargcnmg	nytngtngar	aarcarmgng	gntayacnca	rgarytngcn	1860
ccnytngtna	ayccnaargt	ngarathccn	taywsnacnc	cnaaywsntt	ygtnytnmgn	1920
tggccngayt	aygaywsnga	yttycargcn	ggnttyatha	arggntayyt	ngtntaygtn	1980
aarwsnaarg	aratgcartg	yaaycarccn	tgggarmgna	cnytnytnc	ngayaaywsn	2040
gtnytntgya	artaygayat	haayggwnsn	garacnaara	cnytnacngt	ngaraayyt	2100
carccngarw	snytnayga	rttyttygtn	acncntaya	cnwsngcngg	nccnggnccn	2160
aaygaracnt	tyacnaargt	nacnacccn	gaygcnmgw	sncayatgyt	nytnCarath	2220
athytncna	tgacnytnng	ygtnytnytn	wsnathathg	tntgytaytg	gaarwsncar	2280
tgggtnaarg	araartgyta	ycCngayath	ccnaayccnt	ayaarwsnws	nathytwnsn	2340
ytnathaarw	snaaraaraa	ycCncayyt	athatgaayg	tnaargaytg	yathccngay	2400
gtnytnngar	tnathaayaa	rgcngarggn	wsnaaracnc	artgygtngg	nwsnggnaar	2460
ytncayathg	argaygtnc	nacnaarccn	ccnathgtnc	cnacngaraa	rgaywsnwsn	2520
ggncngtnc	cntgyathtt	yttygaraay	tyacntayg	aycarwsngc	nttygaywsn	2580
gnwsncayg	gnytnathcc	nggnccnytn	aargayacng	cncaycaryt	nggnytnytn	2640
gcncncncna	ayaarttyca	raaygtnytn	aaraaygayt	ayatgaarcc	nytngtngar	2700
wsnccnacng	argaracnws	nytnathtay	gtnwsncary	tngcnwsncc	natgtgygg	2760
gayaargaya	cnytngcnc	ngarccncn	gtncngtnc	ayggwnsnga	rtayaarmgn	2820
caratggtn	tncnggnws	nytnngnwsn	ccnwsnytna	argargayaa	ywsnytnacn	2880
wsnacngtny	tnytnngnca	rgnggarcar				2910

- <210> 137
- <211> 24
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Cebador ZC43891
- 10 <400> 137
- gggcagtagg atatgaatca gcat 24
  
- <210> 138
- <211> 19
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Cebador ZC43900
- 20 <400> 138
- gaaggcccca gtgctacgt 19
  
- <210> 139
- <211> 24
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> sonda ZC43896 de OSMRbeta
- 30 <400> 139
- tcatccggag tcgtgacctt cgtg 24
  
- 35 <210> 140
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 40 <220>
- <223> Cebador ZC43280

<400> 140  
 gagcacgccc ttctcttct 20

5 <210> 141  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador ZC43281

<400> 141  
 cgttgcccgt ccgtttacta 20

15 <210> 142  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sonda ZC43275 de zcytor17lig

<400> 142  
 ctgtaattcc tcgactattt tctgtacatc atcacttggt 40

25 <210> 143  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador ZC40574

<400> 143  
 ctcatgtgga attttgccga tt 22

35 <210> 144  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador ZC40575

<400> 144  
 ccgagtgaag atccccttt ta 22

45 <210> 145  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sonda ZC43017 de GUS

55 <400> 145  
 tgaacagtca ccgacgagag tgctgg 26

60 <210> 146  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Cebador ZC28480  
 <400> 146

cgattcagga cagtcaacag tacc 24

<210> 147  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador ZC41653

10 <400> 147  
 ccttcgtgaa cgtagcactg g 21

<210> 148  
 <211> 19  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Cebador ZC41655

<400> 148  
 ctgaaatcca aggcgaggc 19

25 <210> 149  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador ZC41703

<400> 149  
 tgaagctggc cttgctct 20

35 <210> 150  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador ZC41704

<400> 150  
 45 gagatatgcc cggatggct 19

<210> 151  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador ZC43272

55 <400> 151  
 gctggtatca ttggttcct tctc 24

<210> 152  
 <211> 24  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador ZC43273

65 <400> 152

cattctcttt cctctgcaaa ttca 24

<210> 153  
 <211> 34  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sonda ZC43478 de zcytor17

10 <400> 153  
 tagagaacat ttctgcgctc ttttactcg acag 34

<210> 154  
 <211> 30  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Cebador ZC43278

<400> 154  
 aaacaagagt ctcaggatct ttataacaac 30

25 <210> 155  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador ZC43279

<400> 155  
 acggcagctg tattgattcg t 21

35 <210> 156  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sonda ZC43276 de zcytor17lig

<400> 156  
 45 taaagcaggc atctgggatg tcagca 26

<210> 157  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador ZC43045

55 <400> 157  
 aaacatgata tttcagatag agatcagtag act 33

<210> 158  
 <211> 26  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador ZC43046

65 <400> 158

cttatgaaat gtttgacaca ctcaa      26  
 <210> 159  
 <211> 29  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda ZC43141 de OSMRbeta  
 10 <400> 159  
 ctgtgcgttg gaactggacg tctgatatc      29  
 <210> 160  
 <211> 21  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador ZC43004  
 <400> 160  
 gaaacccgcc gcatattact t      21  
 25 <210> 161  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador ZC43005  
 <400> 161  
 35 tggcgttgct cacaaaggt      19  
 <210> 162  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> sonda ZC43018 de GUS murino  
 <400> 162  
 45 acccacacca aagccctgga cctc      24  
 <210> 163  
 <211> 23  
 <212> ADN.  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador ZC40269  
 55 <400> 163  
 gccagtttca cacactcctc ttt      23  
 <210> 164  
 <211> 26  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador ZC40268  
 65 <400> 164

gcagctattg cactagtcac ttctt 26

<210> 165  
 <211> 29  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sonda ZC40298 del receptor de transferrina

10 <400> 165  
 cccaggtagc cactcatgaa tccaatcaa 29

<210> 166  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Cebador ZC43140

<400> 166  
 ttctccaca gcaatcgac 20

25 <210> 167  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador ZC43139

<400> 167  
 atgcatgctt cggttcagaa c 21

35 <210> 168  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador ZC41608

<400> 168  
 45 gcagacaatg atgctgagca agac 24

<210> 169  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador ZC41609

55 <400> 169  
 caacgctgtg attgcagtg gaag 24

<210> 170  
 <211> 18  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador ZC41502

65 <400> 170

# ES 2 546 797 T3

agcgggcctt cctcactc            18  
 <210> 171  
 <211> 24  
 5 <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
  
    <220>  
    <223> Cebador ZC41500  
 10  
    <400> 171  
    ggacaaaata aaaacataaa taac            24  
  
    <210> 172  
 15 <211> 40  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
    <220>  
    <223> Engarce  
 20  
    <400> 172  
    tgtcgatgaa gccctgaaag acgcgagac taattcgagc            40  
  
