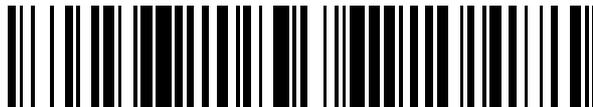


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 758**

51 Int. Cl.:

C07K 14/53 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2006 E 06734098 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 1848737**

54 Título: **Preparaciones homogéneas de IL-31**

30 Prioridad:

28.01.2005 US 648189 P

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

16.08.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRADY, LOWELL J.;
BUKOWSKI, THOMAS R. y
CHAN, CHUNG-LEUNG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 579 758 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparaciones homogéneas de IL-31

5 **Antecedentes de la invención**

La elevada disponibilidad e identificación de genes de genomas humanos y otros genomas ha conducido a una elevada necesidad de expresión y purificación eficaces de proteínas recombinantes. La expresión de proteínas en bacterias es con creces el enfoque más ampliamente usado para la producción de genes clonados. Por muchos motivos, se prefiere la expresión en bacterias a la expresión en células eucariotas. Por ejemplo, las bacterias son mucho más fáciles de cultivar que las células eucariotas. Más específicamente, la disponibilidad de una riqueza de herramientas genéticas moleculares sofisticadas y miles de mutantes hacen que *E. coli*, como hospedador de expresión, sea extremadamente útil para la producción de proteínas. Sin embargo, la producción de alto nivel de proteínas funcionales en *E. coli*, especialmente aquellas de fuentes eucariotas, ha sido frecuentemente difícil.

IL-31 es una proteína recientemente descubierta que tiene la estructura de una citocina de cuatro haces helicoidales. Esta nueva citocina se describe completamente en la solicitud PCT del mismo solicitante WO 03/060090 y Dillon, et al., Nature Immunol. 5:752-760, 2004. IL-31 es un ligando con alta especificidad por el receptor IL-31RA y al menos una subunidad adicional que comprende el receptor beta de oncostatina M. IL-31 se aisló de una biblioteca de ADNc generada a partir de glóbulos sanguíneos periféricos humanos (hPBC) activados, que se seleccionaron para CD3. CD3 es un marcador superficial celular único para células de origen linfoide, particularmente linfocitos T.

Tanto las formas murinas como humanas de IL-31 son conocidas por tener un número impar de cisteínas (solicitud PCT WO 03/060090 y Dillon, et al., arriba.) La expresión de IL-31 recombinante puede producir una mezcla heteróloga de proteínas compuestas de enlace disulfuro intramolecular en múltiples conformaciones. La separación de estas formas puede ser difícil y laboriosa. Por tanto, es deseable proporcionar moléculas de IL-31 que tengan un patrón de enlace disulfuro intramolecular único tras la expresión y métodos para el repliegamiento y la purificación de estas preparaciones para mantener la homogeneidad. Así, la presente invención proporciona composiciones y métodos para producir preparaciones homogéneas de IL-31.

A pesar de los avances en la expresión de proteínas recombinantes en hospedadores bacterianos, existe una necesidad de métodos mejorados para producir proteínas recombinantes IL-31 biológicamente activas y purificadas en sistemas procariontes que den mayor rendimiento para la producción de proteínas. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada. Además, diversas referencias se identifican a continuación y se incorporan por referencia en su totalidad.

El documento WO 03/060090 describe la citocina "ligando Zcytor17".

La presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 18, 23, 28, y resto 2 a resto 133 de SEQ ID NO: 23.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente ligados: un promotor de la transcripción; un segmento de ADN que codifica dicho polipéptido; y un terminador de la transcripción.

La presente invención también proporciona una célula cultivada en la que se ha introducido dicho vector de expresión, en la que la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN.

La presente invención proporciona además un proceso de producción de un polipéptido que comprende: cultivar una célula en la que se ha introducido dicho vector de expresión, en el que la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN; y recuperar el polipéptido expresado.

La presente invención proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a dicho polipéptido. La invención también proporciona un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente a dicho anticuerpo.

La presente invención también proporciona una formulación que comprende dicho polipéptido aislado y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención también proporciona un kit que comprende dicha formulación.

Dentro de un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 18, 23, y 28.

Dentro de otro aspecto, la invención proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente ligados: un promotor de la transcripción; un segmento de ADN que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 18, 23 y 28; y un terminador de la transcripción.

Dentro de otro aspecto, la invención proporciona una célula cultivada en la que se ha introducido un vector de expresión que comprende un segmento de ADN que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 18, 23 y 28, en la que la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN. Dentro de una realización, la célula cultivada es una célula procariota. Dentro de otra realización, la célula es una célula Gram-negativa. Dentro de otra realización, la célula es *E. coli*. Dentro de otra realización, la célula de *E. coli* es la cepa W3110 de *E. coli*.

Dentro de otro aspecto, la invención proporciona un proceso de producción de un polipéptido que comprende:

cultivar una célula en que se ha introducido en un vector de expresión que comprende un segmento de ADN que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 18, 23, y 28, y 28, en el que la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN; y recuperar el polipéptido expresado.

Dentro de otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 18, 23 y 28. Dentro de una realización, el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo humanizado derivado de un anticuerpo monoclonal murino, un fragmento de anticuerpo, anticuerpo neutralizante y un anticuerpo monoclonal humano. Dentro de otra realización, el fragmento de anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en F(ab'), F(ab), Fab', Fab, Fv, scFv y unidad mínima de reconocimiento.

Dentro de otro aspecto se proporciona un anticuerpo antiidiotípico que comprende un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo.

Dentro de otro aspecto la invención proporciona un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 18, 23 y 28.

Dentro de otro aspecto se proporciona una formulación que comprende:

un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 18, 23 y 28; y

un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dentro de una realización, formulación se proporciona en un kit.

Dentro de otro aspecto, el polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 18, 23 y 28 es proinflamatoria.

Dentro de otro aspecto la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de resto 2 a resto 133 de SEQ ID NO: 23.

Descripción detallada de la invención

Antes de exponer la invención en detalle, puede ser útil para el entendimiento de la misma definir los siguientes términos:

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

El término "variante alélica" se usa en el presente documento para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente mediante mutación, y puede producir polimorfismo fenotípico dentro de poblaciones. Las mutaciones de los genes pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencia de aminoácidos alterada. El término variante alélica también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

Los términos "extremo amino" y "extremo carboxilo" 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 porción particular de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia

posicionada en el extremo carboxilo con respecto a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está localizada proximal al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

5 El término "par complemento/anti-complemento" indica restos no idénticos que forman un par estable no covalentemente asociado bajo condiciones apropiadas. Por ejemplo, biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par complemento/anti-complemento. Otros pares complemento/anti-complemento a modo de ejemplo incluyen pares receptor/ligando, pares anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares polinucleótido sentido/antisentido, y similares. Si se desea la posterior disociación del par complemento/anti-complemento, el par complemento/anti-complemento tiene preferentemente una afinidad de unión de $<10^9$ M⁻¹.

15 El término "complementos de una molécula de polinucleótido" indica una molécula de polinucleótido que tiene una secuencia de base complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria a 5' CCCGTGCA 3'.

20 El término "cóntigo" indica un polinucleótido que tiene un estiramiento contiguo de secuencia idéntica o complementaria a otro polinucleótido. Se dice que las secuencias contiguas "solapan" un estiramiento dado de secuencia de polinucleótidos tanto en su totalidad como a lo largo de un estiramiento parcial del polinucleótido. Por ejemplo, cóntigos representativos a la secuencia de polinucleótidos 5'-ATGGCTTAGCTT-3' son 5'-TAGCTTgagtct-3' y 3'-gtcgcTACCGA-5'.

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

30 El término "vector de expresión" se usa para indicar una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés operativamente ligado a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Tales segmentos adicionales incluyen secuencias promotoras y terminadoras, y también pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores de selección, un potenciador, una señal de poliadenilación, etc. Los vectores de expresión se derivan generalmente de ADN de plásmido o viral, o pueden contener elementos de ambos.

35 El término "aislado", cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido se ha eliminado de su medio genético natural y así está libre de otras secuencias codificantes superfluas o no deseadas, y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas genéticamente manipuladas. Tales moléculas aisladas son aquellas que se separan de su entorno natural e incluyen ADNc y clones genómicos. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención están libres de otros genes con los que están generalmente asociados, pero pueden incluir regiones no traducidas de 5' y 3' que existen de forma natural tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Dynan y Tjian, Nature 316:774-78, 1985).

45 Un polipéptido "aislado" o proteína es un polipéptido o proteína que se encuentra en una condición distinta de su entorno nativo, tal como separada de la 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, superior al 95 % de pureza, más preferentemente superior al 99 % de pureza. 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.

50 El término "neoplásico", cuando se refiere a células, indica células que experimentan proliferación nueva y anormal, particularmente en un tejido en el que la proliferación no está controlada y es progresiva, produciendo una neoplasia. Las células neoplásicas pueden ser tanto malignas, es decir, invasivas y metastásicas, como benignas.

55 El término "operativamente ligados", cuando se refiere a segmentos de ADN, indica que los segmentos están dispuestos de manera que funcionan de acuerdo a sus fines previstos, por ejemplo, la transcripción se inicia en un promotor y avanza a través del segmento codificante hasta el terminador.

60 El término "ortólogo" indica un polipéptido o proteína obtenido de especies que es el homólogo funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de especiación.

65 Los "parálogos" son proteínas distintas, pero estructuralmente relacionadas, producidas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen mediante duplicación génica. Por ejemplo, α -globina, β -globina y mioglobina son parálogos entre sí.

Un "polinucleótido" es un polímero mono- o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídas del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse en *in vitro*, o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviado "pb"), nucleótidos ("nt") o kilobases ("kb"). Si el contexto lo permite, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que son monocatenarios o bicatenarios. Si el término se aplica a moléculas bicatenarias, se usa para indicar la longitud total y se entenderá que es equivalente al término "pares de bases". Se reconocerá por aquellos expertos en la materia que las dos hebras de un polinucleótido bicatenario pueden diferenciarse ligeramente en la longitud y que los extremos de las mismas pueden estar escalonados como resultado de escisión enzimática; así, todos los nucleótidos dentro de una molécula bicatenaria de polinucleótido pueden no estar emparejados.

Un "polipéptido" es un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, tanto si se producen naturalmente como sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos se denominan comúnmente "péptidos".

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

Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptidos. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos hidrato de carbono. Pueden añadirse hidratos de carbono y otros sustituyentes no peptídicos a una proteína por la célula en la que la proteína se produce, y variará con el tipo de célula. Las proteínas se definen en el presente documento en términos de sus estructuras de esqueleto de aminoácido; sustituyentes tales como grupos hidrato de carbono generalmente no se especifican, pero sin embargo pueden estar presentes.

El término "receptor" indica una proteína asociada a célula que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media en el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores unidos a membrana se caracterizan por una estructura multi-péptido que comprende un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio efector intracelular que normalmente participa en la transducción de señales. La unión del ligando al receptor produce un cambio conformacional en el receptor que produce una interacción entre el dominio efector y otra(s) molécula(s) en la célula. Esta interacción conduce a su vez a una alteración en el metabolismo de la célula. Los eventos metabólicos que están asociados a las interacciones receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumento en la producción de AMP cíclico, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de la membrana, adhesión de células, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser 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 de crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6).

El término "secuencia 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 vía secretora de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido más grande se escinde comúnmente para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la vía secretora.

El término "variante de corte y empalme" se usa en el presente documento para indicar formas alternativas de ARN transcritas de un gen. La variación de corte y empalme surge naturalmente mediante el uso de sitios de corte y empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita, o menos comúnmente entre moléculas de ARN transcritas por separado, y puede producir varios ARNm transcritos del mismo gen. Las variantes de corte y empalme pueden codificar polipéptidos que tienen secuencia de aminoácidos alterada. El término variante de corte y empalme también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante de corte y empalme de un ARNm transcrito de un gen.

Se entenderá que los pesos moleculares y longitudes de polímeros determinados por métodos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis en gel) son valores aproximados. Cuando un valor tal se expresa como "aproximadamente" X, el valor establecido de X se entenderá que es preciso a $\pm 10\%$.

La presente invención proporciona vectores de expresión y métodos de producción de la proteína IL-31 recombinante de un hospedador procarionta (como se define en las reivindicaciones) y se basa en parte en el descubrimiento de composiciones y métodos de producción de preparaciones homogéneas de IL-31. IL-31 es una proteína recientemente descubierta que tiene la estructura de una citocina de cuatro haces helicoidales. Esta citocina se identificó previamente como IL-31 y se describe completamente en la solicitud de patente de EE.UU. del mismo cesionario N.º 10/352,554, presentada el 21 de enero de 2003. Véanse la solicitud de patente de EE.UU. publicada N.º 2003-0224487 y la solicitud PCT WO 03/060090. Véase, por tanto, Dillon et al., Nature Immunol. 5:752-760, 2004. IL-31 es un ligando con alta especificidad por el receptor IL-31RA y al menos una subunidad

adicional que comprende el receptor beta de la oncostatina M (OSMRbeta). Las secuencias de polinucleótidos y de polipéptidos nativas para IL-31 humana se muestran en SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. SEQ ID NO: 3 muestra el polinucleótido degenerado para el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2. Las secuencias de polinucleótidos y de polipéptidos nativas para IL-31 de ratón se muestran en SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente. SEQ ID NO: 6 muestra el polinucleótido degenerado para el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5. Las secuencias de polinucleótidos y de polipéptidos nativas para IL-31RA humano se muestran en SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente. Las secuencias de polinucleótidos y de polipéptidos nativas para IL-31RA de ratón se muestran en SEQ ID NO: 9 y 10, respectivamente. Las secuencias de polinucleótidos y de polipéptidos nativas para OSMRbeta humano se muestran en SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente.

Tanto las formas murinas como humanas de IL-31 son conocidas por tener un número impar de cisteínas (solicitud PCT WO 03/060090 y Dillon, et al., arriba). La expresión de IL-31 recombinante puede producir una mezcla heteróloga de proteínas compuestas de enlace disulfuro intramolecular en múltiples conformaciones. La separación de estas formas puede ser difícil y laboriosa. Por tanto, es deseable proporcionar moléculas de IL-31 que tengan un patrón de enlace disulfuro intramolecular único tras la expresión y métodos para el repliegamiento y la purificación de estas preparaciones para mantener la homogeneidad.

En particular, los vectores de expresión y métodos descritos en el presente documento comprenden un sistema de expresión en *E. coli*. El uso de los vectores de expresión descritos en el presente documento mejoró significativamente el rendimiento de proteína recombinante recuperada de las bacterias.

La presente memoria descriptiva describe moléculas de polinucleótidos, que incluyen moléculas de ADN y de ARN, que codifican mutantes de cisteína de IL-31 que producen la expresión de una preparación de IL-31 recombinante que es una preparación homogénea. Para los fines de la presente invención, una preparación homogénea de IL-31 es una preparación que comprende al menos el 98 % de un patrón de enlace disulfuro intramolecular único en el polipéptido purificado. En otras realizaciones, la conformación de disulfuro único en una preparación de polipéptido purificado es un 99 % homogénea. En general, estos mutantes de cisteína mantendrán alguna actividad biológica de la IL-31 mutante, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, las moléculas de la presente invención pueden unirse al receptor de IL-31 con alguna especificidad. Generalmente, un ligando que se une a su receptor relacionado es específico cuando KD entra dentro del intervalo de 100 nM a 100 pM. La unión específica en el intervalo de KD 100 mM a 10 nM es unión de baja afinidad. Unión específica en el intervalo de KD 2,5 pM a 100 pM es unión de alta afinidad. En otro ejemplo, la actividad biológica de mutantes de cisteína de IL-31 está presente cuando las moléculas son capaces de algún nivel de actividad asociada a IL-31 no mutante como se describe en detalle en el presente documento.

Cuando se refiere a IL-31 nativa, el término debe significar IL-31 y Zcytor17lig. Cuando se refiere a IL-31RA, el término debe significar IL-31RA y Zcytor17.

La presente memoria descriptiva describe métodos de recuperación de proteína IL-31 recombinante a partir de un hospedador procarionota cuando la proteína IL-31 se expresa por el hospedador y se encuentra dentro de la célula hospedadora como un cuerpo de inclusión insoluble no glucosilado. Cuando la célula procarionota se lisa para aislar los cuerpos de inclusión (también llamados cuerpos refráctiles), los cuerpos de inclusión son agregados de IL-31. Por tanto, los cuerpos de inclusión deben disociarse y disolverse para aislar la proteína IL-31, y generalmente esto requiere el uso de un disolvente caotrópico desnaturalizante, produciendo la recuperación de un polipéptido que debe repliegarse para tener actividad biológica significativa. Una vez se repliega la proteína IL-31, la proteína debe capturarse y purificarse. Así, la presente memoria descriptiva describe métodos de aislamiento de la proteína IL-31 insoluble de células procarionotas, disolviendo el material de la proteína IL-31 insoluble en un disolvente caotrópico, diluyendo el disolvente caotrópico de tal manera que la proteína IL-31 se repliegue y se aisle. La presente memoria descriptiva describe métodos de captura de IL-31 renaturalizada a partir del tampón de repliegamiento diluido usando cromatografía de intercambio catiónico, y purificando la proteína IL-31 repliegada usando cromatografía de interacción hidrófoba. Se logra purificación adicional usando intercambio aniónico en ensayos de unión usando un receptor de IL-31 y similares.

La presente invención proporciona mutaciones en las secuencias no mutantes de IL-31 como se muestra en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, que producen la expresión de formas individuales de la molécula de IL-31. Debido a que se cree que la heterogeneidad de las formas es un resultado de patrones de enlaces disulfuro intramoleculares múltiples, realizaciones específicas de la presente invención incluyen mutaciones a los restos de cisteína dentro de las secuencias de IL-31 no mutantes. El polipéptido de IL-31 humano maduro se muestra en SEQ ID NO: 13, mostrando SEQ ID NO: 49 el polipéptido de IL-31 humano maduro con una metionina inicial. Las moléculas del polipéptido de IL-31 humano maduro pueden tener enlaces disulfuro entre el resto de cisteína en la posición 46 y la posición 107 de SEQ ID NO: 13, entre la posición 46 y 121 de SEQ ID NO: 13, y entre la posición 107 y 121 de SEQ ID NO: 13. Una mutación de cualquiera de estas tres cisteínas produce una forma mutante de la proteína IL-31 humana que solo formará un enlace disulfuro. Así, una mutación en la posición 46 producirá una proteína que forma un enlace disulfuro entre la posición 107 y la posición 121 de SEQ ID NO: 13; una mutación en la posición 107 producirá una proteína que forma un enlace disulfuro entre la posición 46 y la posición 121 de SEQ ID NO: 13; y una

mutación en la posición 121 producirá una proteína que forma un enlace disulfuro entre la posición 46 y la posición 107 de SEQ ID NO: 13. Las cisteínas en estas posiciones pueden mutarse, por ejemplo, a una serina, alanina, treonina, valina o asparagina. Por ejemplo, una proteína IL-31 humana que tiene una mutación de cisteína a serina en la posición 46 de SEQ ID NO: 13 se muestra en SEQ ID NO: 14; una proteína IL-31 humana que tiene una mutación de cisteína a serina en la posición 107 de SEQ ID NO: 13 se muestra en SEQ ID NO: 15; una proteína IL-31 humana que tiene una mutación de cisteína a serina en la posición 121 de SEQ ID NO: 13 se muestra en SEQ ID NO: 16.

Cuando IL-31 humana se expresa en *E. coli*, está presente una metionina del extremo N o del extremo amino. SEQ ID NO: 17-19, por ejemplo, muestran las secuencias de nucleótidos y de restos de aminoácido para IL-31 cuando la Met del extremo N está presente en estos mutantes.

Pueden hacerse mutaciones similares a la secuencia de polipéptidos de IL-31 de ratón. El polipéptido de IL-31 de ratón maduro se muestra en SEQ ID NO: 20. Las moléculas del polipéptido de IL-31 murino maduro pueden tener enlaces disulfuro entre el resto de cisteína en la posición 44 y la posición 87 de SEQ ID NO: 20, entre la posición 44 y 107 de SEQ ID NO: 20, entre la posición 44 y 121 de SEQ ID NO: 20; entre la posición 44 y 133 de SEQ ID NO: 20; entre la posición 87 y 107 de SEQ ID NO: 20; entre la posición 87 y 121 de SEQ ID NO: 20; entre la posición 87 y 133 de SEQ ID NO: 20; entre la posición 107 y 121 de SEQ ID NO: 20; entre la posición 107 y 133 de SEQ ID NO: 20; y entre la posición 121 y 133 de SEQ ID NO: 20. Una mutación de cualquiera de estas cisteínas produce una forma mutante de la proteína IL-31 de ratón. Las cisteínas en estas posiciones pueden mutarse, por ejemplo, a una serina, alanina, treonina, valina o asparagina. Por ejemplo, una proteína IL-31 de ratón que tiene una mutación de cisteína a serina en la posición 44 de SEQ ID NO: 20 se muestra en SEQ ID NO: 21; una proteína IL-31 de ratón que tiene una mutación de cisteína a serina en la posición 87 de SEQ ID NO: 20 se muestra en SEQ ID NO: 22; una proteína IL-31 de ratón que tiene una mutación de cisteína a serina en la posición 107 de SEQ ID NO: 20 se muestra en SEQ ID NO: 23; una proteína IL-31 de ratón que tiene una mutación de cisteína a serina en la posición 121 de SEQ ID NO: 20 se muestra en SEQ ID NO: 24; y una proteína IL-31 de ratón que tiene una mutación de cisteína a serina en la posición 133 de SEQ ID NO: 20 se muestra en SEQ ID NO: 25.

Cuando se expresa IL-31 de ratón en *E. coli*, está presente una metionina del extremo N o del extremo amino. SEQ ID NO: 26-30, por ejemplo, muestran las secuencias de nucleótidos y de restos de aminoácido para IL-31 cuando la Met del extremo N está presente en estos mutantes. Cuando los mutantes de Cys de IL-31 de ratón de la presente invención se hicieron en *E. coli* con serina en la posición 107 de SEQ ID NO: 20, se determinó que el extremo N purificado empezaba en la fenilalanina (Phe) en lugar de la alanina. Así, una realización de la invención es el polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 2 (Phe) a la posición 133 (Cys) de SEQ ID NO: 23.