    <210> 173  
 25 <211> 60  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
  
    <220>  
 30 <223> Engarce  
  
    <400> 173  
    acgcgagac taattcgagc tcccaccatc accatcacca cggaattcg gtaccgctgg            60  
  
 35 <210> 174  
    <211> 60  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
    <223> Engarce  
  
    <400> 174  
 45 actcactata gggcgaattg cccgggggat ccacgcgaa ccagcgtac cgaattcgcg            60  
  
    <210> 175  
    <211> 42  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
 50  
    <220>  
    <223> Engarce  
  
    <400> 175  
 55 acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tg            42  
  
    <210> 176  
    <211> 825  
    <212> ADN  
 60 <213> Homo sapiens  
  
    <220>  
    <221> CDS  
    <222> (48)...(518)  
 65  
    <400> 176

```

atcaactctct ttaatcacta ctcacattaa cctcaactcc tgccaca atg tac agg 56
Met Tyr Arg
1

atg caa ctc ctg tct tgc att gca cta att ctt gca ctt gtc aca aac 104
Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu Val Thr Asn
5 10 15

agt gca cct act tca agt tcg aca aag aaa aca aag aaa aca cag cta 152
Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30 35

caa ctg gag cat tta ctg ctg gat tta cag atg att ttg aat gga att 200
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
40 45 50

aat aat tac aag aat ccc aaa ctc acc agg atg ctc aca ttt aag ttt 248
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
55 60 65

tac atg ccc aag aag gcc aca gaa ctg aaa cag ctt cag tgt cta gaa 296
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Cys Leu Glu
70 75 80

gaa gaa ctc aaa cct ctg gag gaa gtg ctg aat tta gct caa agc aaa 344
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

aac ttt cac tta aga ccc agg gac tta atc agc aat atc aac gta ata 392
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110 115

gtt ctg gaa cta aag gga tct gaa aca aca ttc atg tgt gaa tat gca 440
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
120 125 130

gat gag aca gca acc att gta gaa ttt ctg aac aga tgg att acc ttt 488

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
135 140 145

tgt caa agc atc atc tca aca cta act tga taattaagtg cttcccactt 538
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr *
150 155

aaaacatatac aggccttcta tttatttatt taaatattta aattttatat ttattgctga 598
atgtatgggt gctacctatt gtaactatta ttcttaatct taaaactata aatatggatc 658
ttttatgatt ctttttgtaa gccctagggg ctctaaaatg gtttacctta tttatcccaa 718
aaatatttat tattatgctg aatgttaaat atagtatcta tgtagattgg ttagtaaaac 778
tatttaataa atttgataaa tataaaaaaa aaaaacaaaa aaaaaaa 825

```

<210> 177

<211> 156

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 177



```

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

```

<210> 178  
 <211> 614  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (64)...(525)

<400> 178

```

gatcgttagc ttctcctgat aaactaattg cctcacattg tcaactgcaaa tgcacaccta 60
tta atg ggt ctc acc tcc caa ctg ctt ccc cct ctg ttc ttc ctg cta 108
Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu
 1      5      10      15
gca tgt gcc ggc aac ttt gtc cac gga cac aag tgc gat atc acc tta 156
Ala Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Ile Thr Leu
 20      25      30
cag gag atc atc aaa act ttg aac agc ctc aca gag cag aag act ctg 204
Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu
 35      40      45

```

```

tgc acc gag ttg acc gta aca gac atc ttt gct gcc tcc aag aac aca 252
Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr
      50                      55                      60

act gag aag gaa acc ttc tgc agg gct gcg act gtg ctc cgg cag ttc 300
Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe
      65                      70                      75

tac agc cac cat gag aag gac act cgc tgc ctg ggt gcg act gca cag 348
Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln
      80                      85                      90                      95

cag ttc cac agg cac aag cag ctg atc cga ttc ctg aaa cgg ctc gac 396
Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp
      100                      105                      110

agg aac ctc tgg ggc ctg gcg ggc ttg aat tcc tgt cct gtg aag gaa 444
Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu
      115                      120                      125

gcc aac cag agt acg ttg gaa aac ttc ttg gaa agg cta aag acg atc 492
Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile
      130                      135                      140

atg aga gag aaa tat tca aag tgt tcg agc tga atattttaat ttatgagttt 545
Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser *
      145                      150

ttgatagctt tattttttaa gtatttatat atttataact catcataaaa taaagtatat 605
atagaatct 614

```

5 <210> 179  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 179

```

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

```

10  
 <210> 180  
 <211> 756  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (9)...(443)

5 <400> 180

```

gctggagg atg tgg ctg cag agc ctg ctg ctc ttg ggc act gtg gcc tgc 50
Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys
      1              5              10

agc atc tct gca ccc gcc cgc tgc ccc agc ccc agc acg cag ccc tgg 98
Ser Ile Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp
      15              20              25              30

gag cat gtg aat gcc atc cag gag gcc cgg cgt ctc ctg aac ctg agt 146
Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser
      35              40              45

aga gac act gct gct gag atg aat gaa aca gta gaa gtc atc tca gaa 194
Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu
      50              55              60

atg ttt gac ctc cag gag ccg acc tgc cta cag acc cgc ctg gag ctg 242
Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu
      65              70              75

tac aag cag ggc ctg cgg ggc agc ctc acc aag ctc aag ggc ccc ttg 290
Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu
      80              85              90

acc atg atg gcc agc cac tac aag cag cac tgc cct cca acc ccg gaa 338
Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu
      95              100             105             110

act tcc tgt gca acc cag act atc acc ttt gaa agt ttc aaa gag aac 386
Thr Ser Cys Ala Thr Gln Thr Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn
      115             120             125

ctg aag gac ttt ctg ctt gtc atc ccc ttt gac tgc tgg gag cca gtc 434
Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val
      130             135             140

cag gag tga gaccggccag atgaggctgg ccaagccggg gagctgctct 483
Gln Glu *

ctcatgaaac aagagctaga aactcaggat ggatcatcttg gagggaccaa ggggtgggcc 543
acagccatgg tgggagtggc ctggacctgc cctgggccac actgacctg atacagcat 603
ggcagaagaa tgggaatatt ttatactgac agaaatcagt aatatttata tatttatatt 663
tttaaaatat ttatttattt atttatttaa gtccatattc catatttatt caagatgttt 723
taccgtaata attattatta aaaatatgct tct 756
    
```

10 <210> 181  
 <211> 144  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 181

```

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
  1      5      10      15
Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
      20              25              30
    
```

```

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

5 <210> 182  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(60)  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25)...(30)  
 <223> n = A, T, G o C

15 <400> 182

```

gcc aca gaa ctg aaa cag ctt cag nnn nnn gaa gaa gaa ctc aaa cct 48
Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Xaa Xaa Glu Glu Glu Leu Lys Pro
  1                5                10                15

ctg gag gaa gtg . 60
Leu Glu Glu Val
      20
    
```

20 <210> 183  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (9)...(10)  
 <223> Qualquer aminoácido

30 <400> 183

```

Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Xaa Xaa Glu Glu Glu Leu Lys Pro
  1                5                10                15
Leu Glu Glu Val
      20
    
```

**REIVINDICACIONES**

1. Un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado que comprende:

5 un primer polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con los restos 20-649 de SEC ID N°: 109 y un segundo polipéptido que comprende los restos 28-429 de SEC ID N°: 7; en donde el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende los restos 27-164 de SEC ID N°: 2.

10 2. Un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el segundo polipéptido comprende los restos de aminoácidos 28-739 de SEC ID N°: 7.

15 3. Un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico antagoniza una actividad de un ligando que comprende los restos 27-164 de SEC ID N°: 2.

20 4. Un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el primer o el segundo polipéptidos comprenden además un marcador de afinidad o una molécula citotóxica; tal como en donde el marcador de afinidad es polihistidina, proteína A, glutatión S transferasa, Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag<sup>TM</sup>, péptido de unión a estreptavidina o polipéptido Fc de inmunoglobulina; tal como en donde la molécula citotóxica es una toxina o un radionúclido.

5. Un polinucleótido aislado que comprende:

25 un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con los restos 20-649 de SEC ID N°: 109; y un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido que comprende los restos 28-429 de SEC ID N°: 7;

30 en el que el primer y el segundo polipéptidos forman un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico que se une a un ligando que comprende los restos 27-164 de SEC ID N°: 2.

6. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la Reivindicación 5, en el que el segundo polipéptido comprende los restos de aminoácidos 28-739 de SEC ID N°: 7.

35 7. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la Reivindicación 5, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico antagoniza una actividad de un ligando que comprende los restos 27-164 de SEC ID N°: 2.

40 8. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la Reivindicación 5, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico comprende además un marcador de afinidad o una molécula citotóxica; tal como en donde el marcador de afinidad es polihistidina, proteína A, glutatión S transferasa, Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag<sup>TM</sup>, péptido de unión a estreptavidina o polipéptido Fc de inmunoglobulina; tal como en donde la molécula citotóxica es una toxina o un radionúclido.

45 9. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos de manera operable:

(i)

(a) un promotor de la transcripción;

50 (b) un segmento de ADN que comprende un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-8; y

(c) un terminador de la transcripción;

55 en el que el primer y el segundo polipéptidos forman un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico y en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende los restos 27-164 de SEC ID N°: 2;

o

(ii)

60 (a) un primer promotor de la transcripción; un primer segmento de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un primer polipéptido que tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que comprende los restos 20-649 de SEC ID N°: 109; y un primer terminador de la transcripción; y

65 (b) un segundo promotor de la transcripción; un segundo segmento de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un segundo polipéptido que comprende los restos 28-429 de SEC ID N°: 7; y un segundo terminador de la transcripción;

en el que el primer y el segundo polipéptidos forman un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico; y en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende los restos 27-164 de SEC ID N°: 2.

- 5 10. Una célula cultivada, que comprende:
- (i) un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 9, en donde la célula expresa el primer y el segundo polipéptidos codificados por el segmento de ADN o los segmentos de ADN; o que comprende:
- 10 (ii) un primer vector de expresión que comprende: a) un promotor de la transcripción; b) un segmento de ADN que codifica un primer polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con los restos 20-649 de SEC ID N°: 109; y c) un terminador de la transcripción; y
- 15 un segundo vector de expresión que comprende: a) un promotor de la transcripción; b) un segmento de ADN que codifica un segundo polipéptido que comprende los restos 28-429 de SEC ID N°: 7; y c) un terminador de la transcripción;
- en donde el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico;
- 20 y en donde el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende los restos 27-164 de SEC ID N°: 2.
11. Un procedimiento para producir un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico que comprende: cultivar una célula de acuerdo con la reivindicación 10; y aislar el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico producido por la célula.
- 25 12. Un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico aislado producido mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico inhibe la proliferación de células hematopoyéticas, inhibe la proliferación de células inmunitarias, inhibe la proliferación de células inflamatorias, inhibe una respuesta inmune, inhibe una respuesta inflamatoria o inhibe la proliferación de células tumorales de origen epitelial.
- 30 13. Una composición que comprende un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico de acuerdo con la reivindicación 1; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 14. Un procedimiento para producir un anticuerpo para un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico provoca una respuesta inmune en un animal inoculado para producir un anticuerpo que se une específicamente al receptor de citocinas multimérico o heterodimérico; y en el que el anticuerpo se aísla del animal.
- 40 15. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se unen específicamente a un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico, en donde el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico consiste en;
- un primer polipéptido que consiste en los restos de aminoácidos 20-649 de SEC ID N°: 109; y
- 45 un segundo polipéptido que consiste en los restos de aminoácidos 28-429, los restos de aminoácidos 28-739 o los restos de aminoácidos 28-979 de SEC ID N°: 7;
- y en donde el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende los restos 27-164 de SEC ID N°: 2.
- 50 16. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el segundo polipéptido consiste en los restos de aminoácidos 28-979 de SEC ID N°: 7.
17. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 15 o 16, en donde el anticuerpo es del grupo de: (a) un anticuerpo policlonal, (b) un anticuerpo monoclonal, (c) un fragmento de anticuerpo, (d) un anticuerpo monoclonal humano o (e) un anticuerpo quimérico.
- 55 18. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal murino o un anticuerpo humanizado derivado de este.
19. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en donde el anticuerpo comprende además un radionúclido, una enzima, un sustrato, un cofactor, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador peptídico, una partícula magnética, un fármaco o una toxina.
- 60 20. Un procedimiento para detectar o cuantificar la presencia de un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico en una muestra biológica, que comprende las etapas de:
- 65 (a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con las

reivindicaciones 15-18, en donde la puesta en contacto se efectúa en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo a la muestra biológica; y  
 (b) detectar o cuantificar cualquiera del anticuerpo unido o el fragmento de anticuerpo unido;

5 y de este modo detectar o cuantificar la presencia de un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico en la muestra biológica.