El polinucleótido y las moléculas de polipéptido de la presente invención tienen una mutación en una o más de las cisteínas presentes en las moléculas de IL-31 nativas, incluso retienen algo de actividad biológica como se describe en el presente documento. Cuando se refiere a los mutantes de cisteína de IL-31, el término debe significar cualquiera de las formas mutadas de IL-31 descritas anteriormente, como se muestra en cualquiera de SEQ ID NO: 15, 18, 23 o 28, generalmente denominados mutantes de Cys de IL-31.

Puede usarse una línea celular que depende de la vía asociada al receptor OSMRbeta y Zcytor17 para la supervivencia y el crecimiento en ausencia de otros factores de crecimiento para medir la actividad de los mutantes de Cys de IL-31 descritos en el presente documento. La línea celular dependiente del factor de crecimiento preferida que puede usarse para la transfección y expresión del receptor de IL-31 es BaF3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986). Sin embargo, para este fin son adecuadas otras líneas celulares dependientes del factor de crecimiento, tales como FDC-P1 (Hapel et al., Blood 64: 786-790, 1984) y MO7e (Kiss et al., Leukemia 7: 235-240, 1993).

Un experto habitual en la materia apreciará que las diferentes especies pueden presentar "uso de codones preferenciales". En general, véanse, Grantham, et al., Nuc. Acids Res. 8:1893-912, 1980; Haas, et al. Curr. Biol. 6:315-24, 1996; Wain-Hobson, et al., Gene 13:355-64, 1981; Grosjean y Fiers, Gene 18:199-209, 1982; Holm, Nuc. Acids Res. 14:3075-87, 1986; Ikemura, J. Mol. Biol. 158:573-97, 1982. Como se usa en el presente documento, el término "uso de codones preferenciales" o "codones preferenciales" es un término de la técnica con referencia a los codones de traducción de proteínas que se usan lo más frecuentemente en células de una cierta especie, favoreciendo así a uno o a algunos representantes de los posibles codones que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido treonina (Thr) puede codificarse por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en células de mamífero ACC es el codón más comúnmente usado; en otras especies, por ejemplo, células de insecto, levadura, virus o bacterias, diferentes codones de Thr pueden ser preferenciales. Codones preferenciales para una especie particular pueden introducirse en los polinucleótidos de la presente invención mediante varios métodos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codones preferenciales en ADN recombinante puede, por ejemplo, potenciar la producción de la proteína haciendo la traducción de la proteína más eficaz dentro de un tipo particular de célula o especie. Por tanto, la secuencia de codones degenerados desvelada en SEQ ID NO: 3 sirve de molde para optimizar la expresión de polinucleótidos en diversos tipos de células y especies comúnmente usadas en la materia y desveladas en el presente documento. Las secuencias que contienen codones preferenciales pueden

probarse y optimizarse para la expresión en diversas especies, y probarse para funcionalidad como se desvela en el presente documento.

Como se ha indicado previamente, los polinucleótidos aislados descritos en el presente documento incluyen ADN y ARN. Los métodos de preparación de ADN y ARN son muy conocidos en la técnica. En general, el ARN se aísla de un tejido o célula que produce grandes cantidades de ARN de IL-31. Tales tejidos y células se identifican por transferencia Northern (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201, 1980), o cribando medio acondicionado de diversos tipos de células para actividad en células diana o tejido. Una vez se identifica la actividad de célula o tejido productor de ARN, puede prepararse ARN total usando extracción con isotiocianato de guanidinio, seguido de aislamiento por centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin et al., Biochemistry 18:52-94, 1979). Se prepara ARN poli(A)+ a partir de ARN total usando el método de Aviv y Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:1408-12, 1972). Se prepara ADN complementario (ADNc) a partir de ARN poli(A)+ usando métodos conocidos. Alternativamente, puede aislarse ADN genómico. Luego se identifican y aíslan polinucleótidos que codifican polipéptidos de IL-31 por, por ejemplo, hibridación o PCR.

Los polipéptidos o polipéptidos de IL-31 de variante con identidad de secuencias sustancialmente similar se caracterizan por tener una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferentemente de naturaleza menor, que es sustituciones de aminoácidos conservativas y otras sustituciones que no afectan significativamente el plegamiento o la actividad del polipéptido; deleciones pequeñas, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y extensiones del extremo amino o carboxilo, tales como un resto de metionina del extremo amino, un péptido conector pequeño de hasta aproximadamente 20-25 restos, o una marca de afinidad. La presente memoria descriptiva describe polipéptidos de aproximadamente 108 a 216 restos de aminoácidos que comprenden una secuencia que es al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o superior al 99 % idéntica a la región correspondiente de SEQ ID NO: 2. Los polipéptidos que comprenden marcas de afinidad pueden comprender además un sitio de escisión proteolítica entre el polipéptido de IL-31 y la marca de afinidad. Tales sitios preferidos incluyen sitios de escisión de trombina y sitios de escisión de factor Xa.

Puede generarse un perfil de hidrofilia de Hopp/Woods de la secuencia de proteínas IL-31 como se muestra en SEQ ID NO: 15-30 y SEQ ID NO: 49 (Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 78:3824-3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88:1-18, 1986 y Triquier et al., Protein Engineering 11:153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana de seis restos de deslizamiento. Se ignoraron los restos G, S y T enterrados y los restos H, Y y W expuestos.

Además, las proteínas de la presente invención (o fragmentos de polipéptidos de las mismas) puede unirse a otras moléculas bioactivas, particularmente otras citocinas, para proporcionar moléculas multi-funcionales. Por ejemplo, una o más hélices de IL-31 pueden unirse a otras citocinas para potenciar sus propiedades biológicas o eficiencia de producción.

La presente memoria descriptiva describe una serie de moléculas híbridas novedosas, en las que un segmento que comprende una o más de las hélices de IL-31 está fusionado a otro polipéptido. La fusión se hace preferentemente por corte y empalme al nivel de ADN para permitir la expresión de moléculas quiméricas en sistemas de producción recombinante. Las moléculas resultantes se ensayan entonces para propiedades tales como solubilidad mejorada, estabilidad mejorada, semivida de eliminación prolongada, expresión y niveles de secreción mejorados, y farmacodinámica. Tales moléculas híbridas pueden comprender además restos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, un conector polipeptídico) entre las proteínas o polipéptidos componente.

Los aminoácidos que no existen de forma natural incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, N-metilglicina, alo-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido piperídico, ácido tiazolidincarboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, terc-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen en la técnica varios métodos para incorporar restos de aminoácidos que no existen de forma natural en proteínas. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro* en el que las mutaciones terminadoras se suprimen usando ARNt supresores químicamente aminoacilados. Se conocen en la técnica métodos de síntesis de aminoácidos y de aminoacilar ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones terminadoras normalmente se lleva a cabo en un sistema libre de células que comprende un extracto S30 de *E. coli* y enzimas comercialmente disponibles y otros reactivos. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véanse, por ejemplo, Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722 (1991), Ellman et al., Methods Enzymol. 202:301 (1991), Chung et al., Science 259:806 (1993), y Chung et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 90:10145 (1993).

En un segundo método, la traducción se lleva a cabo en ovocitos de *Xenopus* por microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271:19991 (1996)). Dentro de un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que va a sustituirse (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del (de los) aminoácido(s) que no existe(n) de forma natural deseado(s) (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido que no existe de forma natural se incorpora en la proteína en lugar de su homólogo natural. Véase Koide et al., Biochem. 33:7470 (1994).

Los restos de aminoácidos que existen de forma natural pueden convertirse en especies que no existen de forma natural por modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida al sitio para expandir adicionalmente el intervalo de sustituciones (Wynn y Richard, *Protein Sci.* 2:395 (1993). Puede ser ventajoso estabilizar mutantes de IL-31 y de IL-31Cys para prolongar la semivida de la molécula, particularmente para prolongar la persistencia metabólica en un estado activo. Para lograr la semivida prolongada, moléculas mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden modificarse químicamente usando los métodos descritos en el presente documento. La PEGilación es un método comúnmente usado que se ha demostrado que aumenta la semivida en plasma, elevada solubilidad y reducida antigenicidad e inmunogenicidad (Nucci et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 6:133-155, 1991 y Lu et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:127-138, 1994).

Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético, aminoácidos que no existen de forma natural y aminoácidos no naturales pueden estar sustituidos por restos de aminoácidos mutantes de IL-31 y de IL-31Cys.

En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido mutante de IL-31 y de IL-31Cys puede estar operativamente ligado a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, que generalmente incluyen un promotor y terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá comúnmente uno o más marcadores de selección y uno o más orígenes de replicación, aunque aquellos expertos en la materia reconocerán que dentro de ciertos sistemas pueden proporcionarse marcadores de selección en vectores separados, y la replicación del ADN exógeno puede proporcionarse por la integración en el genoma de la célula hospedadora. La selección de promotores, terminadores, marcadores de selección, vectores y otros elementos es una cuestión de diseño rutinario dentro del nivel de la experiencia habitual en la materia. Muchos de tales elementos se describen en la bibliografía y están disponibles mediante proveedores comerciales.

Vectores de expresión que son adecuados para la producción de una proteína deseada en células procariotas normalmente comprenden (1) elementos de ADN procariota que codifican un origen bacteriano para el mantenimiento del vector de expresión en un hospedador bacteriano; (2) elementos de ADN que controlan la iniciación de la transcripción, tales como un promotor; (3) elementos de ADN que controlan el procesamiento de transcritos, tales como un terminador transcripcional, y (4) un gen que codifica un marcador de selección, tal como resistencia a antibióticos. La célula hospedadora procariota produce IL-31 tras la introducción de un vector de expresión. Por consiguiente, la presente invención contempla vectores de expresión que comprenden un promotor, la secuencia de nucleótidos de IL-31 y una secuencia terminadora. En otra realización, el vector de expresión comprende además un marcador de selección. En una realización, el marcador de selección es resistencia a kanamicina.

Los vectores de expresión también pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican una marca de péptido para ayudar en la purificación de la proteína deseada. Marcas de péptidos que son útiles para aislar polipéptidos recombinantes incluyen, por ejemplo, marcas de polihistidina (que tienen una afinidad por resina quelante de níquel), marcas c-myc, proteína de unión a calmodulina (aislada con cromatografía de afinidad por calmodulina), sustancia P, la marca RYIRS (que se une a anticuerpos anti-RYIRS), la marca Glu-Glu y la marca FLAG (que se une con anticuerpos anti-FLAG). Véanse, por ejemplo, Luo et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 329:215 (1996), Morganti et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 23:67 (1996), y Zheng et al., *Gene* 186:55 (1997). Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican tales marcas de péptido están disponibles, por ejemplo, de Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO).

Un experto habitual en la materia estará familiarizado con una multitud de técnicas moleculares para la preparación del vector de expresión. Por ejemplo, el polinucleótido IL-31 puede prepararse sintetizando moléculas de ácidos nucleicos usando oligonucleótidos largos que se ceban mutuamente y las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 8-8 a 8-9). Técnicas establecidas usando la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad de sintetizar moléculas de ADN de al menos dos kilobases de longitud (Adang et al., *Plant Molec. Biol.* 21:1131 (1993), Bambot et al., *PCR Methods and Applications* 2:266 (1993), Dillon et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 263-268 (Humana Press, Inc. 1993) y Holowachuk et al., *PCR Methods Appl.* 4:299 (1995)).

Otro método para construir sistemas de expresión utiliza recombinación homóloga usando un sistema de levadura. Véase la patente de EE.UU. N.º 6.207.442, *Plasmid Construction by Homologous Recombination*. El sistema proporciona un plásmido aceptor universal que puede usarse para clonar un ADN que codifica cualquier polipéptido de interés, que incluye fusiones de polipéptidos. El sistema proporciona métodos para preparar moléculas de ADN circular bicatenario que comprenden una región que codifica una proteína de interés. Uno o más fragmentos de ADN de donante que codifican la proteína de interés, es decir, IL-31, se combinan con un plásmido aceptor, un primer conector de ADN y un segundo conector de ADN en una célula hospedadora de *Saccharomyces cerevisiae* por la cual el fragmento de ADN de donante se une al plásmido aceptor por recombinación homóloga del ADN de donante, plásmido aceptor y conectores para formar el plásmido circular cerrado.

Las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento también pueden sintetizarse con "máquinas

génicas" usando protocolos tales como el método de fosforamidito. Si el ADN bicatenario químicamente sintetizado se requiere para una aplicación tal como la síntesis de un gen o un fragmento de gen, entonces cada hebra complementaria se prepara por separado. La producción de genes cortos (60 a 80 pares de bases) es técnicamente directa y puede llevarse a cabo sintetizando las hebras complementarias y luego hibridándolas. Para la producción de genes más largos (>300 pares de bases), sin embargo, pueden requerirse estrategias especiales, debido a que la eficiencia de acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis química de ADN es raramente del 100 %. Para vencer este problema, los genes sintéticos (bicatenarios) se ensamblan en forma modular a partir de fragmentos monocatenarios que son de 20 a 100 nucleótidos de longitud. Para revisiones sobre la síntesis de polinucleótido véanse, por ejemplo, Glick and Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press 1994), Itakura et al., *Annu. Rev. Biochem.* 53:323 (1984), y Climie et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:633 (1990).

Ejemplos de técnicas alternativas que pueden usarse para preparar el gen IL-31 y el vector de expresión incluyen, por ejemplo, digestión y ligación por endonucleasas de restricción, y reacción en cadena de la polimerasa, todas las cuales son muy conocidas en la técnica.

Está disponible una amplia variedad de genes marcadores de selección (véanse, por ejemplo, Kaufman, *Meth. Enzymol.* 185:487 (1990); Kaufman, *Meth. Enzymol.* 185:537 (1990)). Es común que los vectores de expresión comprendan marcadores de selección, tales como resistencia a tetraciclina, resistencia a ampicilina, resistencia a kanamicina, resistencia a neomicina o resistencia a cloranfenicol. Un marcador de selección permitirá la selección y/o detección de células que han sido transformadas con vector de expresión de células que no se han transformado. Un vector de expresión puede llevar más de un gen de resistencia a antibiótico tal. Un ejemplo de marcador de selección sin resistencia a antibiótico usa el sistema *hok/sok* del plásmido R1. El gen *hok* codifica la proteína tóxica Hok de 52 aminoácidos y el gen *sok* codifica un ARN antisentido, que es complementario a la secuencia conductora de ARNm de *hok*. Este marcador de selección es conocido para un experto en la materia y se describe en más detalle por Gerdes, K. et al., *Genetic Engineering*, 19:49-61, 1997.

Una amplia variedad de células hospedadoras recombinantes adecuadas está englobada por la presente invención e incluye, pero no se limita a, organismos hospedadores procariotas Gram-negativos. Cepas de *E. coli* adecuadas incluyen W3110, cepas derivadas de K12 MM294, TG-1, JM-107, BL21 y UT5600. Otras cepas adecuadas incluyen: BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DHSIF', DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, ER1647, K12 de *E. coli*, K12 RV308 de *E. coli*, K12 C600 de *E. coli*, HB101 de *E. coli*, K12 C600 R.sub.k-M.sub.k- de *E. coli*, K12 RR1 de *E. coli* (véase, por ejemplo, Brown (ed.), *Molecular Biology Labfax* (Academic Press 1991)). Otros hospedadores procariotas Gram-negativos pueden incluir *Serratia*, *Pseudomonas*, *Caulobacter*. Los hospedadores procariotas pueden incluir organismos Gram-positivos tales como *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, y *B. thuringiensis* var. *israelensis*, además de *Streptomyces*, por ejemplo, *S. lividans*, *S. ambofaciens*, *S. fradiae* y *S. griseofuscus*. Cepas adecuadas de *Bacillus subtilis* incluyen BR151, YB886, MI119, MI120 y B170 (véase, por ejemplo, Hardy, "Bacillus Cloning Methods", en *DNA Cloning: A Practical Approach*, Glover (ed.) (IRL Press 1985)). Técnicas convencionales para propagar vectores en hospedadores procariotas son muy conocidos para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª Edición (John Wiley & Sons 1995); Wu et al., *Methods in Gene Biotechnology* (CRC Press, Inc. 1997)). Para una visión general de cepas deficientes en proteasa en procariotas véase Meerman et al., *Biotechnology* 12:1107-1110, 1994. La presente invención se ejemplifica usando la cepa W3110, que se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como ATCC N.º 27325.

Técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir ADN exógeno en varias células hospedadoras se desvelan por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987. Las células hospedadoras transformadas o transfectadas se cultivan según procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células hospedadoras elegidas. Se conocen en la técnica varios medios adecuados, que incluye medios definidos y medios complejos, y generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios también pueden contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, según se requiera. El medio de crecimiento generalmente se seleccionará para células que contienen el ADN exógenamente añadido, por ejemplo, por selección de fármaco o deficiencia en un nutriente esencial que está complementado por el marcador de selección llevado en el vector de expresión o co-transfectado en la célula hospedadora. Se proporcionan cultivos líquidos con aireación suficiente mediante medios convencionales, tales como agitación de matraces pequeños o burbujeo de fermentadores. Las células transformadas pueden seleccionarse y propagarse para proporcionar células hospedadoras recombinantes que expresan el gen de interés. IL-31 puede expresarse en *E. coli* usando el sistema de fusión de MBP (proteína de unión a maltosa) (New England Biolabs (NEB; Beverly, MA)). En este sistema, el ADNc de IL-31 se une al extremo 3' del gen *malE* para formar una proteína de fusión MBP-IL-31. La expresión de proteínas de fusión es accionada por el promotor *tac* y está "apagada" hasta que un promotor se induce mediante la adición de 1 mmol de IPTG (b-tiogalactosilpiranosido de isopropilo). Las construcciones pueden construirse como fusiones en el marco con MBP según el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pMAL-c2 (NEB), y según las especificaciones del fabricante.

La fermentación de proteínas de hospedadores procariotas es muy conocida para un experto habitual en la materia. Tras la fermentación, las células se recogen por centrifugación, se resuspenden en tampón de homogenización y se homogeneizan, por ejemplo, en un homogeneizador APV-Gaulin (Invensys APV, Tonawanda, Nueva York) u otro tipo de equipo de rotura de células, tal como molinos de perlas y sonicadores. Alternativamente, las células se toman directamente del fermentador y se homogeneizan en un homogeneizador APV-Gaulin. Alternativamente, el caldo de fermentación puede diluirse con agua o tampón antes de la homogenización y recuperación de mutantes de IL-31 o de IL-31Cys.

Adicionalmente, los métodos de recuperación de IL-31 pueden comprender otra etapa de precipitar, lavar y resolubilizar la IL-31. Los cuerpos de inclusión lavados se solubilizan en guanidina 6 M o urea 8 M, se diluyen 6-10 veces en agua o tampón, se incuban 30 minutos y se centrifugan o se filtran. Alternativamente, puede usarse ultrafiltración o macrofiltración para lavar los cuerpos de inclusión después de la homogenización. El precipitado resultante se lava en urea 2-6 M, y contiene la proteína IL-31. El precipitado se lava entonces con agua antes de la solubilización. Adición de Al^{3+} o Fe^{3+} o polímeros aniónicos y catiónicos o puede añadirse agentes tales como espermina, PEI y benzonasa para precipitar el residuo de células, proteínas solubles, ADN, ARN e hidratos de carbono.

La preparación de cuerpos de inclusión lavada puede solubilizarse usando clorhidrato de guanidina (5-8 M), tiocianato de guanidina (5-6 M) o urea (7 - 8 M) que contiene un agente reductor tal como beta-mercaptoetanol (10 - 100 mM) o ditiotreitól (5-50 mM). Las soluciones pueden prepararse en Tris, fosfato, HEPES u otro tampón apropiado. Los cuerpos de inclusión también pueden solubilizarse con urea (2-4 M) que contiene laurilsulfato de sodio (0,1-2 %). Los cuerpos de inclusión de 1 litro de caldo de fermentación pueden solubilizarse usando 50 - 200 ml de las soluciones descritas. El método proporciona solubilizar los sedimentos del cuerpo de inclusión de 1 litro de caldo de fermentación en 150 ml de $GuHCl$ 6 M preparado en Tris 100 mM, pH 8,0, que contiene DTT 40 mM. En otra realización, una suspensión de cuerpos de inclusión se mezcla con 50-100 ml de $GuHCl$ 8 M. La suspensión se resuspende mezclando con una espátula, seguido de homogenización con un homogeneizador Omni EZ (Omni International, Warrenton, VA) o mezclando con un dispositivo mecánico. La suspensión se mezcla durante 30 - 120 minutos, a 3-37 °C. En una realización, la suspensión se mezcla a 15-25 °C, para acabar el proceso de solubilización. La muestra se centrifuga entonces a 7.500 - 16.000 x g a 4 °C durante 10-30 minutos usando una centrifuga apropiada. La muestra de sobrenadante que contiene la IL-31 solubilizada se decanta y se retiene, y se determina la concentración de IL-31 en la fracción solubilizada.

En un aspecto del proceso para recuperar IL-31 purificada de cepas hospedadoras de *E. coli* transformadas en las que la IL-31 se expresa como cuerpos de inclusión refráctiles, las células se rompen y los cuerpos de inclusión se recuperan por procesos muy conocidos en la técnica.

El replegamiento también puede hacerse en presencia de EDTA para reducir la oxidación de metionina, o sobre una columna de exclusión por tamaño, o usando filtración de flujo tangencial, o electrodiálisis.

Puede ser deseable la purificación de IL-31 para eliminar las impurezas y contaminantes restantes. Por ejemplo, puede usarse una columna de intercambio aniónico para reducir el nivel de endotoxinas. IL-31 se diluye a un nivel de conductividad de < 10 mS/cm y el pH se ajusta a 8,0. Se aplica a una columna Q Sepharose FF (Amersham Biosciences) que ha sido equilibrada a Tris 20 mM, pH 8,0. La IL-31 pasa a través de la columna y tiene una reducción de aproximadamente el 80 % de endotoxina en comparación con la carga. También pueden usarse membranas Mustang Q o Mustang E (Pall, Port Washington, NY) para reducir los niveles de endotoxinas entre pH 5,0 y 9,0.