21. Un procedimiento para detectar la inflamación en un paciente, que comprende:

10 (i) llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 20 en una muestra biológica del paciente; en donde un nivel elevado de dicho receptor de citocinas multimérico o heterodimérico en la muestra biológica es indicativo de inflamación en el paciente; o  
 15 (ii) incubar una muestra de tejido o una muestra biológica del paciente con el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico producido mediante el procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 11, en condiciones en las que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a su polipéptido complementario en la muestra de tejido o en la muestra biológica; visualizar el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico unido en la muestra de tejido o la muestra biológica; y comparar los niveles de receptor de citocinas multimérico o heterodimérico unido en la muestra de tejido o la muestra biológica del paciente con una muestra de tejido o una muestra biológica normal de control; en donde un aumento en el nivel de receptor de citocinas multimérico o heterodimérico unido a la muestra de tejido o a la muestra biológica del paciente en relación a la muestra de tejido o la muestra biológica normal de control es indicativo de inflamación en el paciente.

22. Un procedimiento *in vitro* para reducir las células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas en una muestra de células de médula ósea o de sangre periférica, comprendiendo el procedimiento:

25 cultivar dicha muestra con una cantidad eficaz de la composición que comprende el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico producido mediante el procedimiento de la reivindicación 11 para producir una disminución en el número de células linfoides en la médula ósea o en las células de sangre periférica, en comparación con las células de médula ósea o de sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor de citocinas multimérico o heterodimérico.

23. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que las células hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides; tal como en donde las células linfoides son macrófagos o linfocitos T.

35 24. Un procedimiento *in vitro* para eliminar células cancerosas, que comprende formular un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico producido mediante el procedimiento de la Reivindicación 11 en un vehículo farmacéuticamente aceptable; y exponer una muestra biológica que contiene las células cancerosas a la formulación de receptor de citocinas multimérico o heterodimérico; en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico elimina a las células.

45 25. Un procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico está conjugado adicionalmente a una toxina.

26. Un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico producido mediante el procedimiento de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento del cáncer, mediante la eliminación de células cancerosas.

50 27. Un receptor para su uso de acuerdo con la reivindicación 26, en donde dicho receptor multimérico o heterodimérico se conjuga adicionalmente a una toxina.

28. Una composición de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en la supresión de una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación, en donde mediante;

55 (1) la determinación de un nivel de una molécula inflamatoria antes de la administración de dicha composición,  
 (2) la determinación de un nivel después de la administración de la molécula inflamatoria; y  
 (3) la comparación del nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (2); una ausencia de aumento o disminución en el nivel de la molécula inflamatoria es indicativo de la supresión de una respuesta inflamatoria.

60 29. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-19, para su uso en el tratamiento de un cáncer.

65 30. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 29, para tratar un cáncer reduciendo la proliferación de monocitos o macrófagos neoplásicos.

31. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicho cáncer se selecciona entre:
- (i) cáncer pancreático;
  - (ii) leucemia;
  - (iii) linfoma;
  - (iv) discrasia de células plasmáticas, tal como mieloma múltiple; o
  - (v) tumores de origen celular epitelial, tal como carcinoma, adenocarcinoma y melanoma.
32. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-19, para su uso en el tratamiento de:
- (i) asma;
  - (ii) alergias; o
  - (iii) enfermedades autoinmunes, tales como diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia grave y artritis reumatoide.
33. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-19, para su uso en el tratamiento de:
- (i) nefropatías, tales como glomeruloesclerosis, neuropatía membranosa, amiloidosis, arterioesclerosis renal y glomerulonefritis;
  - (ii) enfermedades fibroproliferativas del riñón; o
  - (iii) disfunción renal, asociada, por ejemplo, con LES, DMID, diabetes de tipo II (NIDDM) o tumores renales.
34. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-33, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
35. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-34, en donde dicho anticuerpo está conjugado a una toxina.
36. Un antagonista de un polipéptido zcytor17lig, tal como se muestra en la SEC ID N°: 2, para su uso en el tratamiento de un mamífero afectado con una enfermedad inflamatoria, tal como una enfermedad inflamatoria en la que está implicado dicho zcytor17lig, en donde el antagonista es:
- una composición de acuerdo con la reivindicación 13;
  - un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15; o
  - un receptor de citocinas multimérico o heterodimérico que comprende los aminoácidos 20-649 de SEC ID N°: 109 y los aminoácidos 28-429 de SEC ID N°: 7, en donde dicho receptor de citocinas multimérico o heterodimérico se une a un ligando que comprende los restos 27-164 de SEC ID N°: 2; en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
37. Un antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 36, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica; tal como una enfermedad inflamatoria crónica seleccionada del grupo de:
- (a) enfermedad inflamatoria del intestino;
  - (b) colitis ulcerosa;
  - (c) enfermedad de Crohn;
  - (d) dermatitis atópica;
  - (e) eczema; y
  - (f) psoriasis.
38. Un antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la enfermedad es dermatitis atópica.
39. Un antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 36, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda, tal como una enfermedad inflamatoria aguda seleccionada del grupo de:
- (a) endotoxemia;
  - (b) septicemia;
  - (c) síndrome de choque tóxico; y
  - (d) enfermedad infecciosa.
40. Un antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el receptor de citocinas multimérico o heterodimérico o el anticuerpo comprenden además un radionúclido, una enzima, un sustrato, un cofactor, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador peptídico, una partícula magnética, un fármaco o una toxina.



	1	15 16	30 31	45	
1 zcytor171ig	---ASHTLPVRLLRP	SDDVQKIVEELQSLS	KMLLKD--VEEEKGV		40
2 mzytor171ig	---ATCSLSFGAPIS	KEDLRTTIDLLKQES	QDLYNNYSIKQASGM		42
3 mIL-3	ASISGRDTHRLRTL	NCS-SIVKEIIGKL-	--PEP-----ELKT--		35
4 hIL-3	APMTQTTPLKTSW-V	NCS-NMIDEIITHLK	QPPLP--LLDFNNLN		41
	46	60 61	75 76	90	
1 zcytor171ig	LVSQNYTLPCLSPDA	QPPNNIHSPAIRAYL	KTIRQLDNKSVIDEI		85
2 mzytor171ig	SADESIQLPCFSLDR	EALTNISVIAHLEK	VKVLSE-NTVDTSWV		86
3 mIL-3	DDEGPSLRNKS----	-----FRRVNLSKFV	ESQGEVDPEDRYVIK		71
4 hIL-3	GEDQDILMENN----	-----LRRPNLEAFN	RAVKSL--QNASAIE		75
	91	105 106	120 121	135	
1 zcytor171ig	IEHLDKLIHQDAPET	NISVPTDTHE---CK	RFILTISQQFSECMD		127
2 mzytor171ig	IRWLTNISCFNPLNL	NISVPGNTDESVDCK	VFVLTVLKQFSNCMA		131
3 mIL-3	SNLQKLNCCLPSTAN	DSALPGVFIRDLD--	DFRKKLRFYMVH-LN		113
4 hIL-3	SILKNLLPCLPLATA	APTRHPIHIKDGDNW	EFRRKLTfy-----LK		116
	136	150 151	165 166	180	
1 zcytor171ig	LALKSLTSGAQQATT				142
2 mzytor171ig	ELQAKDNTTC				141
3 mIL-3	DLETVLTSRPPQPAS	GSVSPNrgTVEC			140
4 hIL-3	TLENA-----QAQQT	LSLAIF			133

FIG. 1