Otras etapas de purificación que podrían posiblemente usarse para purificar adicionalmente la IL-31 incluyen cromatografía con quelato metálico, cromatografía de intercambio aniónico, o cromatografía de interacción hidrófoba sobre una columna de fenilo. También es posible llevar a cabo la purificación antes del replegamiento de la IL-31 usando, por ejemplo, HPLC de fase inversa, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía con quelato metálico. Así, la presente memoria descriptiva describe métodos que comprenden las etapas adicionales de purificación desveladas en el presente documento.

La presente memoria descriptiva describe fragmentos de polipéptidos o péptidos que comprenden una porción que lleva epítipo de un polipéptido mutante de IL-31 y de IL-31Cys descrito en el presente documento. Tales fragmentos o péptidos pueden comprender un "epítipo inmunogénico", que es una parte de una proteína que provoca una respuesta de anticuerpos cuando la proteína entera se usa como inmunogén. Los péptidos inmunogénicos que llevan epítipo pueden identificarse usando métodos convencionales (véase, por ejemplo, Geysen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:3998 (1983)).

A diferencia, los fragmentos de polipéptidos o péptidos pueden comprender un "epítipo antigénico", que es una región de una molécula de proteína a la que un anticuerpo puede unirse específicamente. Ciertos epítipos consisten en un estiramiento lineal o contiguo de aminoácidos, y la antigenicidad de un epítipo tal no se altera por agentes desnaturizantes. Se sabe en la técnica que pueden usarse péptidos sintéticos relativamente cortos que pueden

imitar a epítopes de una proteína para estimular la producción de anticuerpos contra la proteína (véase, por ejemplo, Sutcliffe et al., *Science* 219:660 (1983)). Por consiguiente, los péptidos y polipéptidos que llevan epítopes antigénicos de la presente invención son útiles para producir anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a los polipéptidos descritos en el presente documento. Pueden usarse los perfiles de hidrofilia de Hopp/Woods para determinar regiones que tienen el mayor potencial antigénico (Hopp et al., 1981, *ibidem*, y Hopp, 1986, *ibidem*). Por ejemplo, en IL-31 humana, las regiones hidrófilas incluyen los restos de aminoácidos 54-59 de SEQ ID NO: 49, los restos de aminoácidos 129-134 de SEQ ID NO: 49, los restos de aminoácidos 53-58 de SEQ ID NO: 49, los restos de aminoácidos 35-40 de SEQ ID NO: 49 y los restos de aminoácidos 33-38 de SEQ ID NO: 49. Por ejemplo, en IL-31 de ratón, las regiones hidrófilas incluyen los restos de aminoácidos 34-39 de SEQ ID NO: 20, los restos de aminoácidos 46-51 de SEQ ID NO: 20, los restos de aminoácidos 131-136 de SEQ ID NO: 20, los restos de aminoácidos 158-163 de SEQ ID NO: 20 y los restos de aminoácidos 157-162 de SEQ ID NO: 20

Los péptidos y polipéptidos que llevan epítopes antigénicos contienen preferentemente al menos de cuatro a diez aminoácidos, al menos de diez a catorce aminoácidos, o aproximadamente de catorce a aproximadamente treinta aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5. Tales péptidos y polipéptidos que llevan epítopes pueden producirse fragmentando un polipéptido de IL-31, o por síntesis química de péptidos, como se describe en el presente documento. Además, los epítopes pueden seleccionarse por presentación en fagos de bibliotecas aleatorias de péptidos (véase, por ejemplo, Lane and Stephen, *Curr. Opin. Immunol.* 5:268 (1993); y Cortese et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:616 (1996)). Métodos convencionales para identificar epítopes y producir anticuerpos a partir de péptidos pequeños que comprenden un epítope se describen, por ejemplo, por Mol, "Epitope Mapping", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, Manson (ed.), páginas 105-116 (The Humana Press, Inc. 1992); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application*, Ritter and Ladyman (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995), y Coligan et al. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, páginas 9.3.1 - 9.3.5 y páginas 9.4.1 - 9.4.11 (John Wiley & Sons 1997).

En un experimento en el que las proteínas de la presente invención se cribaron como un antígeno para eficacia en la producción de anticuerpos monoclonales de ratón anti-IL-31 humana, las fusiones derivadas de ratones inmunizados con la IL-31 producida por BHK tuvieron la mejor capacidad neutralizante que la IL-31 producida por *E. coli* con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

Independientemente de la secuencia de nucleótidos particular de un polinucleótido mutante de IL-31 y de IL-31Cys de variante, el polinucleótido codifica un polipéptido que se caracteriza por su actividad proliferativa o de diferenciación, su capacidad para inducir o inhibir funciones especializadas de la células, o por la capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o receptor Zcytor17. Más específicamente, los polinucleótidos mutantes de IL-31 y de IL-31Cys de variante codificarán polipéptidos que presentan al menos el 50 % y preferentemente al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o superior al 99 %, de la actividad del polipéptido como se muestra en SEQ ID NO: 2.

Para cualquier polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, que incluye variantes y proteínas de fusión, un experto habitual en la materia puede generar fácilmente una secuencia de polinucleótidos completamente degenerada que codifica esa variante usando la información expuesta en las Tablas 1 y 2 anteriores.

La presente memoria descriptiva describe varias otras fusiones de polipéptidos (y proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones de polipéptidos). Por ejemplo, puede prepararse un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys como una fusión con una proteína dimerizante como se desvela en las patentes de EE.UU. N.º 5.155.027 y 5.567.584. Proteínas dimerizantes preferidas a este respecto incluyen dominios de la región constante de inmunoglobulina. Las fusiones de inmunoglobulina-polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden expresarse en células genéticamente manipuladas (para producir varios análogos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys multiméricos). Dominios auxiliares pueden fusionarse con polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys para dirigirlos a células específicas, tejidos o macromoléculas. Por ejemplo, un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o proteína podría dirigirse a un tipo predeterminado de célula fusionando un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys con un ligando que se une específicamente a un receptor sobre la superficie de esa célula diana. De esta forma, los polipéptidos y proteínas pueden dirigirse para fines terapéuticos o de diagnóstico. Un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys puede fusionarse con dos o más restos, tales como una marca de afinidad para la purificación y un dominio de direccionamiento. Las fusiones de polipéptidos también pueden comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase Tuan et al., *Connective Tissue Research* 34:1-9, 1996.

Los polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys descritos en el presente documento, que incluyen polipéptidos de longitud completa, fragmentos funcionales y polipéptidos de fusión, pueden producirse en células hospedadoras genéticamente manipuladas según técnicas convencionales. Células hospedadoras adecuadas son aquellos tipos de células que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y cultivarse en cultivo, e incluyen bacterias, células fúngicas y células eucariotas superiores cultivadas. Se prefieren células eucariotas, particularmente las células cultivadas de organismos multicelulares. Técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir el ADN exógeno en varias células hospedadoras se desvelan por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory*

Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, Inc., NY, 1987.

5 Para dirigir un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys en la vía secretora de una célula hospedadora, se proporciona una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia conductora, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector de expresión. La secuencia señal secretora puede ser aquella de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, o puede derivarse de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA) o sintetizarse de novo. La secuencia señal secretora está operativamente ligada a la secuencia de ADN de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, es decir, las dos secuencias se unen en el marco de lectura correcto y se posicionan para dirigir el polipéptido recién sintetizado en la vía secretora de la célula hospedadora. Las secuencias señal secretoras están comúnmente localizadas 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal secretoras pueden estar localizadas en cualquier parte en la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch et al., patente de EE.UU. N.º 5.037.743; Holland et al., patente de EE.UU. N.º 5.143.830).

15 Alternativamente, la secuencia señal secretora contenida en los polipéptidos de la presente invención se usa para dirigir otros polipéptidos en la vía secretora. La presente invención proporciona tales polipéptidos de fusión. Puede prepararse un polipéptido de fusión señal en el que una secuencia señal secretora derivada del resto de aminoácido 1-23 de SEQ ID NO: 2 o los restos 1-23 SEQ ID NO: 5 está operativamente ligada a una secuencia de ADN que codifica otro polipéptido usando métodos conocidos en la técnica y desvelados en el presente documento. La secuencia señal secretora contenida en los polipéptidos de fusión de la presente invención está preferentemente fusionada en el extremo amino con un péptido adicional para dirigir el péptido adicional dentro de la vía secretora. Tales construcciones tienen numerosas aplicaciones conocidas en la técnica. Por ejemplo, estas novedosas construcciones de fusión de secuencia 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 los péptidos a través de la vía secretora.

30 Células hospedadoras procariontas, que incluyen cepas de las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus* y otros géneros, también son células hospedadoras útiles dentro de la presente invención. Técnicas para transformar estos hospedadores y expresar secuencias de ADN exógeno clonado en ellas son muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *ibídem*). Cuando se expresa un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede ser 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 lisan, y los gránulos se recuperan y se desnaturalizan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado pueden entonces replegarse y dimerizarse diluyendo el desnaturalizante, tal como por diálisis contra una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguido de diálisis contra una solución salina tamponada. En el último caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional rompiendo las células (por, por ejemplo, sonicación o choque osmótico) para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando así la necesidad de desnaturalización y replegamiento.

40 Se cultivan células hospedadoras transformadas o transfectadas según procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células hospedadoras elegidas. Se conocen en la técnica varios medios adecuados, que incluye medios definidos y medios complejos, y generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios también pueden contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, según se requiera. El medio de crecimiento generalmente se seleccionará para células que contienen el ADN exógenamente añadido por, por ejemplo, selección de fármaco o deficiencia en un nutriente esencial que está complementado por el marcador de selección llevado sobre el vector de expresión o co-transfectado en la célula hospedadora. Se cultivan células de *P. methanolicus* en un medio que comprende fuentes adecuadas de carbono, nitrógeno y oligonutrientes a una temperatura de aproximadamente 25 °C a 35 °C. Los cultivos líquidos se proporcionan con aireación suficiente mediante medios convencionales, tales como agitación de matraces pequeños o burbujeo de fermentadores. Un medio de cultivo preferido para *P. methanolicus* es YEPD (2 % de D-glucosa, 2 % de Bacto™ Peptone (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1 % de extracto de levadura Bacto™ (Difco Laboratories), 0,004 % de adenina y 0,006 % de L-leucina).

55 Se prefiere purificar los polipéptidos de la presente invención a ≥ 80 % de pureza, más preferentemente a ≥ 90 % de pureza, incluso más preferentemente ≥ 95 % de pureza, y particularmente se prefiere un estado farmacéuticamente puro, que es más del 99,9 % puro con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y libre de agentes infecciosos y pirogénicos. Preferentemente, un polipéptido purificado está sustancialmente libre de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal.

60 Polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys recombinantes expresados (o polipéptidos de IL-31 quiméricos) pueden purificarse usando fraccionamiento y/o métodos y medios de purificación convencionales. Puede usarse precipitación con sulfato de amonio y extracción con ácido o caótropro para el fraccionamiento de muestras. Etapas de purificación a modo de ejemplo pueden incluir hidroxipatita, exclusión por tamaño, FPLC y cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa. Medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa,

celulosa, poliacrilamida, sílices de especialidad y similares. Se prefieren PEI, DEAE, QAE y derivados de Q. Medios cromatográficos a modo de ejemplo incluyen aquellos medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como Phenyl-Sepharose FF (Farmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Farmacia) y similares; o resinas poliacrílicas, tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticulada, perlas de poliestireno, resinas de poliacrilamida reticulada y similares que son insolubles en las condiciones en las que van a usarse. Estos soportes pueden modificarse con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de hidrato de carbono. Ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida, y derivados de carboxilo y amino para las químicas de acoplamiento de carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son muy conocidos y se usan ampliamente en la materia, y están disponibles de proveedores comerciales. Métodos para la unión de polipéptidos de receptor a medios de soporte son muy conocidos en la técnica. La selección de un método particular es una cuestión de diseño rutinario y se determina en parte por las propiedades del soporte elegido. Véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Farmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988.

Los polipéptidos de la presente invención pueden aislarse por explotación de sus propiedades físicas o bioquímicas. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de adsorción de ión metálico inmovilizado (IMAC) para purificar proteínas ricas en histidina, que incluyen aquellas que comprenden marcas de polihistidina. Brevemente, un gel se carga primero con iones divalentes metálicos para formar un quelato (Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3:1-7, 1985). Las proteínas ricas en histidina se adsorberán a esta matriz con afinidades diferentes, dependiendo del ión metálico usado, y se eluirán por elución competitiva, reduciendo el pH, o uso de agentes quelantes fuertes. Otros métodos de purificación incluyen purificación de proteínas glucosiladas por cromatografía de afinidad por lectina y cromatografía de intercambio iónico (*Methods in Enzymol.*, Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp. 529-39) y uso del receptor Zcytor17 soluble. Dentro de realizaciones adicionales de la invención puede construirse una fusión del polipéptido de interés y una marca de afinidad (por ejemplo, proteína de unión a maltosa, un dominio de inmunoglobulina) para facilitar la purificación.

Además, usando los métodos descritos en la materia, las fusiones de polipéptido, o proteínas mutantes de IL-31 y de IL-31Cys híbridas, se construyen usando regiones o dominios de los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys inventivos en combinación con aquellas de otras proteínas de la familia de las citocinas humanas (por ejemplo, interleucinas o GM-CSF) o proteínas heterólogas (Sambrook et al., *ibidem*, Altschul et al., *ibidem*, Picard, *Cur. Opin. Biology*, 5:511-5, 1994, y referencias en su interior). Estos métodos permiten la determinación de la importancia biológica de grandes dominios o regiones en un polipéptido de interés. Tales híbridos pueden alterar la reacción cinética, unión, constreñir o expandir la especificidad del sustrato, o alterar la localización del tejido y celular de un polipéptido, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

Las proteínas de fusión pueden prepararse por métodos conocidos para aquellos expertos en la materia preparando cada componente de la proteína de fusión y conjugándolos químicamente. Alternativamente, puede generarse un polinucleótido que codifica ambos componentes de la proteína de fusión en el marco de lectura apropiado usando técnicas conocidas y expresarse por los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, parte o toda de una hélice que confiere una función biológica puede intercambiarse entre mutantes de IL-31 y de IL-31Cys de la presente invención con las hélices funcionalmente equivalentes de otro miembro de la familia, tal como IL-15, IL-2, IL-4 o GM-CSF. Tales componentes incluyen, pero no se limitan a, la secuencia señal secretora; hélices A, B, C, D; bucles A/B, B/C, C/D; de citocinas de cuatro haces helicoidales. Cabría esperar que tales proteínas de fusión tuvieran un perfil funcional biológico que fuera el mismo o similar a los polipéptidos de la presente invención u otras proteínas de la familia de las citocinas de cuatro haces helicoidales conocidas, dependiendo de la fusión construida. Además, tales proteínas de fusión pueden presentar otras propiedades como se desvela en el presente documento.

Pueden usarse técnicas de biología molecular y de clonación convencionales para intercambiar los dominios equivalentes entre el polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys y aquellos polipéptidos a los que están fusionados. Generalmente, un segmento de ADN que codifica un dominio de interés, por ejemplo, las hélices de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys A a D, u otro dominio descrito en el presente documento, está operativamente ligado en marco con al menos otro segmento de ADN que codifica un polipéptido adicional (por ejemplo, un dominio o región de otra citocina, tal como IL-2, o similares), e insertarse en un vector de expresión apropiado, como se describe en el presente documento. Generalmente, las construcciones de ADN se hacen de forma que varios segmentos de ADN que codifican las regiones correspondientes de un polipéptido estén operativamente ligadas en marco para hacer una única construcción que codifica la proteína de fusión entera, o una porción funcional de la misma. Por ejemplo, una construcción de ADN codificaría del extremo N al extremo C una proteína de fusión que comprende un polipéptido señal, seguido de una proteína de fusión de citocina de cuatro haces helicoidales madura que contiene la hélice A, seguido de la hélice B, seguido de la hélice C, seguido de la hélice D. Tales proteínas de fusión pueden expresarse, aislarse y ensayarse para actividad como se describe en el presente documento.

También pueden prepararse polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o fragmentos de los mismos mediante síntesis química. Los polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden ser monómeros o multímeros;

glucosilados o no glucosilados; pegilados o no pegilados; y pueden o pueden no incluir un resto de aminoácido de metionina inicial. Por ejemplo, los polipéptidos pueden prepararse por síntesis de péptidos en fase sólida, por ejemplo, como se describe por Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149, 1963.

5 La actividad de moléculas de la presente invención puede medirse usando varios ensayos que miden la proliferación de y/o unión a células que expresan el receptor Zcytor17. Son de particular interés los cambios en las células dependientes de IL-31. Líneas celulares adecuadas para ser manipuladas para ser dependientes de IL-31 incluyen la línea celular BaF3 dependiente de IL-3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), FDC-P1 (Hapel et al., Blood 64: 786-790, 1984) y MO7e (Kiss et al., Leukemia 7: 235-240, 1993). Pueden establecerse líneas celulares dependientes del factor de crecimiento según métodos publicados (por ejemplo, Greenberger et al., Leukemia Res. 8: 363-375, 1984; Dexter et al., en Baum et al. Eds., Experimental Hematology Today, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980).

15 Como ligando, la actividad de polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys puede medirse por un microfisiómetro biosensor basado en silicio que mide la tasa de acidificación extracelular o secreción de protones asociada a la unión del receptor y posteriores respuestas celulares fisiológicas. Un dispositivo a modo de ejemplo es el microfisiómetro Cytosensor™ fabricado por Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Varias respuestas celulares, tales como proliferación celular, transporte de iones, producción de energía, respuesta inflamatoria, activación reguladora y de receptor, y similares, pueden medirse por este método. Véanse, por ejemplo, McConnell, H.M. et al., Science 257:1906-1912, 1992; Pitchford, S. et al., Meth. Enzymol. 228:84-108, 1997; Arimilli, S. et al., J. Immunol. Meth. 212:49-59, 1998; Van Liefde, I. et al., Eur. J. Pharmacol. 346:87-95, 1998.

25 Además, pueden usarse mutantes de IL-31 y de IL-31Cys para identificar células, tejidos o líneas celulares que responden a una vía estimulada por mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. El microfisiómetro, descrito anteriormente, puede usarse para identificar rápidamente células sensibles a ligando, tales como células sensibles a mutantes de IL-31 y de IL-31Cys de la presente invención. Las células pueden cultivarse en presencia o ausencia de polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. Aquellas células que provocan un cambio medible en la acidificación extracelular en presencia de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys son sensibles a mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. Tales células o líneas celulares pueden usarse para identificar antagonistas y agonistas de polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys como se ha descrito anteriormente.

35 Los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys también pueden usarse para identificar inhibidores (antagonistas) de su actividad. Se añaden compuestos de prueba a los ensayos desvelados en el presente documento para identificar compuestos que inhiben la actividad de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. Además de aquellos ensayos desvelados en el presente documento, pueden probarse muestras para la inhibición de la actividad de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys dentro de varios ensayos diseñados para medir la unión del receptor, la estimulación/inhibición de mutantes de respuestas celulares dependientes de IL-31 y IL-31Cys o la proliferación de células que expresan el receptor Zcytor17.

40 Un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys puede expresarse como una fusión con una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, normalmente un fragmento Fc, que contiene dos dominios de la región constante y carece de la región variable. Métodos para preparar tales fusiones se desvelan en las patentes de EE.UU. N.º 5.155.027 y 5.567.584. Tales fusiones normalmente son secretadas como moléculas multiméricas en las que las porciones Fc están unidas por enlace disulfuro entre sí y dos polipéptidos no Ig están desplegados en estrecha proximidad entre sí. Las fusiones de este tipo pueden usarse, por ejemplo, para la dimerización, aumentando la estabilidad y semivida *in vivo*, para purificar por afinidad ligando, como herramienta de ensayo *in vitro* o antagonista. Para su uso en ensayos, las quimeras están unidas a un soporte mediante la región Fc y se usan como un formato de ELISA.

50 Puede emplearse ventajosamente un sistema de ensayo que usa un receptor de unión a ligando (o un anticuerpo, un miembro de un par complemento/anti-complemento) o un fragmento de unión del mismo, y un instrumento de biosensor comercialmente disponible (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Tal receptor, anticuerpo, miembro de un par complemento/anti-complemento o fragmento se inmoviliza sobre la superficie de un chip receptor. El uso de este instrumento se desvela por Karlsson, J. Immunol. Methods 145:229-40, 1991 y Cunningham y Wells, J. Mol. Biol. 234:554-63, 1993. Un receptor, anticuerpo, miembro o fragmento se une covalentemente, usando química de amina o de sulfhidrilo, a fibras de dextrano que están unidas a película de oro dentro de la celda de flujo. Una muestra de prueba se pasa a través de la célula. Si un ligando, epitope, o miembro opuesto del par complemento/anti-complemento está presente en la muestra, se unirá al receptor inmovilizado, anticuerpo o miembro, respectivamente, causando un cambio en el índice de refracción del medio, que se detecta como un cambio en la resonancia de plasmones superficiales de la película de oro. Este sistema permite la determinación de las constantes de asociación y de disociación, a partir de las cuales puede calcularse la afinidad de unión, y la evaluación de la estequiometría de unión. Alternativamente, puede analizarse la unión del ligando/receptor usando tecnología SELDI(TM) (CIPHERGEN, Inc., Palo Alto, CA).

65 También puede usarse polipéptidos del receptor de unión al ligando dentro de otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica. Tales sistemas incluyen análisis de Scatchard para la determinación de la afinidad de unión (véase

Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-72, 1949) y ensayos calorimétricos (Cunningham et al., Science 253:545-48, 1991; Cunningham et al., Science 245:821-25, 1991).