```

                10      20      30      40      50
ZCYTOR MASHSGPSTSVLFLFCCLGGWLASHTLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSLSKMLLKD--VEE
      :  :.....: :.....: :..  .....: :  : : .. ...
M17RL- MIFHTGTTKPTLVLLCCIGTWLATCSLSFGAPISKEDLRTTIDLLKQESQDLYNNYSIKQ
                10      20      30      40      50      60

                60      70      80      90      100      110
ZCYTOR EKGVLVSQNYTLPCLSPDAQPPNNIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDE-IIEHLDKLIHQ
      :  :.....: :.....: :..  .....: :.....: :..  :.....
M17RL- ASGMSADESIQLPCFSLDREALTNI--SVIIAHLEKVKVLSENTVDTSWIRWLTNISCQ
                70      80      90      100      110

                120      130      140      150      160
ZCYTOR DAPETNISVPTDTHE---CKRFILTISQQFSECM-DLALKSLTSGAQQATT
      .. :.....: X: :... :.....: X .. :. :.
M17RL- NPLNLNISVPGNTDESYDCKVFVLTVLKQFSNCMAELQAKDNTTC
                120      130      140      150      160

```

FIG. 2

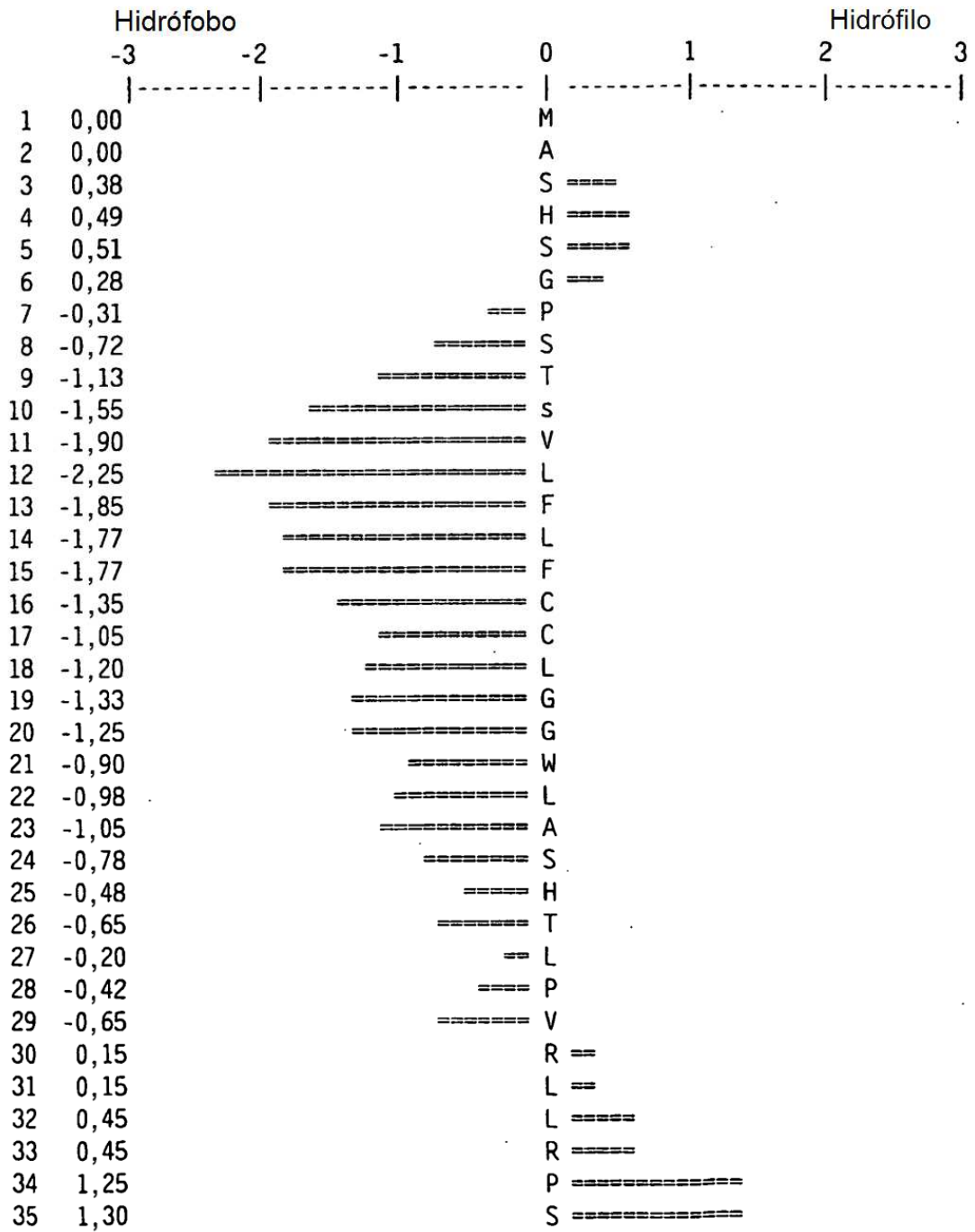


FIG. 3A

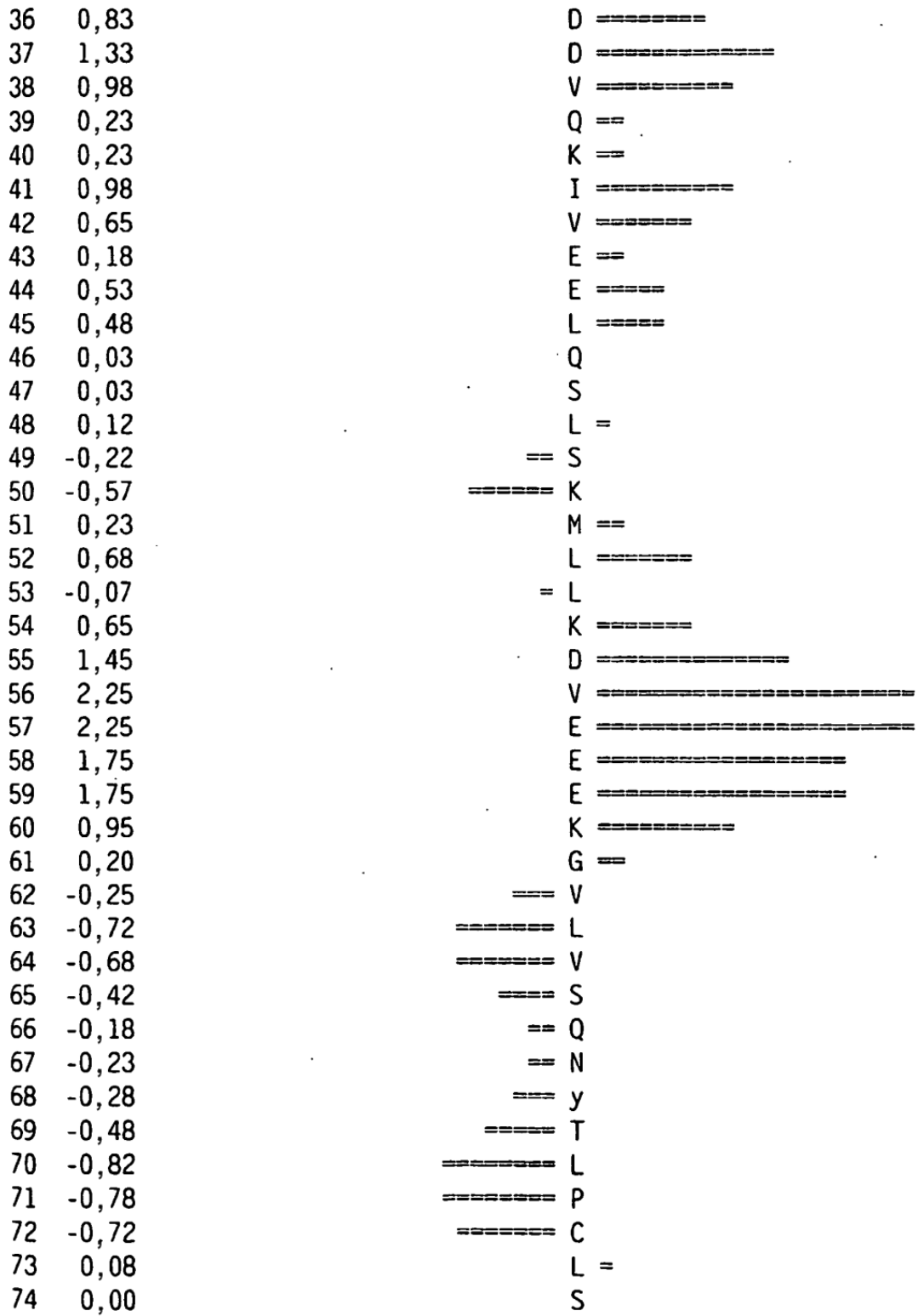


FIG. 3B

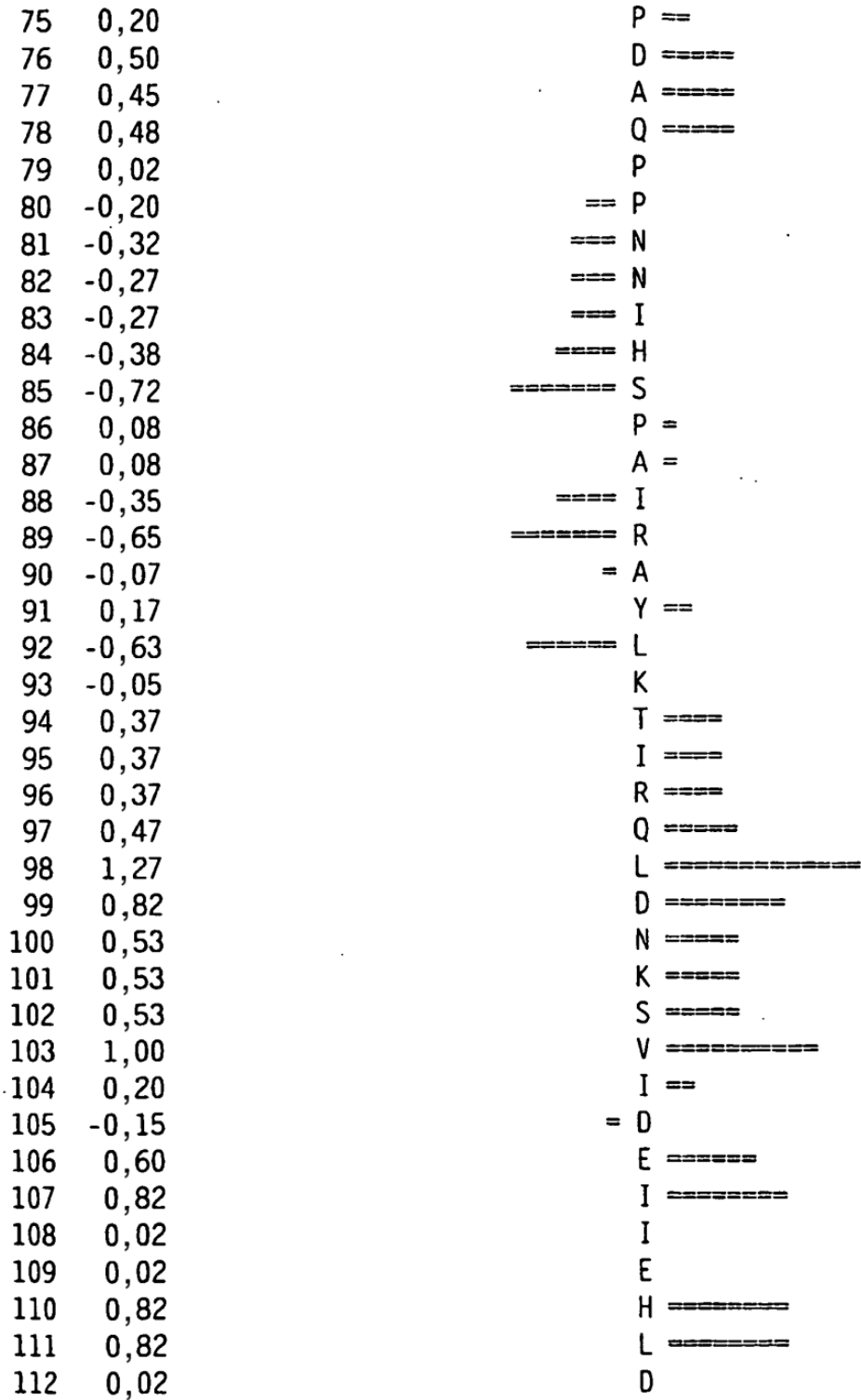


FIG. 3C

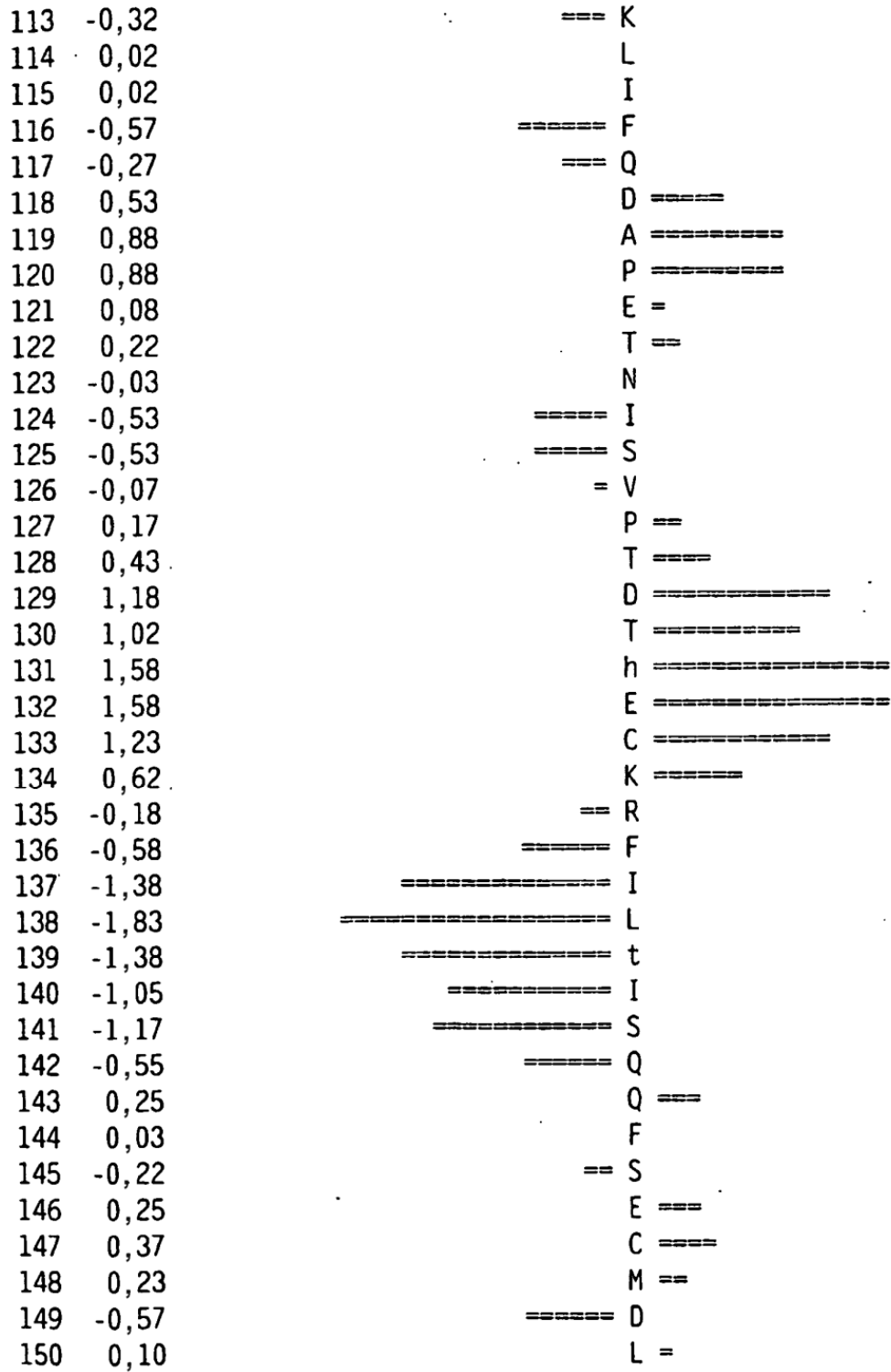


FIG. 3D

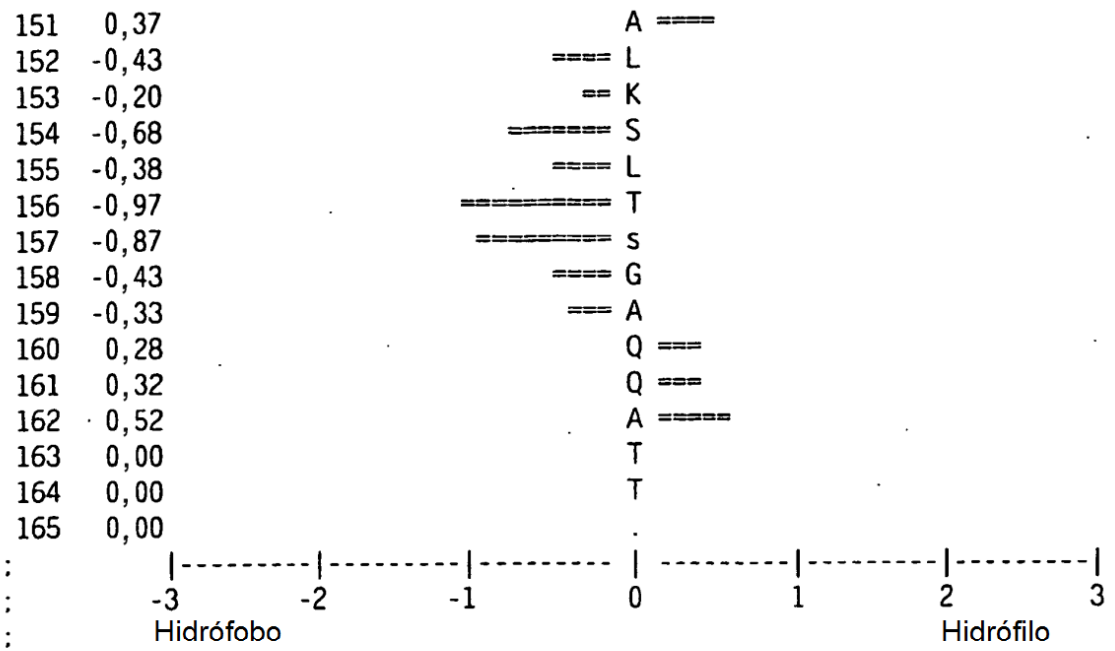


FIG. 3E

	1				50
SEC ID N° :109	MMWTWALWML	PSLCKFSLAA	LPAKPENISC	VYYYYRKNLTC	TWSPGKETS
SEC ID N° :113	MMWTWALWML	PSLCKFSLAA	LPAKPENISC	VYYYYRKNLTC	TWSPGKETS
SEC ID N° :111	MMWTWALWML	PSLCKFSLAA	LPAKPENISC	VYYYYRKNLTC	TWSPGKETS
SEC ID N° :115	MMWTWALWML	PSLCKFSLAA	LPAKPENISC	VYYYYRKNLTC	TWSPGKETS
	51				100
SEC ID N° :109	TQYTVKRTYA	FGEKHDNCTT	NSSTSENRAS	CSFFLPRITI	PDNYTIEVEA
SEC ID N° :113	TQYTVKRTYA	FGEKHDNCTT	NSSTSENRAS	CSFFLPRITI	PDNYTIEVEA
SEC ID N° :111	TQYTVKRTYA	FGEKHDNCTT	NSSTSENRAS	CSFFLPRITI	PDNYTIEVEA
SEC ID N° :115	TQYTVKRTYA	FGEKHDNCTT	NSSTSENRAS	CSFFLPRITI	PDNYTIEVEA
	101				150
SEC ID N° :109	ENGDGVIKSH	MTYWRELENIA	KTEPPKIFRV	KPVLGIKRFI	QIEWIKPELA
SEC ID N° :113	ENGDGVIKSH	MTYWRELENIA	KTEPPKIFRV	KPVLGIKRFI	QIEWIKPELA
SEC ID N° :111	ENGDGVIKSH	MTYWRELENIA	KTEPPKIFRV	KPVLGIKRFI	QIEWIKPELA
SEC ID N° :115	ENGDGVIKSH	MTYWRELENIA	KTEPPKIFRV	KPVLGIKRFI	QIEWIKPELA
	151				200
SEC ID N° :109	PVSSDLKYTL	RFRTVNSTSW	MEVNFANRK	DKNQTYNLTG	LQPFTEYVIA
SEC ID N° :113	PVSSDLKYTL	RFRTVNSTSW	MEVNFANRK	DKNQTYNLTG	LQPFTEYVIA
SEC ID N° :111	PVSSDLKYTL	RFRTVNSTSW	MEVNFANRK	DKNQTYNLTG	LQPFTEYVIA
SEC ID N° :115	PVSSDLKYTL	RFRTVNSTSW	MEVNFANRK	DKNQTYNLTG	LQPFTEYVIA
	201				250
SEC ID N° :109	LRCVAVKESKF	WSDWSQEKMG	MTEEEAPCGL	ELWRVLKPAE	ADGRRPVRL
SEC ID N° :113	LRCVAVKESKF	WSDWSQEKMG	MTEEEAPCGL	ELWRVLKPAE	ADGRRPVRL
SEC ID N° :111	LRCVAVKESKF	WSDWSQEKMG	MTEEEAPCGL	ELWRVLKPAE	ADGRRPVRL
SEC ID N° :115	LRCVAVKESKF	WSDWSQEKMG	MTEEEGKL . L	PAIPVLSALV	-----
	251				300
SEC ID N° :109	WKKARGAPVL	EKTLGYNIWY	YPESNTNLTE	TMNTTNQQL	LHLGGESFW
SEC ID N° :113	WKKARGAPVL	EKTLGYNIWY	YPESNTNLTE	TMNTTNQQL	LHLGGESFW
SEC ID N° :111	WKKARGAPVL	EKTLGYNIWY	YPESNTNLTE	TMNTTNQQL	LHLGGESFW
SEC ID N° :115	-----	-----	-----	-----	-----
	301				350
SEC ID N° :109	SMISYNSLGK	SPVATLRIPA	IQEKSFCIE	VMQACVAEDQ	LVVKWQSSAL
SEC ID N° :113	SMISYNSLGK	SPVATLRIPA	IQEK-----	-----	-----