Los polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys también pueden usarse para preparar anticuerpos que se unen a epítopes, péptidos o polipéptidos de IL-31. El polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o un fragmento del mismo sirve de antígeno (inmunogén) para inocular a un animal y provocar una respuesta inmunitaria. Tales anticuerpos pueden usarse para bloquear la acción biológica de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pro-inflamatorios y son útiles como terapéuticos antiinflamatorios en varias enfermedades como se describe en el presente documento. Un experto en la materia reconocería que los polipéptidos antigénicos que llevan epítope contienen una secuencia de al menos 6, preferentemente al menos 9, y más preferentemente al menos 15 a aproximadamente 30 restos de aminoácidos contiguos de un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys (por ejemplo, SEQ ID NO: 2). Están incluidos los polipéptidos que comprenden una porción mayor de un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, es decir, de 30 a 100 restos hasta la longitud entera de la secuencia de aminoácidos. Los antígenos o epítopes inmunogénicos también pueden incluir marcas unidas, adyuvantes, vehículos y excipientes, como se describe en el presente documento. Antígenos adecuados incluyen el polipéptido de IL-31 codificado por SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 24 al número de aminoácido 164, o un fragmento de 9 a 141 aminoácidos contiguo de los mismos. Otros antígenos adecuados incluyen IL-31 de longitud completa y madura, hélices A-D, y hélices A, B, C y D individuales o múltiples, de la estructura de cuatro haces helicoidales de IL-31, como se describe en el presente documento. Péptidos preferidos para usar como antígenos son péptidos hidrófilos tales como aquellos predichos por un experto en la materia a partir de una representación de hidrofobia, como se describe en el presente documento, por ejemplo, los restos de aminoácidos 114-119, 101-105, 126-131, 113-118 y 158-162 de SEQ ID NO: 2; y los restos de aminoácidos 34-39, 46-51, 131-136, 158-163 y 157-162 de SEQ ID NO: 11. Además, epítopes antigénicos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys como se predice por una representación de Jameson-Wolf, por ejemplo, usando el programa DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI) sirven de antígenos preferidos, y se determinan fácilmente por un experto en la materia.

Anticuerpos de una respuesta inmunitaria generados por inoculación de un animal con estos antígenos pueden aislarse y purificarse como se describe en el presente documento. Métodos de preparación y aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales son muy conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Current Protocols in Immunology, Cooligan, et al. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook et al., 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 sería evidente para un experto habitual en la materia, los anticuerpos policlonales pueden generarse a partir de la inoculación de varios animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas con un polipéptido de IL-31 o un fragmento del mismo. La inmunogenicidad de un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys puede aumentarse mediante el uso de un adyuvante, tal como alumbre (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para la inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, o una porción de los mismos con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El inmunogén de polipéptido puede ser una molécula de longitud completa o una porción de la misma. Si la porción de polipéptido es "similar a hepteno", tal porción puede unirse o asociarse ventajosamente a un vehículo macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o toxoide tetánico) para la inmunización.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales, y fragmentos de unión al antígeno, tales como los fragmentos proteolíticos F(ab')₂ y Fab. También están incluidos anticuerpos intactos genéticamente manipulados o fragmentos, tales como anticuerpos quiméricos, fragmentos F_v, anticuerpos monocatenarios y similares, además de péptidos y polipéptidos de unión al antígeno sintéticos. Pueden humanizarse anticuerpos no humanos injertando CDR no humanas sobre las regiones estructurales y constantes humanas, o incorporando los dominios variables no humanos enteros (opcionalmente "ocultándolos" con una superficie tipo humana por sustitución de restos expuestos, en los que el resultado es un anticuerpo "inactivado"). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden retener restos no humanos dentro de los dominios de la región estructural de la región variable humana para potenciar características de unión apropiadas. Mediante la humanización de anticuerpos puede aumentarse la semivida biológica, y se reducen las posibilidades de reacciones inmunitarias adversas tras la administración a seres humanos. Además, pueden producirse anticuerpos humanos en animales no humanos transgénicos que se han manipulado para contener genes de inmunoglobulina humana como se desvela en la publicación WIPO N.º WO 98/24893. Se prefiere que los genes de inmunoglobulina endógenos en estos animales se inactiven o eliminen, tal como por recombinación homóloga.

Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si: 1) presentan un nivel umbral de actividad de unión, y 2) no reaccionan significativamente de forma cruzada con moléculas de polipéptido relacionadas. Un nivel umbral de unión se determina si anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys en el presente documento se unen a un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, péptido o epítope con una afinidad al menos 10 veces superior a la afinidad de unión por el polipéptido de control (no IL-31). Se prefiere que los anticuerpos presenten una afinidad de unión (K_a) de 10⁶ M⁻¹ o mayor, preferentemente 10⁷ M⁻¹ o mayor, más preferentemente 10⁸ M⁻¹ o mayor, y lo más

preferentemente 10⁹ M-1 o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarse fácilmente por un experto habitual en la materia, por ejemplo, por análisis de Scatchard (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

5 Si los anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys reaccionan o no significativamente de forma cruzada con moléculas de polipéptido relacionadas se muestra, por ejemplo, por el anticuerpo que detecta polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, pero no polipéptidos relacionados conocidos usando un análisis de transferencia Western estándar (Ausubel et al., *ibídem*). Ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos son los desvelados en el estado de la técnica, tales como ortólogos conocidos, y parálogos, y miembros conocidos similares de una familia de proteínas. También puede hacerse cribado usando IL-31 no humana, y polipéptidos de mutantes de IL-31. Además, los anticuerpos pueden “cribarse contra” polipéptidos relacionados conocidos para aislar una población que se une específicamente a los polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. Por ejemplo, los anticuerpos producidos contra mutantes de IL-31 y de IL-31Cys se adsorben a polipéptidos relacionados adheridos a matriz insoluble; los anticuerpos específicos para mutantes de IL-31 y de IL-31Cys circularán a través de la matriz bajo las condiciones de tampón apropiadas. El cribado permite el aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales que no reaccionan de forma cruzada con polipéptidos conocidos estrechamente relacionados (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, et al. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995). El cribado y el aislamiento de anticuerpos específicos es muy conocido en la técnica. Véase Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff et al., Adv. In Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin et al., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984. Los anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys que se unen específicamente pueden detectarse por varios métodos en la materia, y se desvelan más adelante.

25 Puede utilizarse varios ensayos conocidos para aquellos expertos en la materia para detectar anticuerpos que se unen a proteínas o polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. Ensayos a modo de ejemplo se describen en detalle en Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Ejemplos representativos de tales ensayos incluyen: inmunolectroforesis concurrente, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, enzimoanálisis de adsorción (ELISA), ensayo de transferencia puntual o de transferencia Western, ensayo de inhibición o de competición, y ensayo de sándwich. Además, los anticuerpos pueden cribarse para unirse a proteína o polipéptido de IL-31 no mutante frente a mutante.

Los anticuerpos para mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden usarse para marcar células que expresan IL-31; para aislar mutantes de IL-31 y de IL-31Cys por purificación por afinidad; para ensayos de diagnóstico para determinar niveles circulantes de polipéptidos de IL-31; para detectar o cuantificar IL-31 soluble como marcador de patología o enfermedad subyacente; en métodos analíticos empleando FACS; para cribar bibliotecas de expresión; para generar anticuerpos anti-idiotípicos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear la actividad de IL-31 *in vitro* y *in vivo*. Marcas o etiquetas directas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; marcas o etiquetas directas pueden incluir el uso de biotina-avidina u otros pares complemento/anti-complemento como productos intermedios. Los anticuerpos en el presente documento también pueden conjugarse directamente o indirectamente a fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y usarse estos conjugados para diagnóstico *in vivo* o aplicaciones terapéuticas. Además, los anticuerpos para mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o fragmentos de los mismos pueden usarse *in vitro* para detectar mutantes desnaturalizados de IL-31 y IL-31Cys o fragmentos de los mismos en ensayos, por ejemplo, transferencias Western u otros ensayos conocidos en la técnica.

Moléculas detectables adecuadas pueden unirse directamente o indirectamente al polipéptido o anticuerpo, e incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Moléculas citotóxicas adecuadas pueden unirse directamente o indirectamente al polipéptido o anticuerpo, e incluyen toxinas bacterianas o de planta (por ejemplo, difteria, toxina, saporina, exotoxina de Pseudomonas, ricina, abrina y similares), además de radionúclidos terapéuticos, tales como yodo-131, renio-188 o itrio-90 (tanto directamente unidos al polipéptido o anticuerpo, como indirectamente unidos mediante un resto quelante, por ejemplo). Los polipéptidos o anticuerpos también pueden conjugarse con fármacos citotóxicos, tales como adriamicina. Para la unión indirecta de una molécula detectable o citotóxica, la molécula detectable o citotóxica puede conjugarse con un miembro de un par complementario/anti-complementario, en el que el otro miembro está unido al polipéptido o porción de anticuerpo. Para estos fines, la biotina/estreptavidina es un par complementario/anti-complementario a modo de ejemplo.

Los polipéptidos de unión también pueden actuar de “antagonistas” de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys para bloquear la unión de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys y la transducción de señales *in vitro* y *in vivo*. Estos polipéptidos de unión a anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys serían útiles para inhibir la actividad de IL-31 o unión a proteína.

Las proteínas de fusión de polipéptido-toxina o proteínas de fusión de anticuerpo-toxina pueden usarse para la inhibición o ablación de células o tejido dirigida (por ejemplo, para tratar células cancerosas o tejidos). Alternativamente, si el polipéptido tiene múltiples dominios funcionales (es decir, un dominio de activación o un

dominio de unión a receptor, más un dominio de direccionamiento), una proteína de fusión que incluye solo el dominio de direccionamiento 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 casos en los que la proteína de fusión de solo dominio incluye una molécula complementaria, la molécula anti-complementaria puede conjugarse con una molécula detectable o citotóxica. Tales proteínas de fusión de dominio-molécula complementaria representan así un excipiente de direccionamiento genérico o vehículo para la administración específica de célula/tejido de conjugados genéricos detectables anti-complementaria/molécula citotóxica.

En otra realización pueden usarse proteínas de fusión de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys-citocinas o proteínas de fusión de anticuerpo-citocina para la destrucción *in vivo* de tejidos diana (por ejemplo, leucemia, linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cánceres de piel, sangre y médula ósea, u otros cánceres en los que se expresan los receptores de IL-31) (véase, generalmente, Hornick et al., Blood 89:4437-47, 1997). Las proteínas de fusión descritas permiten el direccionamiento de una citocina a un sitio de acción deseado, proporcionando así una elevada concentración local de citocina. Polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o anticuerpos anti-IL-31 adecuados se dirigen a una célula o tejido no deseable (es decir, un tumor o una leucemia), y la citocina fusionada medió en la lisis de células diana mejorada por células efectoras. Citocinas adecuadas para este fin incluyen interleucina 2 y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), por ejemplo.

El polipéptido bioactivo o conjugados de anticuerpo descritos en el presente documento pueden administrarse por vía intravenosa, por vía intrarterial o por vía intraductal, o pueden introducirse localmente en el sitio de acción previsto.

La inflamación es una respuesta protectora por un organismo para esquivar un agente invasor. La inflamación es un evento en cascada que implica muchos mediadores celulares y humorales. Por una parte, la supresión de respuestas inflamatorias puede dejar a un hospedador inmunodeprimido; sin embargo, si se deja sin comprobar, la inflamación puede conducir a complicaciones graves que incluyen enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino y similares), choque séptico e insuficiencia multiorgánica. Y, lo que es más importante, estos diversos estados de enfermedad comparten mediadores inflamatorios comunes. Las enfermedades colectivas que se caracterizan por inflamación tienen un gran impacto sobre la morbilidad y mortalidad humanas. Por tanto, es evidente que los anticuerpos antiinflamatorios y los polipéptidos de unión, tales como anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys y los polipéptidos de unión descritos en el presente documento, podrían tener posibilidades terapéuticas cruciales en un gran número de enfermedades humanas y animales, desde asma y alergia hasta autoinmunidad y choque séptico. Como tal, el uso de anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys antiinflamatorios y polipéptidos de unión descritos en el presente documento puede usarse terapéuticamente como antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento, particularmente en enfermedades tales como artritis, endotoxemia, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, enfermedad relacionada y similares.

1. Artritis

La artritis, que incluye osteoartritis, artritis reumatoide, articulaciones artríticas como resultado de lesión, y similares, son afecciones inflamatorias comunes que se beneficiarían del uso terapéutico de anticuerpos antiinflamatorios y polipéptidos de unión, tales como anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys y polipéptidos de unión de la presente invención. Por ejemplo, la artritis reumatoide (RA) es una enfermedad sistémica que afecta a todo el cuerpo y es una de las formas más comunes de artritis. Se caracteriza por la inflamación de la membrana que reviste la articulación, produciendo dolor, rigidez, calor, rojez e hinchazón. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir hueso y cartílago. Como resultado de la artritis reumatoide, el revestimiento de la articulación inflamado, el sinovio, pueden invadir y dañar el hueso y cartílago, conduciendo al deterioro de la articulación y a dolor grave, entre otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su forma y alineamiento, produciendo dolor y pérdida de movimiento.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad mediada por inmunidad caracterizada particularmente por inflamación y posterior daño del tejido, conduciendo a incapacidad grave y elevada mortalidad. Varias citocinas se producen localmente en las articulaciones reumatoides. Numerosos estudios han demostrado que IL-1 y TNF-alfa, dos citocinas pro-inflamatorias prototípicas, desempeñan una función importante en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la destrucción progresiva de articulaciones. De hecho, la administración de inhibidores de TNF-alfa y IL-1 en pacientes con RA ha conducido a una espectacular mejora de los signos clínicos y biológicos de inflamación y a una reducción de los signos radiológicos de erosión ósea y destrucción de cartílago. Sin embargo, a pesar de estos resultados favorables, un porcentaje significativo de pacientes no responden a estos agentes, sugiriendo que otros mediadores también participan en la patofisiología de la artritis (Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2):135-149, 2002). Uno de aquellos mediadores podría ser los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, y como tales, una molécula que se une o inhibe mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, tales como anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o componentes de unión, podría servir de terapéutico valioso para reducir la inflamación en artritis reumatoide, y otras enfermedades artríticas.

Hay varios modelos de animales para 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 parece mucho a la artritis reumatoide humana. Como la CIA comparte características inmunológicas y patológicas similares con la RA, esto hace que sea un modelo ideal para cribar posibles compuestos antiinflamatorios humanos. El modelo de CIA es un modelo muy conocido en ratones que depende de tanto una respuesta inmunitaria como de una respuesta inflamatoria, con el fin de que se produzca. La respuesta inmunitaria comprende la interacción de linfocitos B y linfocitos T CD4+ en respuesta a colágeno, que se administra como antígeno, y conduce a la producción de anticuerpos anti-colágeno. La fase inflamatoria es el resultado de respuestas del tejido de mediadores de inflamación, como consecuencia de que algunos de estos anticuerpos reaccionen de forma cruzada con el colágeno nativo del ratón y activen la cascada del complemento. Una ventaja en usar el modelo de CIA es que los mecanismos básicos de la patogénesis son conocidos. Se han identificado epítopes de linfocitos T y linfocitos B relevantes en el colágeno de tipo II, y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (por ejemplo, hipersensibilidad de tipo retardada y anticuerpo anti-colágeno) e inflamatorios (por ejemplo, citocinas, quimiocinas y enzimas de degradación de la matriz) relacionados con la artritis mediada por inmunidad, y así pueden usarse para evaluar la eficacia de compuestos de prueba en el modelo de CIA (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407-20, 1999; Williams et al., *Immunol.* 89:9784-788, 1992; Myers et al., *Life Sci.* 61:1861-78, 1997; y Wang et al., *Immunol.* 92:8955-959, 1995).

La administración de polipéptidos que comprenden Zcytor17 soluble (incluyendo receptores heterodiméricos y multiméricos descritos en el presente documento), tales como Zcytor17-Fc4 u otro Zcytor17 soluble y proteínas de fusión a estos ratones del modelo de CIA, se usó para evaluar el uso de Zcytor17 para mejorar los síntomas y alterar la evolución de la enfermedad. Como molécula que modula la respuesta inmunitaria e inflamatoria, los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden inducir la producción de SAA, que participa en la patogénesis de la artritis reumatoide, los antagonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden reducir la actividad de SAA *in vitro* y *in vivo*, la administración sistémica o local de antagonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, tales como anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o componentes de unión, polipéptidos que comprenden Zcytor17 (incluyendo receptores heterodiméricos y multiméricos descritos en el presente documento), tales como Zcytor17-Fc4 u otro Zcytor17 soluble y proteínas de fusión, pueden posiblemente suprimir la respuesta inflamatoria en RA. Otros posibles terapéuticos incluyen polipéptidos Zcytor17, polipéptidos de receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, o componentes de unión de la presente invención, y similares.

2. Endotoxemia

La endotoxemia es una afección grave comúnmente resultante de agentes infecciosos tales como bacterias y otros agentes de enfermedad infecciosa, septicemia, síndrome de choque tóxico, o en pacientes inmunodeprimidos sometidos a infecciones oportunistas, y similares. Los anticuerpos y polipéptidos de unión antiinflamatorios terapéuticamente útiles, tales como anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys y polipéptidos de unión de la presente invención, podrían ayudar en la prevención y el tratamiento de endotoxemia en seres humanos y animales. Otros posibles terapéuticos incluyen polipéptidos Zcytor17, polipéptidos de receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, o componentes de unión de la presente invención, y similares, podrían servir de terapéutico valioso para reducir la inflamación y efectos patológicos en la endotoxemia.

La endotoxemia inducida por lipopolisacárido (LPS) involucra a muchos de los mediadores pro-inflamatorios que producen efectos patológicos en las enfermedades infecciosas y la endotoxemia inducida por LPS en roedores es un modelo usado ampliamente 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 importante en la patogénesis del choque séptico (Glausner et al., *Lancet* 338:732, 1991). Un estado similar al choque puede de hecho inducirse experimentalmente por una única inyección de LPS en animales. Las moléculas producidas por células que responden al LPS pueden dirigirse a patógenos directamente o indirectamente. Aunque estas respuestas biológicas protegen al hospedador contra patógenos invasores, también producen daño. Así, la estimulación masiva de inmunidad innata, que se produce como resultado de infección grave por bacterias Gram-negativas, conduce a un exceso de producción de citocinas y otras moléculas, y al desarrollo de un síndrome letal, síndrome de choque séptico, que se caracteriza por fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada e insuficiencia multiorgánica (Dumitru et al. *Cell* 103:1071-1083, 2000).

Estos efectos tóxicos de LPS están principalmente relacionados con la activación de macrófagos que conduce a la liberación de múltiples mediadores inflamatorios. Entre estos mediadores, el TNF parece desempeñar una función crucial, como se indica por la prevención de toxicidad de LPS por la administración de anticuerpos anti-TNF neutralizantes (Beutler et al., *Science* 229:869, 1985). Está bien establecido que 1 ug de inyección de LPS de *E. coli* en un ratón C57B1/6 producirá un aumento significativo en IL-6, TNF-alfa, IL-1 y proteínas de la fase aguda circulantes (por ejemplo, SAA) aproximadamente 2 horas después de la inyección. La toxicidad de LPS parece estar mediada por estas citocinas, ya que la inmunización pasiva contra estos mediadores puede producir una disminución de la mortalidad (Beutler et al., *Science* 229:869, 1985). Las posibles estrategias de inmunointervención para la prevención y/o el tratamiento de choque séptico incluyen mAb anti-TNF, antagonista de receptores de IL-1,

LIF, IL-10 y G-CSF. Como el LPS induce la producción de factores pro-inflamatorios que posiblemente contribuyen a la patología de la endotoxemia, puede usarse la neutralización de la actividad de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, SAA u otros factores pro-inflamatorios antagonizando el polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys para reducir los síntomas de la endotoxemia, tal como se observa en choque endotóxico. Otros posibles terapéuticos incluyen polipéptidos Zcytor17, polipéptidos de receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, o componentes de unión de la presente invención, y similares.

3. Enfermedad inflamatoria del intestino IBD

En los Estados Unidos aproximadamente 500.000 personas padecen enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) que puede afectar tanto al colon como al recto (colitis ulcerosa), o ambos, intestino delgado y grueso (enfermedad de Crohn). La patogénesis de estas enfermedades no está clara, pero implica inflamación crónica de los tejidos afectados. Los posibles terapéuticos incluyen polipéptidos Zcytor17, polipéptidos de receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, o componentes de unión de la presente invención, y similares, podrían servir de terapéutico valioso para reducir la inflamación y efectos patológicos en IBD y enfermedades relacionadas.

La colitis ulcerosa (UC) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, comúnmente llamado el colon, caracterizada por inflamación y ulceración de la mucosa o revestimiento más interno del colon. Esta inflamación hace que el colon se vacíe frecuentemente, produciendo diarrea. Los síntomas incluyen ablandamiento de las heces y calambres abdominales asociados, fiebre y pérdida de peso. Aunque la causa exacta de la UC es desconocida, la reciente investigación sugiere que las defensas naturales del cuerpo están operando contra las proteínas en el cuerpo que el cuerpo cree que son extrañas (una "reacción autoinmunitaria"). Quizás debido a que se parecen a las proteínas bacterianas en el intestino, estas proteínas pueden tanto instigar como estimular el proceso inflamatorio que empieza destruyendo el revestimiento del colon. A medida que se destruye el revestimiento del color se forman úlceras que liberan moco, pus y sangre. La enfermedad normalmente empieza en el área rectal y con el tiempo puede extenderse a través del intestino grueso. Episodios repetidos de inflamación conducen al engrosamiento de la pared del intestino y recto con tejido cicatricial. Puede producirse muerte del tejido del colon o septicemia con enfermedad grave. Los síntomas de la colitis ulcerosa varían en gravedad y su aparición puede ser gradual o repentina. Los ataques pueden ser provocados por muchos factores, que incluyen infecciones respiratorias o estrés.

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

Hay varios modelos animales que pueden imitar parcialmente la colitis ulcerosa crónica. El modelo más ampliamente usado es el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico/etanol (TNBS), que induce inflamación crónica y ulceración en el colon. Cuando se introduce TNBS en el colon de ratones susceptibles mediante instilación intra-rectal, se induce la respuesta inmunitaria de linfocitos T en la mucosa colónica, conduciendo en este caso a una enorme inflamación de la mucosa caracterizada por la densa infiltración de linfocitos T y macrófagos por toda la pared entera del intestino grueso. Además, este cuadro histopatológico va acompañado por el cuadro clínico de pérdida progresiva de peso (debilitante), diarrea con sangre, prolapso rectal y engrosamiento de la pared del intestino grueso (Neurath et al. Intern. Rev. Immunol. 19:51-62, 2000).

Otro modelo de colitis usa dextrano-sulfato de sodio (DSS), que induce una colitis aguda manifestada por diarrea con sangre, pérdida de peso, acortamiento del colon y ulceración de la mucosa con infiltración de neutrófilos. La colitis inducida por DSS se caracteriza histológicamente por infiltración de células inflamatorias en la lámina propia, con hiperplasia linfoide, daño focal de las criptas y ulceración epitelial. Se cree que estos cambios se desarrollan debido a un efecto tóxico de DSS sobre el epitelio y por fagocitosis de células de la lámina propia y producción de TNF-alfa y IFN-gamma. A pesar de su uso común, siguen sin resolverse varias cuestiones referentes a los mecanismos de DSS sobre la relevancia para la enfermedad humana. El DSS se considera un modelo independiente de linfocitos T debido a que se observa en animales deficientes en linfocitos T tales como ratones SCID.

Puede usarse la administración de anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, o componentes de unión, polipéptidos que comprenden Zcytor17 soluble (incluyendo receptores heterodiméricos y multiméricos), tales como Zcytor17-Fc4 u otro Zcytor17 soluble, y proteínas de fusión para estos modelos de TNBS o DSS, para evaluar el uso de antagonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys para mejorar los síntomas y alterar la evolución de la enfermedad gastrointestinal. Los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden desempeñar una función en la respuesta inflamatoria en colitis, y la neutralización de la actividad de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys administrando antagonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys es un posible enfoque terapéutico para IBD. Otros posibles terapéuticos incluyen polipéptidos Zcytor17, polipéptidos de receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o

anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, o componentes de unión de la presente invención, y similares.

4. Psoriasis

5 La psoriasis es una afección de la piel crónica que afecta a más de siete millones de norteamericanos. La psoriasis se produce cuando células de la piel nuevas crecen anormalmente, produciendo parches inflamados, hinchados y escamosos de piel en los que la piel vieja no se ha mudado suficientemente rápidamente. La psoriasis en placas, la forma más común, se caracteriza por parches inflamados de piel ("lesiones") que tienen en la parte superior
10 escamas blancas plateadas. La psoriasis puede limitarse a algunas placas o implicar áreas de la piel de moderadas a amplias, apareciendo lo más comúnmente sobre el cuero cabelludo, rodillas, codos y el tronco. Aunque es altamente visible, la psoriasis no es una enfermedad contagiosa. La patogénesis de las enfermedades implica inflamación crónica de los tejidos afectados. Los polipéptidos Zcytor17, polipéptidos de receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, o componentes de unión de la presente
15 invención, y similares, podrían servir de terapéutico valioso para reducir la inflamación y efectos patológicos en la psoriasis, otras enfermedades inflamatorias de la piel, alergias de la piel y mucosa, y enfermedades relacionadas.

La psoriasis es un trastorno inflamatorio de la piel mediado por linfocitos T que puede producir una molestia considerable. Es una enfermedad para la que no hay cura y afecta a personas de todas las edades. La psoriasis afecta a aproximadamente el dos por ciento de las poblaciones de Europa y América del Norte. Aunque los
20 individuos con psoriasis leve pueden frecuentemente controlar su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes en el mundo requieren terapia ultravioleta o inmunosupresora sistémica. Desafortunadamente, el inconveniente y los riesgos de la radiación ultravioleta y las toxicidades de muchas terapias limitan su uso a largo plazo. Además, los pacientes normalmente tienen reaparición de la psoriasis, y en algunos casos repunte, poco después de detenerse la terapia inmunosupresora.

25 Se aisló IL-31 de tejido que se sabe que tiene una importante función inmunológica y que contiene células que desempeñan una función en el sistema inmunitario. IL-31 se expresa en glóbulos sanguíneos periféricos activados seleccionados CD3+, y se ha mostrado que la expresión de IL-31 aumenta después de la activación de linfocitos T. Además, los polipéptidos de la presente invención pueden tener un efecto sobre el crecimiento/expansión de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células NK y/o estado diferenciado de monocitos/macrófagos,
30 linfocitos T, linfocitos B, células NK o progenitores de estas células. Los factores que tanto estimulan la proliferación de progenitores hematopoyéticos como activan células maduras son generalmente conocidos, sin embargo, la proliferación y activación también puede requerir factores de crecimiento adicionales. Por ejemplo, se ha mostrado que se requirieron IL-7 y el factor de Steel (ligando c-kit) para la formación de colonias de progenitores de NK. IL-15 + IL-2 en combinación con IL-7 y el factor de Steel fue más eficaz (Mrózek et al., 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 NK (Robertson et. al., Blood 76:2451-2438,1990). Similarmente, mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden actuar solos o en sintonía o sinergia con otras citocinas para potenciar el crecimiento, expansión de la proliferación y modificación de la diferenciación de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B o células
40 NK.

Ensayos que miden la diferenciación incluyen, por ejemplo, medir marcadores de células asociados a la expresión de un tejido específica de etapa, actividad enzimática, actividad funcional o cambios morfológicos (Watt, FASEB, 5:281-284, 1991; Francis, Differentiation 57:63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; todos incorporados en el presente documento por referencia). Alternativamente, el propio polipéptido de IL-31 puede servir de superficie celular adicional o marcador secretado asociado a la expresión específica de etapa de un tejido. Como tal, la medición directa del polipéptido de IL-31, o su pérdida de expresión en un tejido a medida que se diferencia, puede servir de marcador para la diferenciación de tejidos.

50 Los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o anticuerpos para los mismos pueden ser útiles en el tratamiento de tumorigénesis y, por tanto, serían útiles en el tratamiento de cáncer. IL-31 e IL- se expresa en linfocitos T activados, monocitos y macrófagos, y está asociada a una región del cromosoma humano en el que las translocaciones son comunes en leucemias. Además, se muestra que IL-31 actúa mediante un receptor de citocina, Zcytor17, que también se expresa en linfocitos T activados, monocitos y macrófagos. La estimulación en exceso de linfocitos T activados, monocitos y macrófagos por mutantes de IL-31 y de IL-31Cys podría producir un estado de enfermedad humano tal como, por ejemplo, un cáncer de células inmunitario u otros cánceres. Como tal, identificando la expresión de IL-31, los polipéptidos (por ejemplo, por anticuerpos anti-IL-31, receptores solubles Zcytor17 (por ejemplo, receptor Zcytor17, heterodímeros, multímeros, u otros componentes de unión a IL-31) pueden servir de diagnóstico, y pueden servir de antagonistas de la actividad proliferativa de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. El ligando podría administrarse en combinación con otros agentes ya en uso que incluyen tanto agentes quimioterapéuticos convencionales, además de 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 mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden ser aditivos.

65 Se cree que las células NK desempeñan una función importante en la eliminación de células tumorales metastásicas

y pacientes con tanto metástasis como tumores sólidos tienen niveles reducidos de actividad de células NK (Whiteside et. al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 230:221-244, 1998). Sería útil un agente que estimulara células NK en la eliminación de tumores.

5 La presente memoria descriptiva describe reducir la proliferación de monocitos/macrófagos neoplásicos que comprende administrar a un mamífero con una neoplasia de monocitos/macrófagos una cantidad de una composición de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys suficiente para reducir la proliferación de los monocitos/macrófagos neoplásicos. En otras realizaciones, la composición puede comprender al menos otra citocina. Puede seleccionarse una segunda citocina del grupo que consiste en IL-2, IL-3, IL-12, IL-21, IL-22, IL-15, IL-4, GM-CSF, ligando Flt3 o factor de citoblastos.

15 La presente memoria descriptiva describe inhibir la activación o diferenciación de monocitos/macrófagos. Los monocitos son células incompletamente diferenciadas que migran a diversos tejidos en los que maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos desempeñan una función central en la respuesta inmunitaria presentando antígeno a linfocitos y desempeñan una función de soporte como células accesorias a linfocitos secretando numerosas citocinas. Los macrófagos pueden internalizar moléculas extracelulares y tras la activación tienen una elevada capacidad de destruir microorganismos intracelulares y células tumorales. Los macrófagos activados también participan en estimular la inflamación aguda o local.

20 En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe reducir la proliferación de linfocitos B o T neoplásicos que comprende administrar a un mamífero con una neoplasia de linfocitos B o T una cantidad de una composición de antagonista de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys suficiente para reducir la proliferación de los monocitos/macrófagos neoplásicos. En otras realizaciones, la composición puede comprender al menos otra citocina, en la que la citocina puede seleccionarse del grupo que consiste en IL-2, IL-3, IL-12, IL-21, IL-22, IL-15, IL-4, GM-CSF, ligando Flt3 o factor de citoblasto. Además, el antagonista de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys puede ser una proteína de fusión de ligando/toxina.

25 Puede emplearse una toxina de fusión de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys-saporina contra un conjunto similar de leucemias y linfomas, extendiendo la gama de leucemias que pueden tratarse con mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. Por ejemplo, tales leucemias pueden ser aquellas que expresan en exceso los receptores Zcytor17 (por ejemplo, receptor Zcytor17, heterodímeros (por ejemplo, Zcytor17/OSMRbeta), multímeros (por ejemplo, Zcytor17/OSMRbeta)). La activación mediada por toxina de fusión del receptor Zcytor17, heterodímeros o multímeros del receptor Zcytor17 (por ejemplo, Zcytor19/OSMRbeta) proporciona dos medios independientes para inhibir el crecimiento de las células diana, siendo el primero idéntico a los efectos observados por el ligando solo, y el segundo debido a la administración de la toxina mediante la internalización del receptor. El patrón de expresión linfoide y limitado por monocitos del receptor Zcytor17 sugiere que el conjugado de ligando-saporina puede ser tolerado por pacientes.

30 Cuando el tratamiento para tumores malignos incluye trasplante alógeno de médula ósea o de citoblastos, los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden ser valiosos en potenciar el efecto de injerto frente a tumor. Los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden estimular la generación de células NK líticas de progenitores de la médula ósea y pueden estimular la proliferación de monocitos y macrófagos tras la activación de receptores de antígeno. Por tanto, cuando los pacientes reciben trasplantes alógenos de médula ósea, los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys potenciarán la generación de respuestas antitumores, con o sin la infusión de linfocitos del donante.

35 La distribución en tejido de receptores para una citocina dada ofrece una fuerte indicación de los posibles sitios de acción de esa citocina. Se observó la expresión de Zcytor17 en monocitos y linfocitos B, con un espectacular aumento de la expresión tras la activación para linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+. Además, dos líneas celulares monocíticas, THP-1 (Tsuchiya et al., Int. J. Cancer 26:171-176, 1980) y U937 (Sundstrom et al., Int. J. Cancer 17:565-577, 1976), también fueron positivas para la expresión de Zcytor17.

40 Se informa que la expresión de OSMR es muy ancha (Mosley et al, JBC 271:32635-32643, 1996). Esta distribución de receptores Zcytor17 y OSM soporta una función para los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys en respuestas inmunitarias, especialmente la expansión de linfocitos T tras la activación o una función en el brazo de monocitos/macrófagos del sistema inmunitario.

45 Los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden encontrar utilidad en la supresión del sistema inmunitario, tal como en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, que incluyen artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, etc. La supresión inmunitaria también puede usarse para reducir el rechazo de tejido o trasplantes de órganos e injertos y para tratar leucemias o linfomas específicos de linfocitos T, linfocitos B o monocitos, y otros cánceres, inhibiendo la proliferación del tipo afectado de célula. Además, pueden usarse mutantes de IL-31 y de IL-31Cys para detectar monocitos, macrófagos y linfocitos T activados y ayudar en el diagnóstico de tal enfermedad inmunitaria, particularmente en estados de enfermedad en los que los monocitos son elevados o están activados.

50 Los polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, péptidos, anticuerpos y similares también pueden usarse

dentro de sistemas de diagnóstico para la detección de niveles circulantes de IL-31. Dentro de una realización relacionada, pueden usarse anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente a polipéptidos de IL-31 para detectar polipéptidos de IL-31 circulantes. Niveles elevados o reducidos de polipéptidos de ligando pueden ser indicativos de afecciones patológicas, que incluyen cáncer. Los polipéptidos de IL-31 pueden contribuir a procesos patológicos y pueden ser un marcador indirecto de una enfermedad subyacente.

Por tanto, los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden usarse para detectar o dirigir su(s) receptor(s) a ciertos estados de enfermedad. Por ejemplo, se han asociado niveles elevados de receptor de IL-2 soluble en suero humano a una amplia variedad de afecciones inflamatorias y neoplásicas, tales como infarto de miocardio, asma, miastenia grave, artritis reumatoide, leucemia aguda de linfocitos T, linfomas de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de ovario (Heaney et al., Blood 87:847-857, 1996). Similarmente, el receptor Zcytor17 es elevado en monocitos activados, y por tanto el receptor Zcytor17 y/o sus receptores solubles pueden asociarse a o servir de marcador para afecciones inflamatorias y neoplásicas asociadas al mismo. Por tanto, los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, que incluyen conjugados citotóxicos, pueden usarse para detectar o dirigirse a tales tejidos, y estados de enfermedad.

Las moléculas de la presente invención tienen uso particular en el brazo de monocitos/macrófagos del sistema inmunitario. Se conocen métodos que pueden evaluar tal actividad. Por ejemplo, el interferón gamma (IFN γ) es un potente activador de los fagocitos mononucleares. Por ejemplo, un aumento en la expresión de Zcytor17 tras la activación de células THP-1 (ATCC N.º TIB-202) con interferón gamma podría sugerir que este receptor participa en la activación de monocitos. Los monocitos son células incompletamente diferenciadas que migran a diversos tejidos en los que maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos desempeñan una función central en la respuesta inmunitaria presentando antígeno a linfocitos y desempeñan una función de soporte como células accesorias a linfocitos secretando numerosas citocinas. Los macrófagos pueden internalizar moléculas extracelulares y tras la activación tienen una elevada capacidad de destruir microorganismos intracelulares y células tumorales. Los macrófagos activados también participan en estimular la inflamación aguda o local. Además, se ha mostrado que la función de los monocitos-macrófagos es anormal en varios estados patológicos. Por ejemplo, véase Johnston, RB, New Eng. J. Med. 318:747-752, 1998.

Un experto en la materia reconocería que los agonistas del receptor Zcytor17, tales como mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, son útiles. Por ejemplo, se ha informado de migración deprimida de monocitos en poblaciones con una predisposición a la infección, tal como lactantes recién nacidos, pacientes que reciben terapia de corticosteroides u otra terapia inmunosupresora, y pacientes con diabetes mellitus, quemaduras o SIDA. Los agonistas para Zcytor17, tales como mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, podrían producir un aumento en la capacidad de monocitos a migrar y posiblemente prevenir la infección en estas poblaciones. También hay un profundo defecto de destrucción fagocítica por fagocitos mononucleares de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. Esto produce la formación de abscesos subcutáneos, además de abscesos en el hígado, pulmones, bazo y ganglios linfáticos. Un agonista de receptor Zcytor17, tal como los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, podría corregir o mejorar este defecto fagocítico. Además, se ha informado de citotoxicidad de monocitos defectuosos en pacientes con cáncer y síndrome de Wiskott-Aldrich (eccema, trombocitopenia e infecciones recurrentes). La activación de monocitos por agonistas del receptor Zcytor17, tales como mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, podría ayudar en el tratamiento de estas afecciones. El sistema de monocitos-macrófagos participa prominentemente en varias enfermedades de almacenamiento de lípidos (esfingolipidosis) tales como enfermedad de Gaucher. La resistencia a la infección puede alterarse debido a un defecto en la función de los macrófagos, que podría tratarse por agonistas para el receptor Zcytor17 tales como los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys.

Además, un experto en la materia reconocería que los antagonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys son útiles. Por ejemplo, en las lesiones ateroscleróticas, una de las primeras anomalías es la localización de monocitos/macrófagos en células endoteliales. Estas lesiones podrían prevenirse por el uso de antagonistas para los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. También pueden usarse anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys (por ejemplo, el anticuerpo neutralizante para mutantes de IL-31 y de IL-31Cys), receptores solubles Zcytor17, heterodímeros y multímeros, y componentes de unión de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, como antagonistas para los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. Además, la leucemia monoblástica está asociada a varias anomalías clínicas que reflejan la liberación de los productos biológicos del macrófago, ejemplos incluyen altos niveles de lisozima en el suero y orina y fiebres altas. Además, tales leucemias presentan un aumento anormal de células monocíticas. Estos efectos podrían prevenirse posiblemente por antagonistas para los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, tal como se describe en el presente documento. Además, los anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden conjugarse con moléculas tales como restos tóxicos y citocinas, como se describe en el presente documento para dirigir la destrucción de células monocíticas de leucemia.

Usando métodos conocidos en la técnica, y desvelados en el presente documento, un experto podría evaluar fácilmente la actividad de agonistas y antagonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys en los estados de enfermedad desvelados en el presente documento, inflamación, inmunitarios (por ejemplo, autoinmunitarios), cáncer o infección, además de otros estados de enfermedad que implican a células monocíticas. Además, como IL-31 se expresa en un modo específico de linfocitos T, macrófagos y monocitos, y estas enfermedades implican anomalías en células monocíticas, tales como proliferación, función, localización y activación celular, los polinucleótidos,

polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden usarse como diagnósticos para detectar tales anomalías de células monocíticas, e indicar la presencia de enfermedad. Tales métodos implican tomar una muestra biológica de un paciente, tal como sangre, saliva o biopsia, y compararla con una muestra de control normal. Pueden usarse métodos histológicos, citológicos, de citometría de flujo, bioquímicos y otros métodos para determinar los niveles relativos o la localización de IL-31, o células que expresan IL-31, es decir, monocitos, en la muestra de paciente en comparación con el control normal. Un cambio en el nivel (aumento o disminución) de la expresión de IL-31, o un cambio en el número o localización de monocitos (por ejemplo, aumento o infiltración de células monocíticas en tejidos en los que normalmente no están presentes) en comparación con un control serían indicativo de enfermedad. Tales métodos de diagnóstico también pueden incluir usar marcas radiométricas, fluorescentes y colorimétricas unidas a los polinucleótidos, polipéptidos o anticuerpos de la presente invención. Tales métodos son muy conocidos en la técnica y se desvelan en el presente documento.

Pueden usarse secuencias de aminoácidos que tienen actividad de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys para modular el sistema inmunitario uniendo el receptor Zcytor17, y así, prevenir la unión de IL-31 con el receptor de IL-31 endógeno. También pueden usarse antagonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, tales como anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, para modular el sistema inmunitario inhibiendo la unión de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys con el receptor endógeno de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva describe el uso de proteínas, polipéptidos y péptidos que tienen actividad de IL-31 (tales como polipéptidos de IL-31, análogos de IL-31 (por ejemplo, anticuerpos antiidiotípicos anti-IL-31) y proteínas de fusión de IL-31) a un sujeto que carece de una cantidad adecuada de este polipéptido, o que produce un exceso de receptor(es) que comprende(n) Zcytor17. También pueden usarse antagonistas de Zcytor17 (por ejemplo, anticuerpos anti-Zcytor17) para tratar un sujeto que produce un exceso de receptor(es) que comprende(n) tanto IL-31 como Zcytor17. Sujetos adecuados incluyen mamíferos, tales como seres humanos.

Se ha mostrado que IL-31 se expresa en células mononucleares activadas, y puede participar en regular la inflamación. Como tal, los polipéptidos de la presente invención pueden ensayarse y usarse para su capacidad para modificar la inflamación, o pueden usarse como un marcador para la inflamación. Métodos para determinar calidades pro-inflamatorias y antiinflamatorias de IL-31 se conocen en la técnica y se tratan en el presente documento. Además, pueden participar en regular por incremento la producción de reactantes de fase aguda, tales como amiloide del suero A (SAA), α 1-antiquimotripsina y haptoglobina, y que la expresión del ligando de receptor Zcytor17 puede aumentarse tras la inyección de lipopolisacárido (LPS) *in vivo* que participa en la respuesta inflamatoria (Dumoutier, L. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000). La producción de proteínas de la 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 las proteínas de la fase aguda durante periodos más largos contribuye a inflamación crónica y puede ser perjudicial para la salud humana. Para una revisión véase Uhlar, CM y Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265:501-523, 1999, y Baumann H. y Gaudie, J. Immunology Today 15:74-80, 1994. Además, la proteína de fase aguda SAA participa en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias crónicas, participa en aterosclerosis y artritis reumatoide, y es el precursor para la proteína amiloide A depositada en la amiloidosis (Uhlar, CM y Whitehead, arriba). Así, cuando un ligando tal como los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys que actúan de molécula pro-inflamatoria e inducen la producción de SAA, los antagonistas serían útiles en el tratamiento de enfermedad inflamatoria y otras enfermedades asociadas a proteínas de respuesta de fase aguda inducidas por el ligando. Tales antagonistas se describen en el presente documento. Por ejemplo, un método de reducción de la inflamación comprende administrar a un mamífero con inflamación una cantidad de una composición de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, o anticuerpo anti-IL-31 (por ejemplo, anticuerpo neutralizante) que es suficiente para reducir la inflamación. Además, un método de suprimir 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 mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o anticuerpo anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys como se describe en el presente documento en un vehículo farmacéutico aceptable; (3) determinar un nivel después de 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), en el que una falta de aumento o una disminución en el nivel de proteína amiloide A del suero es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria.

Al igual que IL-31, el análisis de la distribución en tejido del ARNm correspondiente a su ADNc de receptor Zcytor17 mostró que el nivel de ARNm era el más alto en monocitos y células de la próstata, y es elevado en monocitos activados, y células CD4+ activadas, CD8+ activadas y CD3+ activadas. Por tanto, el receptor Zcytor17 también participa en la inducción de respuesta inflamatoria e inmunitaria. Así, la presente memoria descriptiva describe el uso de anticuerpos para mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, y mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, además de heterodímeros del receptor Zcytor17 soluble como antagonistas en enfermedades inflamatorias e inmunitarias o afecciones tales como pancreatitis, diabetes tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, cáncer de colon e intestinal, diverticulosis, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, trasplante de órgano o de médula ósea; inflamación debida a traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad de injerto contra hospedador; y en las que la inhibición de la inflamación, supresión inmunitaria, reducción de la proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (incluyendo células Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), supresión de respuesta inmunitaria a un patógeno o antígeno. Además, la presencia del receptor Zcytor17 y la expresión de IL-31

en células inmunitarias activadas tales como CD3+ activadas, monocitos, células CD4+ y CD19+ mostró que el receptor Zcytor17 puede participar en las reacciones defensivas inmunitarias del cuerpo contra invasores extraños: tales como microorganismos y residuos celulares, y podría desempeñar una función en respuestas inmunitarias durante la inflamación y la formación de cáncer. Como tales, los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys y anticuerpos para IL-31 de la presente invención que son agonista o antagonista para la función del receptor Zcytor17 pueden usarse para modificar la respuesta inmunitaria e inflamación.