SEC ID N° :111	SMISYNSLGK	SPVATLRIPA	IQEKSFCIE	VMQACVAEDQ	LVVKWQSSAL
SEC ID N° :115	-----	-----	-----	-----	-----

FIG. 4A



	351				400
SEC ID N° : 109	DVNTWMIWF	PDVDSEPTTL	SWESVSQATN	WTIQQDKLKP	FWCYNISVYP
SEC ID N° : 113	-----	-----	-----	-----	-----
SEC ID N° : 111	DVNTWMIWF	PDVDSEPTTL	SWESVSQATN	WTIQQDKLKP	FWCYNISVYP
SEC ID N° : 115	-----	-----	-----	-----	-----
	401				450
SEC ID N° : 109	MLHDKVGEPY	SIQAYAKEGV	PSEGPETKVE	NIGVKTVTIT	WKEIPKSERK
SEC ID N° : 113	-----	-----	-----	-----	-----
SEC ID N° : 111	MLHDKVGEPY	SIQAYAKEGV	PSEGPETKVE	NIGVKTVTIT	WKEIPKSERK
SEC ID N° : 115	-----	-----	-----	-----	-----
	451				500
SEC ID N° : 109	GIICNYTIFY	QAEGGKGFSS	TVNSSILQYG	LESLKRKTSY	IVQVMASSTA
SEC ID N° : 113	-----	-----	-----	-----	-----
SEC ID N° : 111	GIICNYTIFY	QAEGGKGFSS	TVNSSILQYG	LESLKRKTSY	IVQVMASSTA
SEC ID N° : 115	-----	-----	-----	-----	-----
	501				550
SEC ID N° : 109	GGTNGTSINF	KTLSFSVFEI	ILITSLIGGG	LLILIILTVA	YGLKKNKLT
SEC ID N° : 113	-----	-----	-----	-----	-----
SEC ID N° : 111	GGTNGTSINF	KTLSFSVFEI	ILITSLIGGG	LLILIILTVA	YGLKKNKLT
SEC ID N° : 115	-----	-----	-----	-----	-----
	551				600
SEC ID N° : 109	HLCWPTVNP	AESSIATWHG	DDFKDKLNLK	ESDDSVNTED	RILKPCSTPS
SEC ID N° : 113	-----	-----	-----	-----	-----
SEC ID N° : 111	HLCWPTVNP	AESSIATWHG	DDFKDKLNLK	ESDDSVNTED	RILKPCSTPS
SEC ID N° : 115	-----	-----	-----	-----	-----
	601				650
SEC ID N° : 109	DKLVIDKLVV	NFGNVLQEIF	TDEARTGOEN	NLGGEKNGTR	ILSSCPTSI~
SEC ID N° : 113	-----	-----	-----	-----	-----
SEC ID N° : 111	DKLVIDKLVV	NFGNVLQEIF	TDEARTGOEN	NLGGEKNGYV	TCPFRPDCPL