Además, los polipéptidos de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys que se unen a polipéptidos del receptor Zcytor17, y anticuerpos para el mismo, son útiles para:

1) Antagonizar o bloquear la señalización mediante receptores que comprenden Zcytor17 en el tratamiento de inflamación aguda, inflamación como resultado de traumatismo, lesión de tejido, cirugía, septicemia o infección, y enfermedades inflamatorias crónicas tales como asma, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), 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 a la inducción de respuesta de fase aguda.

2) Antagonizar o bloquear la señalización mediante los receptores del receptor Zcytor17 en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como IDDM, esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (SLE), miastenia grave, artritis reumatoide y IBD para prevenir o inhibir la señalización en células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos, monocitos, leucocitos) mediante el receptor Zcytor17 (Hughes C et al., J. Immunol 153: 3319-3325, 1994). Alternativamente, también pueden usarse anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales (mAb) para mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, como antagonista para agotar células inmunitarias no deseadas para tratar enfermedad autoinmunitaria. Asma, alergia y otra enfermedad atópica pueden tratarse con un mAb contra, por ejemplo, anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, receptores solubles del receptor Zcytor17 soluble o heterodímeros Zcytor17/CRF2-4, para inhibir la respuesta inmunitaria o para agotar células causales. Bloquear o inhibir la señalización mediante Zcytor17, usando los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, también puede beneficiar a enfermedades del páncreas, riñón, pituitaria y células neuronales. Puede beneficiarse IDDM, NIDDM, pancreatitis y carcinoma pancreático. Zcytor17 puede servir de diana para terapia con mAb de cáncer en el que un mAb antagonizante inhibe el crecimiento del cáncer y se dirige a la destrucción mediada por inmunidad (Holliger P, y Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998). Los mAb para monómeros de receptor Zcytor17 soluble, homodímeros, heterodímeros y multímeros también pueden ser útiles para tratar nefropatías, tales como glomeruloesclerosis, neuropatía membranosa, amiloidosis (que también afecta al riñón, entre otros tejidos), arteriosclerosis renal, glomerulonefritis de diversos orígenes, enfermedades fibroproliferativas del riñón, además de disfunción renal asociada a SLE, IDDM, diabetes tipo II (NIDDM), tumores renales y otras enfermedades.

3) Agonizar o iniciar la señalización mediante receptores Zcytor17 en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como IDDM, MS, SLE, miastenia grave, artritis reumatoide e IBD. Los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden señalar linfocitos u otras células inmunitarias para diferenciar, alterar la proliferación, o cambiar la producción de citocinas o proteínas de la superficie celular que mejoran la autoinmunidad. Específicamente, la modulación de una respuesta de linfocitos T colaboradores a un patrón alternativo de secreción de citocinas puede desviar una respuesta autoinmunitaria para mejorar la enfermedad (Smith JA et al., J. Immunol. 160:4841-4849, 1998). Similarmente, los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden usarse para señalar, agotar y desviar células inmunitarias implicadas en asma, alergia y enfermedad atópica. La señalización mediante el receptor Zcytor17 también puede beneficiar a enfermedades del páncreas, riñón, pituitaria y células neuronales. Pueden beneficiarse IDDM, NIDDM, pancreatitis y carcinoma pancreático. Zcytor17 pueden servir de diana para la terapia con mAb de cáncer pancreático en el que un mAb de señalización inhibe el crecimiento del cáncer y se dirige a la destrucción mediada por inmunidad (Tutt, AL et al., J Immunol. 161: 3175-3185, 1998). Similarmente, las leucemias específicas de linfocitos T, linfomas, discrasia de células plasmáticas (por ejemplo, mieloma múltiple) y carcinoma pueden tratarse con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpo neutralizante) para receptores solubles que comprenden Zcytor17 de la presente invención.

Los anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, polipéptidos monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos del receptor Zcytor17 soluble descritos en el presente documento pueden usarse para neutralizar/bloquear la actividad del ligando del receptor Zcytor17 en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, enfermedad atópica, NIDDM, pancreatitis y disfunción renal, como se ha descrito anteriormente. Puede usarse una forma soluble del receptor Zcytor17 para promover una respuesta de anticuerpos mediada por linfocitos T y/o para promover la producción de IL-4 u otras citocinas por linfocitos u otras células inmunitarias.

Los anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, y receptores que comprenden Zcytor17 soluble, son útiles como antagonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys. Tales efectos antagonistas pueden lograrse por neutralización directa o unión de su ligando natural. Además de los usos antagonistas, los receptores solubles pueden unirse a mutantes de IL-31 y de IL-31Cys y actuar de vehículo o proteínas transportadoras, con el fin de transportar los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys a diferentes tejidos, órganos y células dentro del cuerpo. Como tales, los receptores solubles pueden fusionarse o acoplarse a moléculas, polipéptidos o restos químicos que dirigen el complejo receptor soluble-ligando a un sitio específico, tal como un tejido, célula inmunitaria específica,

monocitos, o tumor. Por ejemplo, en infección aguda o algunos cánceres, el beneficio puede resultar de la inducción de inflamación y proteínas de respuesta de fase aguda local. Así, los receptores solubles descritos en el presente documento o anticuerpos de la presente invención pueden usarse para dirigir específicamente la acción de un ligando de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pro-inflamatorio. Véanse Cosman, D. Cytokine 5: 95-106, 1993; y Fernandez-Botran, R. Exp. Opin. Invest. Drugs 9:497-513, 2000.

Los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden activar el sistema inmunitario que sería importante en reforzar la inmunidad a enfermedades infecciosas, tratar pacientes inmunodeprimidos, tales como pacientes VIH+, pacientes con cáncer, o en mejorar las vacunas. En particular, la estimulación o expansión de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células NK, o sus progenitores, proporcionaría valor terapéutico en el tratamiento de infección viral, y como factor antineoplásico. Similarmente, la estimulación de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys de la respuesta inmunitaria contra agentes patógenos virales y no virales (incluyendo bacterias, protozoos y hongos) proporcionaría valor terapéutico en el tratamiento de tales infecciones inhibiendo el crecimiento de tales agentes de infección. La determinación directa o indirecta de los niveles de un patógeno o antígeno, tal como una célula tumoral, presente en el cuerpo puede lograrse por varios métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento.

La evidencia experimental sugiere una función para IL-31 en la progresión de enfermedades que implican a la piel o epitelio de superficies internas tales como, por ejemplo, intestino grueso, intestino delgado, páncreas, pulmón, próstata, útero, y similares. Primero, como se desvela en el presente documento, los receptores Zcytor17, que incluyen tanto receptor beta de OSM como Zcytor17, se expresan en varios tipos de células localizadas en superficies epiteliales que incluyen líneas celulares derivadas de epitelio de pulmón, fibroblasto de pulmón, próstata, colon, mama, epitelio del hígado, hueso y epitelio de piel, fibroblasto de hueso y similares. Además, como se desvela en el presente documento, ejemplos de cada uno de estos tipos de células también respondieron a la activación de IL-31 de una construcción indicadora de STAT. Además, varias líneas celulares respondieron a la estimulación de IL-31, produciendo niveles elevados de IL-6, IL-8, MCP-1 (un factor quimiotáctico) como se describe en el presente documento. En conjunto, estos datos sugieren una función de los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys en enfermedades que implican el epitelio tales como, por ejemplo, dermatitis atópica; dermatitis; psoriasis; artritis psoriásica; eccema; gingivitis; enfermedad periodontal; enfermedades inflamatorias del intestino (IBD) (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn); trastornos reproductivos tales como, por ejemplo, displasia cervical, cáncer de cuello uterino; otras enfermedades de la piel como cánceres: sarcomas; carcinomas; melanoma, etc. es decir, no solo enfermedades inflamatorias, ya que el sistema inmunitario participa en activar/curar cánceres; enfermedades que implican disfunción de la barrera tales como, por ejemplo, enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD) y síndrome del intestino irritable (IBS); y enfermedades que implican al epitelio de pulmón, tales como asma, enfisema y similares. Además, la liberación de citocinas IL-6, IL-8 y MCP-1 por células expuestas a IL-31 sugiere que IL-31 participa en la inflamación. Por tanto, la regulación de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys puede ser útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias o cancerosas asociadas a los tejidos que expresan el receptor. Estas enfermedades incluyen, por ejemplo, prostatitis, hepatitis, osteoartritis y similares. IL-31 puede regular directa o indirectamente positiva o negativamente estas enfermedades. Por tanto, la administración de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys puede usarse para tratar enfermedades como se describe en el presente documento directamente o con moléculas que inhiben la actividad de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys que incluyen, por ejemplo, tanto anticuerpos monoclonales para los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys como anticuerpos monoclonales para Zcytor17, o anticuerpos monoclonales que reconocen el complejo de Zcytor17 y receptor beta de OSM.

Los datos también sugieren que IL-31 puede participar en la regulación de enfermedades mediadas por linfocitos T TH2. Primero, IL-31 se produce por el subconjunto TH2 de linfocitos T activados. Las células TH2 expresan más IL-31 en comparación con células TH1. Además, se estimularon al menos dos líneas de células epiteliales de pulmón (SK-LU-1, A549) para aumentar el ARNm del receptor alfa-2 de IL-13 en respuesta a la estimulación del ligando Zcytor17 como se describe en el presente documento. Hay una asociación de la cadena del receptor alfa2 de IL-13 y la tumorigenicidad de tumores de mama y pancreáticos humanos. Esto sugiere que los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden desempeñar una función en regular la tumorigenicidad de estos tipos de cánceres, además de otros cánceres. Por tanto, la administración de un antagonista de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o el uso directo de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys 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, métodos de estadificación TNM o AJC) del desarrollo de tumores, en mamíferos, preferentemente seres humanos.

Es muy conocido en la técnica que IL-13 participa en la generación de células TH2 activadas y en las enfermedades mediadas por TH2, tales como asma, dermatitis atópica y similares. Los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o antagonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades que implicaron a linfocitos T TH2. Esto incluiría enfermedades tales como, por ejemplo, dermatitis atópica, asma, además de otras enfermedades que son agravadas por células TH2 activadas. La participación de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys en enfermedades tales como, por ejemplo, dermatitis atópica, también está soportada por el fenotipo de los ratones transgénicos que expresan en exceso mutantes de IL-31 y de IL-31Cys y desarrollan síntomas de dermatitis atópica como se describe en el presente documento.

A pesar de la expresión preferencial de IL-31 por células TH2, todavía hay alguna expresión de IL-31 en células TH1 y en linfocitos T CD8+. Por tanto, los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, o sus antagonistas, pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades que implican la modulación inmunitaria de linfocitos T activados que incluyen, por ejemplo, infección viral, cánceres, rechazo de injerto y similares.

IL-31 también puede participar en el desarrollo de cáncer. Hay expresión de los receptores Zcytor17 y del receptor beta de OSM en osteosarcomas de fibroblastos de hueso humano, melanoma de fibroblastos de piel humana, carcinoma epitelial de colon, adenocarcinoma, adenocarcinoma epitelial de mama, adenosarcoma epitelial de próstata y adenocarcinoma y carcinoma epitelial de pulmón. Por tanto, puede ser útil tratar tumores de origen epitelial con tanto mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, fragmentos de los mismos, como antagonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, adenocarcinoma y melanoma. No obstante, pueden usarse los mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o un antagonista de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys para tratar un cáncer, o reducir uno o más síntomas de un cáncer, de un cáncer que incluye, pero no se limita a, carcinoma de células escamosas o epidermoide, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, adenoma bronquial, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células transitorias, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor mixto maligno de origen de la glándula salival, tumor de Wilms, teratoma inmaduro, teratocarcinoma, y otros tumores que comprenden al menos algunas células de origen epitelial.

Generalmente, la dosificación de polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys administrado (o análogo de Zcytor17 o proteína de fusión) variará dependiendo de factores tales como la edad del paciente, peso, altura, sexo, afección médica general e historia médica previa. Normalmente, se desea proporcionar al receptor una dosificación de polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys que esté en el intervalo de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal de paciente), aunque una dosificación menor o mayor también puede administrarse según lo dicten las circunstancias. Un experto en la materia puede determinar fácilmente tales dosificaciones, y ajustes a las mismas, usando métodos conocidos en la técnica.

La administración de un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys a un sujeto puede ser tópica, inhalada, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleurar, intratecal, por perfusión a través de un catéter regional, o por inyección intralesional directa. Cuando se administran proteínas terapéuticas mediante inyección, la administración puede ser por infusión continua o por bolos individuales o múltiples.

Vías de administración adicionales incluyen oral, membrana mucosa, pulmonar y transcutánea. La administración oral es adecuada para microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas proteínoideas, microesferas de policianoacrilato y sistemas basados en lípidos (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins", en Protein Delivery: Physical System, Sanders and Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). La viabilidad de una administración intranasal se ejemplifica por un modo tal de administración de insulina (véase, por ejemplo, Hinchcliffe y Illum, Adv. Drug Deliv. Rev. 35:199 (1999)). Pueden prepararse partículas secas o líquidas que comprenden mutantes de IL-31 y de IL-31Cys e inhalarse con la ayuda de dispensadores de polvo seco, generadores de aerosol líquido, o nebulizadores (por ejemplo, Pettit y Gombotz, TIBTECH 16:343 (1998); Patton et al., 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 portátil que administra insulina aerosolizada en los pulmones. Los estudios han mostrado que proteínas de hasta 48.000 kDa han sido administradas a través de la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonidos de baja frecuencia, que ilustra la viabilidad de la administración transcutánea (Mitrugotri et al., Science 269:850 (1995)). La administración transdérmica usando electroporación proporciona otro medio para administrar una molécula que tiene actividad de unión de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys (Potts et al., Pharm. Biotechnol. 10:213 (1997)).

Una composición farmacéutica que comprende una proteína, polipéptido o péptido que tiene actividad de unión de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys puede formularse según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por la cual las proteínas terapéuticas se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición se dice que es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. Solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. 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 mutantes de IL-31 y de IL-31Cys y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una combinación de una proteína, polipéptido o péptido que tiene actividad de unión de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys y un vehículo farmacéuticamente aceptable se dice que se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia produce un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente usado para tratar inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia al menos una porción de la respuesta inflamatoria.

Una composición farmacéutica que comprende mutantes de IL-31 y de IL-31Cys (o análogo de mutantes de IL-31 y

de IL-31Cys o proteína de fusión) puede suministrarse en forma líquida, en un aerosol, o en forma sólida. Formas líquidas se ilustran por soluciones inyectables, aerosoles, gotitas, soluciones topológicas y suspensiones orales. Formas sólidas a modo de ejemplo incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra por minibombas osmóticas e implantes (Bremer et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery", en *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer et al., "Protein Delivery with Infusion Pumps", en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey et al., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant", en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)). Otras formas sólidas incluyen cremas, pastas, otras aplicaciones topológicas, y similares.

La presente memoria descriptiva describe polipéptidos químicamente modificados que tienen actividad de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, tales como un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, agonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys y antagonistas de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, por ejemplo, anticuerpos anti-mutantes de IL-31 y de IL-31Cys, que un polipéptido está asociado a un polímero, como se trata anteriormente.

Otras formas de dosificación pueden concebirse por aquellos expertos en la materia, como se muestra, por ejemplo, por Ansel and Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5ª Edición (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Edition (Mack Publishing Company 1995), y por Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

Como ilustración, composiciones farmacéuticas pueden suministrarse como un kit que comprende un recipiente que comprende un polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys o un antagonista de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a polipéptido de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys). Pueden proporcionarse polipéptidos terapéuticos en forma de una solución inyectable para dosis única o múltiples dosis, o como un polvo estéril que se reconstituirá antes de inyección. Alternativamente, un kit tal puede incluir un dispensador de polvo seco, generador de aerosol líquido, o nebulizador para administración de un polipéptido terapéutico. Un kit tal puede comprender además información escrita sobre indicaciones y uso de la composición farmacéutica. Además, tal información puede incluir una declaración de que la composición de mutantes de IL-31 y de IL-31Cys está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida a mutantes de IL-31 y de IL-31Cys.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de vectores de expresión de mamífero para IL-31-CEE

A. Construcción de IL-31-CEE/pZMP21 humana

Se construyó un plásmido de expresión que contenía Zcytor17lig-CEE mediante recombinación homóloga usando un fragmento de ADN de Zcytor17lig-CEE (SEQ ID NO: 31) y el vector de expresión pZMP21. El fragmento se generó por amplificación por PCR usando los cebadores ZC41607 (SEQ ID NO: 32) y ZC41605 (SEQ ID NO: 33).

El fragmento de PCR Zcytor17lig-CEE contiene una región codificante de Zcytor17lig, que se preparó usando un clon previamente generado de Zcytor17lig como molde. El fragmento incluye un solapamiento en 5' con la secuencia del vector pZMP21, el segmento Zcytor17lig, una marca EE y un solapamiento en 3' con el vector pZMP21. Las condiciones de PCR usadas fueron las siguientes: 1 ciclo, 94 °C, 5 minutos; 35 ciclos, 94 °C, 1 minuto, seguido de 55 °C, 2 minutos, seguido de 72 °C, 3 minutos; 1 ciclo, 72 °C, 10 minutos.

Las mezclas de reacción de PCR se ejecutaron sobre un gel de agarosa al 1 % y una banda correspondiente a los tamaños de los insertos se extrajo en gel usando un kit de extracción en gel QIAquick™ (Qiagen, Cat. N.º 28704).

El plásmido pZMP21 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor MPSV, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes y una secuencia de péptidos señal otPA; un elemento de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) de virus de la poliomielitis y el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C del dominio transmembrana; un origen de replicación de *E. coli*; una unidad de expresión de marcador de selección de mamífero que comprende un promotor SV40, potenciador y origen de replicación, un gen DHFR y el terminador SV40; y secuencias de URA3 y CEN-ARS requeridas para la selección y replicación en *S. cerevisiae*. pZMP21 se describe en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20030232414 A1, y se deposita en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, designada como ATCC N.º PTA-5266.

El plásmido pZMP21 se cortó con BglIII antes de la recombinación en levadura con el fragmento de PCR. Cien microlitros de células de levadura competente (*S. cerevisiae*) se combinaron independientemente con 10 µl del ADN

de inserto y 100 ng de vector pZMP21 cortado, y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/ADN se electropulsó usando parámetros de la fuente de alimentación (BioRad Laboratories, Hercules, CA) de 0,75 kV (5 kV/cm), ∞ ohmios y 25 μ F. Se añadieron seiscientos μ l de sorbitol 1,2 M a la cubeta, y la levadura se sembró en placa en una alícuota de 100 μ l y 300 μ l sobre dos placas URA-D y se incubó a 30 °C.

5 Después de aproximadamente 72 horas, los transformantes de levadura Ura⁺ de una única placa se resuspendieron en 1 ml de H₂O y se centrifugaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento de células se resuspendió en 0,5 ml de tampón de lisis (2 % de Triton X-100, 1 % de SDS, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Los quinientos microlitros de la mezcla de lisis se añadieron a un tubo de Eppendorf que contenía 250 μ l de perlas de vidrio lavadas con ácido y 300 μ l de fenolcloroformo, se agitaron con vórtex durante 3 minutos y se
10 centrifugaron durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf a velocidad máxima. Se transfirieron trescientos microlitros de la fase acuosa a un tubo nuevo, y el ADN se precipitó con 600 μ l de etanol (EtOH), seguido por centrifugación durante 30 minutos a velocidad máxima. El tubo se decantó y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 70 %. El tubo se decantó y el sedimento de ADN se resuspendió en 30 μ l de TE.