SEC ID N° : 115	-----	-----	-----	-----	-----
	651				700
SEC ID N° : 109	-----	-----	-----	-----	-----
SEC ID N° : 113	-----	-----	-----	-----	-----
SEC ID N° : 111	GKSFEELPVS	PEIPPRKSQY	LRSRMEGTR	PEAKEQLLFS	GQSLVPDHL
SEC ID N° : 115	-----	-----	-----	-----	-----

FIG. 4B

	701			733
SEC ID N° : 109	-----	-----	-----	---
SEC ID N° : 113	-----	-----	-----	---
SEC ID N° : 111	EEGAPNPYLK	NSVTAREFLV	SEKLPEHTKG	EV-
SEC ID N° : 115	-----	-----	-----	---

FIG. 4C



	410	420	430	440	450	460
ZCYTOR	YNISVYPMLHDKVGE	PYSIQAYAKEGVPSE	GPE	TKVENIGVKTVTITW	KEIPKSERKGII	
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
M17R-O	YNISVYPVLGHRVGE	PYSIQAYAKEGTPLK	GPETRVENIGLRTAT	ITWKEIPKSARNGFI		
	410	420	430	440	450	460
	470	480	490	500	510	520
ZCYTOR	CNYTIFYQAE	GKGF	SKT	VNSSILQYGLES	LKRKTSYIVQ	MASTSAGGTNGTSINF
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
M17R-O	NNYTVFYQAE	GKELSK	TVNSHALQCDLES	LTRRTSYTVW	MASTRAGGTNGVR	INF
	470	480	490	500	510	520
	530	540	550	560	570	580
ZCYTOR	SFSVFEIILITSL	IGGGLLILII	ILTVAYGLKKN	KLTHLCWPTVP	NPAESSIATWH	GDDF
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
M17R-O	SISVFEIVLLTSL	VGGGLLLS	IKTVTFLR	KPNRLTPLCC	PDVPNPAESS	LATWLG
	530	540	550	560	570	580
	590	600	610	620	630	640
ZCYTOR	KDKLNLKES	DDSVNTEDR	ILKPCSTP	SKLV	IDKLVVNF	GNVLQEIFTDEART
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
M17R-O	K-KSNMKETG	NSGNTEDV	VVKPCVPAD-	-LIDKLVVNF	FENFLEV	VLTEEAGKGOAS
	590	600	610	620	630	640
	650	660				
ZCYTOR	GEKNGTRIL	SSCPTSI				
	:: :	.....				
M17R-O	GEAN-EYIL	SQEPS	CPGHC			
	650	660				

Fig 5B