15 La transformación de células hospedadoras de *E. coli* electrocompetentes (DH12S) se hizo usando 5 μ l de la levadura ADN prep y 50 μ l de células. Las células se electropulsaron a 2,0 kV, 25 μ F y 400 ohmios. Tras la electroporación se añadieron 1 ml de SOC (2 % de Bacto™ Tryptone (Difco, Detroit, MI), 0,5 % de extracto de levadura (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) y entonces las células se sembraron en una alícuota de 50 μ l y 200 μ l sobre dos placas LB AMP (caldo LB (Lennox), 1,8 % de Bacto™ Agar (Difco), 100 mg/l de ampicilina).
20

Los insertos de tres clones para la construcción se sometieron a análisis de secuencias y se seleccionó un clon para cada construcción, que contenía la secuencia correcta. Se aisló ADN de plásmido a mayor escala usando un kit comercialmente disponible (kit QIAGEN Plasmid Mega, Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante.
25

B. Construcción de IL-31-CEE/pZMP21 murina

Se construyó un plásmido de expresión que contenía Zcytor17lig-CEE murino del mismo modo, excepto que el fragmento de ADN de Zcytor17lig-CEE murino (SEQ ID NO: 34) se usó con vector de expresión pZMP21. El fragmento se generó por amplificación por PCR usando los cebadores ZC41643 (SEQ ID NO: 35) y ZC41641 (SEQ ID NO: 36). Las condiciones de PCR y clonación fueron las mismas que para la construcción humana.
30

Ejemplo 2

Transfección y expresión de IL-31-CEE humana y murina

Se produjeron proteína Zcytor17lig-CEE humana y murina en células BHK transfectadas con Zcytor17lig-CEE/pZMP21 humana o murina (Ejemplo 1). Se sembraron células BHK 570 (ATCC CRL-10314) en matraces de cultivo de tejido T75 y se dejó que crecieran a aproximadamente del 50 al 70 % de confluencia a 37 °C, 5 % de CO₂, en medios de crecimiento (SL7V4, 3 % de FBS, 1 % de pen/estrep). Las células se transfectaron entonces con Zcytor17Lig-CEE/pZMP21 humana o murina por transfección mediada por liposomas (usando Lipofectamine™; Life Technologies), en medio libre de suero (SF) (SL7V4). El plásmido (16 μ g) se diluyó en tubos de 1,5 ml a un volumen final total de 640 μ l con medio SF. Se mezclaron 35 μ l de la mezcla de lípidos con 605 μ l de medio SF, y la mezcla resultante se dejó incubar aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añadieron cinco
40 mililitros de medio SF a la mezcla de ADN:lípido. Las células se aclararon una vez con 10 ml de PBS, el PBS se decantó y se añadió la mezcla de ADN:lípido. Las células se incubaron a 37 °C durante cinco horas, luego se añadieron 15 ml de medio (SL7V4, 3 % de FBS, 1 % de pen/estrep) a cada placa. Las placas se incubaron a 37 °C durante la noche, y la mezcla de ADN:medio de lípido se substituyó con medio de selección (SL7V4, 3 % de FBS, 1 % de pen/estrep, metotrexato 1 μ M) al día siguiente. Aproximadamente 10 días después de la transfección, las colonias resistentes a metotrexato del matraz de transfección T75 se tripsinaron, y las células se reunieron y se sembraron en un matraz T-162 y se transfirieron a cultivo a gran escala.
45
50

Ejemplo 3

Purificación de IL-31-CEE humana de BHK

Se equilibran quinientos ml de resina dejando que la resina sedimente, decantando el sobrenadante y añadiendo un volumen igual de PBS. La resina se suspende entonces suavemente, se transfiere a una columna Econo de vidrio de BioRad dotada de una llave de paso y de nuevo se deja que sedimente. Esta etapa se repite tres veces. La resina se prepara entonces para la unión de anticuerpo anti-EE lavando del mismo modo que antes con 4 volúmenes de resina de TEA 200 mM a pH 8,2, 1 VC cada vez. La resina preparada se transfiere entonces a una botella rotatoria y se añade el anticuerpo anti-EE. Si la suspensión resultante parece demasiado densa, se añade TEA 200 mM a pH 8,2 hasta una relación 1:1 de resina con respecto a líquido. Se deja que el lote se una durante la noche a 4 °C mientras que se gira lentamente.
60
65

La reticulación de la resina unida puede realizarse tanto a temperatura ambiente como a 4 °C. La suspensión se

- transfiere a una columna Econo de vidrio de tamaño apropiado dotada de una llave de paso. El material sin unir se recoge mediante flujo de gravedad. La resina se lava con 2 VC de TEA 200 mM a pH 8,2, recogiendo en un recipiente apropiado. La resina se transfiere de nuevo a una botella rotatoria, sacando 50 ul si se analiza la eficiencia de acoplamiento mediante gel de SDS-PAGE. Se reticulán 36 mg de DMP con 1 ml de resina disolviendo 18 g de DMP en 100 ml de TEA 200 mM a pH 8,2 y añadiéndolo inmediatamente a la botella rotatoria que contiene la resina. Si la suspensión es densa, se añade TEA 200 mM a pH 8,2 hasta una relación 1:1 de resina con respecto a líquido. Esta botella se mantiene durante al menos 1 hora a temp ambiente o durante la noche a 4 °C.
- La reacción de reticulación se termina transfiriendo la suspensión de nuevo a la columna de vidrio y lavando con 2 VC de etanolamina 20 mM, TEA 200 mM a pH 8,2, y luego con 4 VC de PBS. Conociendo la cantidad de anticuerpo usado, la eficiencia de acoplamiento puede determinarse mediante tres métodos: densitometría de gel de SDS-PAGE usando anticuerpo purificado como patrón, RP-HPLC, o UV-Vis usando un coeficiente de extinción de 1,44.
- La resina de afinidad se almacena bien en PBS con 0,05 % de azida de sodio (corto plazo) o bien en 20 % de etanol (largo plazo). El almacenamiento es a 4 °C.
- Se realiza cromatografía de captura por afinidad del siguiente modo: El medio suministrado se captura sobre la resina de afinidad por anti-EE y se eluye mediante competición usando péptido EE en condiciones fisiológicas. Se emplea un lavado a pH bajo para eluir contaminantes no específicos. La máxima disminución de la presión sobre la columna no debe superar 1 MPa.
- Los parámetros de cromatografía son los siguientes: Se cargan 175 ml de resina de afinidad por anti-EE en una columna de vidrio Waters AP-5x200. El sistema es un Akta Explorer Workstation. El tampón de equilibrio (A) es NaPO₄ 50 mM (70:30 de dibásico:monobásico), NaCl 120 mM a pH 7,2. El tampón de elución (B) es NaPO₄ 50 mM (70:30 de dibásico:monobásico), 0,28 mg/ml de péptido EE, NaCl 120 mM a pH 7,2. Tampón de lavado (C): Glicina 0,1 M a pH 3,0. El tampón de lavado (D) es NaPO₄ 50 mM (70:30 de dibásico:monobásico), NaCl 600 mM a pH 7,2. La temperatura es 4 °C. La dirección de flujo es hacia abajo. Los caudales se cargan a 25 cm/h, elución a 15,3 cm/h, lavado a 61,1 cm/h. Se monitorizan longitudes de onda de 215 nm y 280 nm. El tiempo promedio de UV es 0,1 s. El tamaño de fracción es 25 ml.
- La columna se limpia y se lava antes de cargar el medio lavando la columna con 1 VC de tampón de lavado C, seguido de 1 VC de tampón de lavado D, y luego equilibrar en tampón A. El medio se carga sobre la columna, seguido de lavado de la columna durante 10 VC usando tampón A (tampón de equilibrio).
- La elución es mediante competición usando péptido EE: dos volúmenes de columna (VC) de tampón de elución B, 2 VCV de tampón A, y se limpia con 1 VC de cada tampón C y tampón D. La columna se regenera con 2 VC de tampón A.
- El conjunto de eluato de la columna de afinidad por anti-EE se concentra a un volumen inferior al 3 % de la columna de exclusión por tamaño (10 ml).
- Los parámetros de concentración son los siguientes: El sistema es una celda Millipore Stirred Ultrafiltration 8200. La membrana es YM 10 63,5 mm. El MWCO de la membrana es 10 kDa. La presión de alimentación es 50-55 psi.
- El sistema se establece según las instrucciones del fabricante. NaPO₄ 50 mM (70:30 de dibásico:monobásico), se deja correr NaCl 109 mM a pH 7,3 a través del sistema durante 5-10 minutos. Cualquier solución restante se tira.
- El conjunto Superdex™ 75 se vierte en el depósito y se concentra a <10 ml
- El concentrado se aspira usando una pipeta, y la membrana se lava con 2 ml de NaPO₄ 50 mM (70:30 de dibásico:monobásico), NaCl 109 mM a pH 7,3
- La solución perseguida se añade al concentrado - no superar un volumen de concentrado total de 10 ml. La celda con agitación se lava con agua DI, y a continuación se pone en remojo durante la noche en NaOH 0,5 M. La unidad se lava entonces minuciosamente con agua DI y se guarda en 20 % de etanol.
- El conjunto de afinidad concentrado se inyecta sobre una columna Superdex™ 75 Prep Grade. La inyección nunca es superior al 3 % del volumen de la columna. La serie separará los contaminantes de alto peso del volumen de Zcytor17lig CEE e intercambiará el tampón, la diana purificada en el actual tampón de formulación. Se generan dos conjuntos, uno que es Zcytor17lig CEE altamente puro y el otro que es algo impuro. Este conjunto impuro se re-concentra y se re-inyecta para separar mejor los contaminantes, y el producto resultante se añade al primer Zcytor17lig CEE altamente puro para dar el producto final.
- Los parámetros de cromatografía son los siguientes. La columna es Superdex™ 75 Prep Grade Column 26/60 de 318 ml. El sistema es Akta Explorer. El tampón de elución es NaPO₄ 50 mM (70:30 de dibásico:monobásico), NaCl 109 mM a pH 7,3. La temperatura es 4 °C. La dirección de flujo es hacia abajo. El caudal es 30,6 cm/h. El volumen

de inyección es <10 ml. Se monitorizan las longitudes de onda de 215 nm y 280 nm. El tiempo promedio de UV es 0,1 s. La fracción de tamaño es 2,5 ml.

5 El concentrado de afinidad se carga en una inyección Superloop de 10 ml de bucle sobre la columna a caudal especificado, con elución isocrática usando 1,5 VC de tampón de elución.

10 El conjunto se determina mediante tinción reductora con gel de SDS-PAGE teñido con plata. Se hicieron normalmente dos conjuntos - uno que es producto altamente puro, mientras que el otro es algo impuro. Este producto impuro se hace pasar a través de las etapas de purificación 4 y 5 una segunda vez para generar la mejor pureza posible. La columna se limpia en flujo ascendente a 30 cm/h, 2 VC cada uno de NaOH 0,5 M, Tris 0,5M a pH 7,0, y tampón de elución con 0,02 % de NaN₃.

15 El conjunto de eluato de la columna Superdex™ 75 se concentra a 1 mg/ml, si se necesita. Si el conjunto ya está a 1 mg/ml por RP-HPLC o BCA, entonces se pasa directamente a esterilización y caracterización.

Los parámetros de concentración son los siguientes. El sistema es Millipore Amicon Ultra Device. La membrana es celulosa regenerada Ultracel. El MWCO de la membrana es 10 kDa. El tamaño del dispositivo es 15 ml. La velocidad de la centrifuga es 3000 rpm. La temperatura es 4 °C.

20 Se añade el conjunto de Superdex™ 75 al dispositivo, se tapa y se centrifuga a intervalos de 10 minutos. El conjunto se añade hasta que se alcance el volumen deseado para preparar una solución de 1 mg/ml. La determinación de la concentración de proteína se logra mediante análisis de RP-HPLC, BCA, o UV-Vis a A280 nm.

25 La Zcytor17lig CEE purificada se filtra a 0,2 µm bajo condiciones estériles. Una vez filtrada, se toman alícuotas para los diversos ensayos analíticos e *in vitro* usados para caracterizar la proteína. La proteína a granel se congela a -80 °C durante este tiempo.

30 Tras este procedimiento, IL-31CEE humana tuvo una recuperación final del 42 %, resultante en 3,71-4,0 mg de anti-EE unido por ml de proteína G-Sepharose.

Ejemplo 4

Transfección y expresión de IL-31-CEE murina

35 Se purificó Zcytor17ligm-CEE usando un sistema de expresión BHK 570 de mamífero para proporcionar un reactivo para los estudios biológicos. Durante la purificación, una cantidad grande de agregado estuvo presente después de la etapa de captura, que se separó del monómero usando cromatografía de exclusión por tamaño. La preparación final estuvo altamente glucosilada y tuvo dos formas glucosiladas predominantes visibles sobre SDS-PAGE con Coomassie.

40 Se purificó un total de 117 mg de Zcytor17ligm-CEE a partir de 75 l de fábricas que expresan BHK570.

Todas las etapas de purificación se realizaron a 4 °C.

45 Se cargaron cinco cosechas por separado y se eluyeron de la etapa de captura.

50 Una cosecha de 15 litros de fábricas se cargó directamente en anti-EE-CNBR-Sepharose FF equilibrada con fosfato de Na 7 mM, pH 7,3, KH₂PO₄ 1,5 mM, KCl 2 mM, NaCl 140 mM. Las dimensiones de la columna de 50 ml fueron 20 mm de D x 160 mm de L. La cosecha se cargó a un caudal de 3,9-5,9 ml/minuto. La proteína se eluyó de la etapa a un caudal de 10 ml/minuto usando acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 3. Las fracciones se neutralizaron inmediatamente con Tris 2 M, pH 8. El conjunto de Zcytor17ligm-CEE se determinó por el pico de A280 nm. Se ensayó una pequeña cantidad de conjunto en RP-HPLC, SDS-PAGE y Western. Entonces, el conjunto se congeló, hasta que las 4 siguientes cosechas se capturaron sobre la etapa de afinidad.

55 Después de suministrarse la cosecha final y capturarse Zcytor17ligm-CEE y eluirse de la columna de afinidad, todos los conjuntos se descongelaron, y a continuación se combinaron.

60 El conjunto de eluato combinado se concentró entonces usando un filtro de poliétersulfona de 5000 MWCO en una Amicon Stirred Cell para una concentración total de 38X.

El concentrado se dividió en dos cargas separadas para Superdex 75. El volumen de columna fue 180 ml, dimensiones= 16 mm de D X 900 mm de L. La columna se equilibró con Na₂H₂PO₄ 7,0 mM, pH 7,3, KH₂PO₄ 1,5 mM, KCl 2 mM, NaCl 140 mM. El caudal fue 1 ml/minuto. Se recogieron fracciones, basándose en datos de SDS-PAGE con Coomassie y Western, se preparó un conjunto final de 47 ml. Este conjunto se esterilizó por filtración y se dividió en alícuotas.

Ejemplo 5Construcción de vectores de expresión de *E. coli* para IL-315 A. Construcción de mutante de cisteína de IL-31: IL-31 humana C108S/pTAP433

Se generó la construcción de expresión de IL-31 C108S humana del siguiente modo. Se generaron las 350 primeras bases de la secuencia de IL-31 nativa por amplificación por PCR usando pTAP433 como molde y los cebadores de oligonucleótidos zc43,156 (SEQ ID NO: 37) y zc 45,307 (SEQ ID NO: 38). La región de la base 302 a 421 se generó por amplificación por PCR usando pTAP433 como molde y los cebadores de oligonucleótidos zc43,137 (SEQ ID NO: 39) y zc45,306 (SEQ ID NO: 40). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 25 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto; seguido de un remojo a 4 °C. Estos dos fragmentos de ADN se mezclaron juntos y se precipitaron con 2 volúmenes de etanol absoluto. El sedimento se resuspendió en 10 µl de H₂O y se usó para la recombinación en el vector de receptor cortado con SmaI pTAP238 para producir las construcciones que codifican IL-31 C108S humana. Los clones resultantes se designaron pCHAN7. Se digirieron con NotI (10 µl de ADN, 5 µl de tampón 3 New England BioLabs, 2 µl de NotI, 33 µl de H₂O durante 1 hora a 37 °C) y se volvieron a ligar con tampón ADN ligasa de T4 (7 µl del digesto previo, 2 µl de 5X tampón, 1 µl de ADN ligasa de T4). Esta etapa eliminó la secuencia de levadura, CEN-ARS, para reestructurar el vector. Se digirieron alícuotas del ADN con PvuII y PstI para confirmar la ausencia de la secuencia de levadura. Las construcciones de expresión de IL-31-C108S humanas se transformaron en la cepa W3110 de *E. coli*. La secuencia de polinucleótidos para el mutante de cisteína de IL-31 C108S humano se muestra en SEQ ID NO: 41. La secuencia de polipéptidos correspondiente se muestra en SEQ ID NO: 42.

25 B. Construcción de mutante de cisteína de IL-31:IL-31 murina C108S/nTAP433

Se generó la construcción de expresión de IL-31 C108S murina del siguiente modo. Se generaron las 350 primeras bases de la secuencia de IL-31 nativa por amplificación por PCR usando pTAP433 como molde y los cebadores de oligonucleótidos zc43,883 (SEQ ID NO: 43) y zc 45,302 (SEQ ID NO: 44). La región de la base 302 a 406 se generó por amplificación por PCR usando pTAP433 como molde y los cebadores de oligonucleótidos zc43,875 (SEQ ID NO: 45) y zc45,303 (SEQ ID NO: 46). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 25 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto; seguido de un remojo a 4 °C. Estos dos fragmentos de ADN se mezclaron juntos y se precipitaron con 2 volúmenes de etanol absoluto. El sedimento se resuspendió en 10 µl de H₂O y se usó para la recombinación en el vector de receptor cortado con SmaI pTAP238 para producir las construcciones que codifican IL-31 C108S murina. Los clones resultantes se designaron pCHAN8. Se digirieron con NotI (10 µl de ADN, 5 µl de tampón 3 New England BioLabs, 2 µl de NotI, 33 µl de H₂O durante 1 hora a 37 °C) y se volvieron a ligar con tampón ADN ligasa de T4 (7 µl del digesto previo, 2 µl de 5X tampón, 1 µl de ADN ligasa de T4). Esta etapa eliminó la secuencia de levadura, CEN-ARS, para reestructurar el vector. Se digirieron alícuotas del ADN con PvuII y PstI para confirmar la ausencia de la secuencia de levadura. Las construcciones de expresión de IL-31-C108S murinas se transformaron en la cepa W3110 de *E. coli*. La secuencia de polinucleótidos para el mutante de cisteína de IL-31 C108S murina se muestra en SEQ ID NO: 47. La secuencia de polipéptidos correspondiente se muestra en SEQ ID NO: 48.

Ejemplo 645 Replegamiento y purificación de ligando de IL-31 humana tras la expresión en *E. coli*

Se descongelan células de *E. coli* transfectadas con el polinucleótido de IL-31 humana en un vaso de precipitados y se añaden 4 ml de tampón de lisis frío en hielo por gramo de peso húmedo de células. Las células se mantienen frías poniendo el vaso de precipitados sobre hielo en un cubo de hielo.

50 Las células se homogeneizan usando un homogeneizador triturador de tejidos Polytron hasta que se rompen todos los coágulos, luego se lisan con dos pases a través de un APV 2000 a 8500 - 9000 psi manteniendo la suspensión de células enfriada a 4 °C. Se guarda una alícuota del lisado de células completas para SDS-PAGE. La viscosidad de la suspensión se reduce sonicando 5 min a potencia completa con ciclo de trabajo al 50 % (encendido durante 5 s, apagado durante 5 s) usando un homogeneizador ultrasónico o se hace un tercer pase a través del APV. La suspensión de células lisadas se clarifica por centrifugación durante 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en un rotor JA-14 en una centrifuga Beckman J2-21M), 4 °C. Se sedimentan por centrifugación células sin romper, residuos celulares grandes y la proteína de cuerpos de inclusión.

60 El sobrenadante se drena cuidadosamente del sedimento. Usando un homogeneizador de tejido, el sedimento se suspende con 4 a 6 ml de tampón de lavado por gramo de células en peso húmedo. La homogenización completa del sedimento es importante para separar lavando las proteínas solubles y componentes celulares. La eliminación de la pared celular y el material de membrana externa puede mejorarse aumentando la cantidad de solución de lavado a 10 ml por gramo de células.

65 La suspensión se centrifuga durante 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en JA-14), a 4 °C. El sobrenadante se

desecha y, usando el homogeneizador de tejido, el sedimento se suspende en 4 a 6 ml de tampón de lavado por gramo, peso en húmedo de las células. Esta etapa se repite 2 dos veces más. Si el sobrenadante está todavía turbio o coloreado, el lavado continúa hasta que el sobrenadante esté claro. El sedimento se suspende con tampón de lavado menos la urea, usando 4 a 6 ml de tampón por gramo de células húmedas. Centrifugar 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en rotor JA-14), 4 °C. Si fuera necesario, los sedimentos lavados pueden almacenarse a -80 °C.

Usando el homogeneizador de tejido, el sedimento se suspende con tampón de extracción que contiene HCl de guanidina. Si el extracto se someterá a filtración en gel, se usan 0,5 a 1,0 ml de tampón por gramo de peso en húmedo de células originales. Si el extracto se usará en procedimientos de plegamiento de proteínas, se usan 2 a 4 ml de tampón. Esta etapa se realiza a temperatura ambiente, luego se deja con agitación suave durante la noche a 4 °C. La suspensión se centrifuga 1 h a 35.000 x g a 4 °C. El sobrenadante se drena cuidadosamente del sedimento y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. El extracto de cuerpos de inclusión clarificado se usa para preparar proteína plegada. El extracto puede almacenarse a -80 °C hasta que se requiera.

Los cuerpos de inclusión se diluyen en el siguiente tampón: Arginina 0,75 M, PEG 3350 al 0,055 % (peso/volumen); NaCl 10,56 mM; KCl 0,44 mM; MgCl₂ 2,2 mM; CaCl₂ 2,2 mM; Tris 0,055 M a pH 8,2 (pH a temperatura ambiente). El par redox y las concentraciones en este tampón de replegamiento son del siguiente modo: [GSH] = 1 mM:[GSSG] = 0,1 mM. El par redox se añade al tampón inmediatamente antes de la dilución de los cuerpos de inclusión solubilizados. 18 ml de los cuerpos de inclusión solubles 12 mg/ml (por ensayo de RP-HPLC) se añaden gota a gota, a temperatura ambiente, a 2250 ml del tampón de replegamiento anterior con agitación vigorosa. La concentración de proteína diana final durante el replegamiento es 0,10 mg/ml. Tras la dilución, el recipiente se tapó y se dejó con agitación suave a temperatura ambiente durante 16 horas. En este momento, el ensayo de RP-HPLC indica dos picos afilados en cantidades aproximadamente equivalentes. El pico que eluye antes es el aducto S-glutitilado de la Cys libre (resto de cisteína impar en la secuencia nativa). El siguiente pico de área similar es el resto de Cys libre. La reacción se inactiva mediante la adición de ácido acético 25 mM y valoración del pH hasta pH 5,2. La reacción de replegamiento está ahora lista para la captura por HIC del producto. El medio replegado valorado extinguido se pasó a través de filtración de 0,45 micrómetros antes de cargar la columna de HIC de butilo para la captura de producto.

La reacción de replegamiento extinguida (pH 5,5) se filtro a través de 0,45 micrómetros. La preparación filtrada entera se alimenta a un lecho de Butyl 650-M de Toso Haas (2 cm de diámetro, 23 ml de lecho) a 30 ml/min mediante reparto en línea con (NH₄)₂SO₄ 2 M; ácido acético 25 mM a pH 5,2 como diluyente (proceso a temperatura ambiente). La relación para el reparto es 62,5 % de reacción de replegamiento con respecto a 37,5 % de diluyente (para suministrar conc. de alimentación nominal de (NH₄)₂SO₄ 0,75 M). No se pasó diana durante la carga bajo los parámetros de operación. La columna se lavó hasta el nivel inicial con 62,5 % de ácido acético 25 mM: 37,5 % de (NH₄)₂SO₄ 2 M; ácido acético 25 mM (para suministrar (NH₄)₂SO₄ 0,75 M; ácido acético 25 mM a pH 5,2). Tras completarse el lavado, se inicia un gradiente de 3 VC desde la condición de lavado hasta ácido acético 25 mM; MOPS 25 mM; ácido bórico 25 mM a pH 5,2 ("multitampón"). Durante esta conversión a fuerza iónica baja, poca proteína eluye de la matriz de HIC. Tras el lavado durante otros 5 VC se forma un gradiente de pH ascendente (durante 10 VC) entre el "multitampón" a pH 5,2 y el mismo multitampón a pH 8,65. Durante este gradiente de pH ascendente, la proteína diana eluye con un máximo que se produce ~ a pH 6,2, seguido de una ligera protuberancia durante las fracciones de cola a pH mayor. Por análisis de SDS-PAGE, el material que eluye es monomérico y presenta un desplazamiento de la movilidad cuando se comparan muestras de SDS-PAGE reducidas y no reducidas. Las fracciones posteriores (protuberancia de cola) revelan algunos multímeros de orden superior que se excluyen de las fracciones monoméricas reunidas.

El conjunto de HIC se ajusta a Tris 20 mM y el pH se ajusta a 7,8. Así ajustado, el material se carga directamente a un lecho de intercambio aniónico Poros HQ 50 (1 cm de diámetro, 14 ml de vol.) a 8 ml / min. La columna se equilibra en Tris 20 mM a pH 7,8 (tampón A). No pasa proteína diana bajo estas condiciones como se ha determinado por ensayo de RP-HPLC en el efluente de columna. Tras completarse la carga, el lecho se lavó con tampón de equilibrio durante 10 VC antes de iniciar un gradiente de 20 VC formado entre el tampón de equilibrio (tampón A) y el mismo tampón que contiene NaCl 0,5 M (tampón B) (exactamente 0 % al 60 % de B durante 20 VC). Muy pronto en este gradiente eluye un pico simétrico afilado seguido de un gran pico ancho. Por análisis de SDS-PAGE y de HPLC, el primer pico es la forma monomérica, el segundo pico contiene principalmente especies diméricas y de peso molecular de orden superior. La proteína en cada pico se reúne por separado y se concentra para aplicación a la etapa de columna de SEC.

Cada uno de los conjuntos de AIEX se concentró y se inyectó a un lecho de 120 ml (1,6 cm de diámetro) de Superdex 75 equilibrada en fosfato de Na 50 mM; NaCl 109 mM a pH 7,0. El perfil de SEC para la aplicación del pico 1 de AIEX presenta algo de densidad óptica previa al pico principal que se convierte en un pico simétrico eluyendo entre 0,6 y 0,7 VC y es monomérico por análisis de SDS-PAGE. El perfil de SEC para la aplicación del pico 2 de AIEX eluye entre 0,4 y 0,6 VC y contiene especies diméricas, así como de peso molecular superior. El eluato de la aplicación del conjunto 1 de AIEX se reúne entre 0,6 y 0,7 VC. Este material es predominantemente ligando de IL-31h monomérico como se observa en los geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie de producto final. Las fracciones de pico se reunieron; se esterilizaron por filtración a través de 0,2 micrómetros y se guardaron tal cual a 4 °C durante 2 días antes de separarse en alícuotas y congelarse a -80 °C. Las alícuotas se envían para AAA, determinación de la secuencia del extremo N, prueba de endotoxinas y análisis de SEC-MALLS.

Ejemplo 7

Replegamiento y purificación de IL-31 C108S humana de la expresión de *E. coli*

- 5 Se descongelan células de *E. coli* transfectadas con la secuencia de polinucleótidos de mutante de IL-31 C108S humana en un vaso de precipitados y se añaden 4 ml de tampón de lisis frío en hielo por gramo de peso en húmedo de las células. Las células bacterianas se mantienen frías colocando el vaso de precipitados sobre hielo en un cubo de hielo.
- 10 Las células se homogeneizan usando un homogeneizador triturador de tejidos Polytron hasta que se rompen todos los coágulos. Las células se lisan con dos pases a través del APV 2000 a 8500 - 9000 psi manteniendo la suspensión de células enfriada a 4 °C. Se guarda una alícuota del lisado de células completas para SDS-PAGE. La viscosidad de la suspensión se reduce sonicando 5 min a potencia completa con ciclo de trabajo al 50 % (encendido durante 5 s, apagado durante 5 s) usando un homogeneizador ultrasónico o se hace un tercer pase a través del APV. La suspensión de células lisadas se clarifica por centrifugación durante 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en un rotor JA-14 en una centrífuga Beckman J2-21M), 4 °C. Se sedimentan por centrifugación células sin romper, residuos celulares grandes y la proteína de cuerpos de inclusión.
- 15
- 20 El sobrenadante se drena cuidadosamente del sedimento, que se suspende usando un homogeneizador de tejido con 4 a 6 ml de tampón de lavado por gramo de células en peso húmedo. La homogenización completa del sedimento es importante para separar lavando las proteínas solubles y componentes celulares. La eliminación de la pared celular y el material de membrana externa puede mejorarse aumentando la cantidad de solución de lavado a 10 ml por gramo de células.
- 25 La suspensión se centrifuga 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en JA-14), 4 °C. El sobrenadante se desecha y, usando el homogeneizador de tejido, el sedimento se suspende en 4 a 6 ml de tampón de lavado por gramo, peso en húmedo de las células. Esta etapa se repite dos veces más.
- 30 Si el sobrenadante está todavía turbio o coloreado, el lavado continúa hasta que el sobrenadante esté claro. El sedimento se suspende con tampón de lavado menos la urea, usando 4 a 6 ml de tampón por gramo de células húmedas, y se centrifuga 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en rotor JA-14), 4 °C. Si fuera necesario, los sedimentos lavados pueden almacenarse a -80 °C. Es mejor guardar el material en esta etapa en vez de después de la etapa de extracción.
- 35 El sedimento se suspende usando el homogeneizador de tejido con tampón de extracción que contiene HCl de guanidina. Si el extracto se someterá a filtración en gel, se usan 0,5 a 1,0 ml de tampón por gramo de peso en húmedo de células originales. Si el extracto se usará en procedimientos de plegamiento de proteínas, se usan 2 a 4 ml de tampón. Esta etapa se realiza a temperatura ambiente, luego se deja con agitación suave durante la noche a 4 °C. La suspensión se centrifuga 1 h a 35.000 x g a 4 °C. El sobrenadante se drena cuidadosamente del sedimento y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. El extracto de cuerpos de inclusión clarificado se usa para preparar proteína plegada. El extracto se almacena a -80 °C hasta que se requiera.
- 40

Replegamiento y purificación

- 45 Los cuerpos de inclusión se diluyen en el siguiente tampón: Arginina 0,75 M, PEG 3350 al 0,055 % (peso/volumen), 20 % de glicerol; NaCl 10,56 mM; KCl 0,44 mM; MgCl₂ 2,2 mM; CaCl₂ 2,2 mM; Tris 0,055 M a pH 8,2 (pH a temperatura ambiente). El par rédox y las concentraciones en este tampón de replegamiento son del siguiente modo: [DTT] = 1,25 mM; [Cistamina] = 0,5 mM. El par rédox se añade al tampón inmediatamente antes de la dilución de los cuerpos de inclusión solubilizados. Se añaden gota a gota 16 ml de los cuerpos de inclusión solubles a 28,6 mg/ml (por ensayo de RP-HPLC), a temperatura ambiente, a 3200 ml del tampón de replegamiento anterior con agitación vigorosa. La concentración de proteína diana final durante el replegamiento es 0,15 mg/ml. Tras la dilución, el recipiente se tapa y se deja con agitación suave a temperatura ambiente durante 16 horas. En este momento el ensayo de RP-HPLC indica un único pico afilado. La reacción se inactiva mediante la adición de ácido acético 25 mM y valoración del pH hasta pH 5,2. La reacción de replegamiento está ahora lista para la captura por HIC del producto. El medio replegado valorado extinguido se pasó a través de filtración de 0,45 micrómetros antes de cargar la columna de HIC de butilo para la captura de producto.
- 50
- 55

- 60 La reacción de replegamiento extinguida (pH 5,5) se filtro a través de 0,45 micrómetros. La preparación filtrada entera se alimenta a un lecho de Butyl 650-M de Toso Haas (2 cm de diámetro, 29 ml de lecho) a 30 ml/min mediante reparto en línea con (NH₄)₂SO₄ 2 M; ácido acético 25 mM a pH 5,2 como diluyente (proceso a temperatura ambiente). La relación para el reparto es 62,5 % de reacción de replegamiento con respecto a 37,5 % de diluyente (para suministrar conc. de alimentación nominal de (NH₄)₂SO₄ 0,75 M).

- 65 La corriente de alimentación se comporta ideal durante la carga de la columna de HIC, se observó desviación cero en la presión operacional durante toda la carga entera. No se pasó diana durante la carga bajo los parámetros de operación. La columna se lava hasta el nivel inicial (20 VC) con 62,5 % de ácido acético 25 mM: 37,5 % de

(NH₄)₂SO₄ 2 M; ácido acético 25 mM (para suministrar (NH₄)₂SO₄ 0,75 M; ácido acético 25 mM a pH 5,2). Tras completarse el lavado, se inicia un gradiente de 3 VC desde la condición de lavado hasta ácido acético 25 mM; MOPS 25 mM; ácido bórico 25 mM a pH 5,2 (multitampón A). Durante esta conversión a fuerza iónica baja, poca proteína eluye de la matriz de HIC. Tras el lavado durante otros 5 VC se forma un gradiente de pH ascendente (durante 30 VC) entre el multitampón A a pH 5,2 y el mismo multitampón a pH 8,65 (multitampón B). Durante este gradiente de pH ascendente, la proteína diana eluye con un máximo que se produce ~ a pH 6,2, seguido de una ligera protuberancia durante las fracciones de cola a pH mayor. Por análisis de SDS-PAGE, el material que eluye primero es monomérico y presenta un desplazamiento de la movilidad cuando se comparan muestras de SDS-PAGE reducidas y no reducidas. Las fracciones posteriores (protuberancia de cola) revelan multímeros de orden superior y se excluyeron de las fracciones monoméricas reunidas.

El conjunto de HIC se ajusta a Tris 20 mM y el pH se ajusta a 7,8. Así ajustado, el material se carga directamente a un lecho de intercambio aniónico Poros HQ 50 (2 cm de diámetro, 44 ml de vol) a 30 ml / min. La columna se equilibra en Tris 20 mM a pH 7,8 (tampón A). No pasa proteína diana bajo estas condiciones como se ha determinado por ensayo de RP-HPLC en el efluente de columna. Tras completarse la carga, el lecho se lavó con tampón de equilibrio durante 10 VC antes de iniciar un gradiente de 15 VC formado entre el tampón de equilibrio (tampón A) y el mismo tampón que contiene NaCl 0,5 M (tampón B) (exactamente 0 % al 60 % de B durante 20 VC). Muy pronto en este gradiente eluye un pico simétrico afilado seguido de un pico de bajo nivel ancho. Por análisis de SDS-PAGE y de HPLC el pico simétrico temprano es el producto, en forma monomérica, mientras que el pico ancho de absorción de bajo nivel posterior es especies principalmente agregadas no completamente excluidas del conjunto generado en la etapa de HIC previa. La proteína en el pico simétrico se reúne y se concentra para aplicación a la etapa de la columna de SEC.

El conjunto de Poros HQ 50 AIEX se concentró y se inyectó a un lecho de 320 ml (2,6 cm de diámetro) de Superdex 75 equilibrado en fosfato de Na 50 mM; NaCl 109 mM a pH 7,0. La proteína eluyó como un pico simétrico afilado a ~ 0,55-0,6 VC y no hubo multímero detectable en ninguna fracción por HPLC y geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie sobrecargados. Se reunieron las fracciones de pico; se esterilizaron por filtración a través de 0,2 micrómetros y se guardaron tal cual a 4 grados durante 2 días antes de separarse en alícuotas y congelarse a -80 °C. Las alícuotas se envían para AAA, determinación de la secuencia del extremo N, prueba de endotoxinas y análisis de SEC-MALLS.

Ejemplo 8

Replegamiento y purificación de ligando de IL-31 murina tras la expresión en *E. coli*

Se descongelan células de *E. coli* transfectadas con la secuencia de polinucleótidos de IL-31 murina en un vaso de precipitados y se añaden 4 ml de tampón de lisis frío en hielo por gramo de peso en húmedo de las células. Las células bacterianas se mantienen frías colocando el vaso de precipitados sobre hielo en un cubo de hielo. Las células se homogeneizan usando un homogeneizador triturador de tejidos Polytron hasta que se rompen todos los coágulos. Las células se lisan con dos pases a través del APV 2000 a 8500 - 9000 psi mientras que se mantiene la suspensión de células enfriada a 4 °C. Se guarda una alícuota del lisado de células completas para SDS-PAGE. La viscosidad de la suspensión se reduce sonicando 5 min a potencia completa con ciclo de trabajo al 50 % (encendido durante 5 s, apagado durante 5 s) usando un homogeneizador ultrasónico o se hace un tercer pase a través del APV.

Clarificar la suspensión de células lisadas por centrifugación durante 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en un rotor JA-14 en una centrífuga Beckman J2-21M), 4 °C. Se sedimentan por centrifugación células sin romper, residuos celulares grandes y la proteína de cuerpos de inclusión.

El sobrenadante se drena cuidadosamente del sedimento, que se suspende con un homogeneizador de tejido y 4 a 6 ml de tampón de lavado por gramo de células en peso húmedo. La homogenización completa del sedimento es importante para separar lavando las proteínas solubles y componentes celulares. La eliminación de la pared celular y el material de membrana externa puede mejorarse aumentando la cantidad de solución de lavado a 10 ml por gramo de células. La suspensión se centrifuga 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en JA-14), 4 °C. El sobrenadante se desecha y, usando el homogeneizador de tejido, el sedimento se suspende en 4 a 6 ml de tampón de lavado por gramo, peso en húmedo de las células. Esta etapa se repite dos veces más. Si el sobrenadante está todavía turbio o coloreado, el lavado continúa hasta que el sobrenadante esté claro. El sedimento se suspende con tampón de lavado menos la urea, usando 4 a 6 ml de tampón por gramo de células húmedas y se centrifuga 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en (rotor JA-14), 4 °C.

Si fuera necesario, los sedimentos lavados pueden almacenarse a -80 °C.

El sedimento se suspende usando el homogeneizador de tejido con tampón de extracción que contiene HCl de guanidina. Si el extracto se someterá a filtración en gel, se usan 0,5 a 1,0 ml de tampón por gramo de peso en húmedo de células originales. Si el extracto se usará en procedimientos de plegamiento de proteínas, se usan 2 a 4 ml de tampón. Esta etapa se realiza a temperatura ambiente, luego se deja con agitación suave durante la noche a

4 °C. La suspensión se centrifuga 1 h a 35.000 x g a 4 °C. El sobrenadante se drena cuidadosamente del sedimento y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. El extracto de cuerpos de inclusión clarificado se usa para preparar proteína plegada. El extracto puede almacenarse a -80 °C hasta que se requiera.

5 Los cuerpos de inclusión se diluyen en el siguiente tampón: Arginina 0,75 M, PEG 3350 al 0,055 % (peso/volumen), 20 % de glicerol; NaCl 10,56 mM; KCl 0,44 mM; MgCl₂ 2,2 mM; CaCl₂ 2,2 mM; Tris 0,055 M a pH 8,2 (pH a temperatura ambiente). El par rédox y las concentraciones en este tampón de replegamiento son del siguiente modo: [Cisteamina] = 1,25 mM; [Cistamina] = 0,5 mM. El par rédox se añade al tampón inmediatamente antes de la dilución de los cuerpos de inclusión solubilizados. Se añaden gota a gota 9,5 ml de los cuerpos de inclusión solubles a 15,4 mg/ml (por ensayo de RP-HPLC), a temperatura ambiente, a 1600 ml del tampón de replegamiento anterior con agitación vigorosa. La concentración de proteína diana final durante el replegamiento es 0,10 mg/ml. Tras la dilución, el recipiente se tapó y se dejó con agitación suave a temperatura ambiente durante 16 horas. En este momento, el ensayo de RP-HPLC indica un único pico afilado. La reacción se inactiva mediante la adición de ácido acético 25 mM y valoración del pH hasta pH 5,2. La reacción de replegamiento está ahora lista para la captura por HIC del producto. El medio replegado valorado extinguido se pasó a través de filtración de 0,45 micrómetros antes de cargar la columna butyl HIC para la captura de producto.

La reacción de replegamiento extinguida (pH 5,5) se filtro a través de 0,45 micrómetros. La preparación filtrada entera se alimenta a un lecho de Butyl 650-M de Toso Haas (2 cm de diámetro, 30 ml de lecho) a 30 ml/min mediante reparto en línea con (NH₄)₂SO₄ 3 M; ácido acético 25 mM a pH 5,2 como diluyente (proceso a temperatura ambiente). La relación para el reparto es 75 % de reacción de replegamiento con respecto a 25 % de diluyente (para suministrar conc. de alimentación nominal de (NH₄)₂SO₄ 0,75 M).

La corriente de alimentación se comporta ideal durante la carga de la columna de HIC, se observó desviación cero en la presión operacional durante toda la carga entera. Aproximadamente el 8 % de la diana pasó durante la carga bajo estos parámetros de operación. La columna se lavó hasta el nivel inicial con 20 VC de (NH₄)₂SO₄ 0,75 M; tampón ácido acético 25 mM a pH 5,2. Tras completarse el lavado, se inicia un gradiente de 3 VC desde la condición de lavado hasta ácido acético 25 mM; MOPS 25 mM; ácido bórico 25 mM a pH 5,2 (multitampón A). Durante esta conversión a fuerza iónica baja, poca proteína eluye de la matriz de HIC. Tras el lavado durante otros 5 VC se forma un gradiente de pH ascendente (durante 10 VC) entre el "multitampón A" a pH 5,2 y el mismo tampón a pH 8,65 (multitampón B). Durante el gradiente de pH ascendente la proteína diana eluye con un máximo que se produce a aproximadamente pH 6,2, seguido de una ligera protuberancia durante las fracciones de cola a pH mayor. Por análisis de SDS-PAGE, el material que eluye primero es monomérico y presenta un desplazamiento de la movilidad cuando se comparan muestras de SDS-PAGE reducidas y no reducidas. Las fracciones posteriores (protuberancia de cola) revelan multímeros de orden superior y se excluyeron de las fracciones monoméricas reunidas.

El conjunto de HIC se ajusta a Tris 20 mM y el pH se ajusta a 7,8. Así ajustado, el material se carga directamente a un lecho de intercambio aniónico Poros HQ 50 (1 cm de diámetro, 14 ml de vol) a 8 ml / min. La columna se equilibra en Tris 20 mM a pH 7,8 (tampón A). No pasa proteína diana bajo estas condiciones como se ha determinado por ensayo de RP-HPLC en el efluente de columna. Tras completarse la carga, el lecho se lavó con tampón de equilibrio durante 10 VC antes de iniciar un gradiente de 20 VC formado entre el tampón de equilibrio (tampón A) y el mismo tampón que contiene NaCl 0,5 M (tampón B), exactamente 0 % al 60 % de tampón B durante 20 VC. Muy pronto en este gradiente eluye un pico simétrico afilado seguido de un pico de bajo nivel ancho. Por análisis de SDS-PAGE y de HPLC, el pico simétrico temprano es el producto, en forma monomérica, mientras que el pico ancho de absorción de bajo nivel posterior es especies principalmente agregadas no completamente excluidas del conjunto generado en la etapa de HIC previa. La proteína en el pico simétrico se reúne y se concentra para aplicación a la etapa de la columna de SEC.

El conjunto de Poros HQ 50 AIEX se concentró y se inyectó a un lecho de 120 ml (1,6 cm de diámetro) de Superdex 75 equilibrado en fosfato de Na 50 mM; NaCl 109 mM a pH 7,0. La proteína eluyó como un pico simétrico afilado a ~ 0,55-0,6 VC y no hubo multímero detectable en ninguna fracción por HPLC y geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie sobrecargados. Se reunieron las fracciones de pico; se esterilizaron por filtración a través de 0,2 micrómetros y se guardaron tal cual a 4 grados durante 2 días antes de separarse en alícuotas y congelarse a -80 °C. Las alícuotas se envían para AAA, determinación de la secuencia del extremo N, prueba de endotoxinas y análisis de SEC-MALLS.

Ejemplo 9

Replegamiento y purificación de IL-31 C108S murina tras la expresión en *E. coli*

Se descongelan células de *E. coli* que se han transfectado con la secuencia de IL-31 C108S murina en un vaso de precipitados y se añaden 4 ml de tampón de lisis frío en hielo por gramo de peso en húmedo de las células.

Las células bacterianas se enfrían colocando el vaso de precipitados sobre hielo en un cubo de hielo. Las células se homogeneizan usando un homogeneizador triturador de tejidos Polytron hasta que se rompen todos los coágulos.

Las células se lisan con dos pases a través del APV 2000 a 8500 - 9000 psi manteniendo la suspensión de células enfriada a 4 °C, y se guarda una alícuota del lisado de células completas para SDS-PAGE. La viscosidad de la suspensión se reduce sonicando 5 min a potencia completa con ciclo de trabajo al 50 % (encendido durante 5 s, apagado durante 5 s) usando un homogeneizador ultrasónico o se hace un tercer pase a través del APV. La suspensión de células lisadas se clarifica por centrifugación durante 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en un rotor JA-14 en una centrífuga Beckman J2-21M), 4 °C. Se sedimentan por centrifugación células sin romper, residuos celulares grandes y la proteína de cuerpos de inclusión.

El sobrenadante se drena cuidadosamente del sedimento, que se suspende usando un homogeneizador de tejido en 4 a 6 ml de tampón de lavado por gramo de células en peso húmedo. La homogenización completa del sedimento es importante para separar lavando las proteínas solubles y componentes celulares. La eliminación de la pared celular y el material de membrana externa puede mejorarse aumentando la cantidad de solución de lavado a 10 ml por gramo de células. La suspensión se centrifuga durante 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en JA-14), 4 °C. El sobrenadante se desecha y el sedimento se suspende usando el homogeneizador de tejido en 4 a 6 ml de tampón de lavado por gramo, peso en húmedo de las células. Esta etapa se repite dos veces más. Si el sobrenadante está todavía turbio o coloreado, el sedimento se lava hasta que el sobrenadante esté claro. El sedimento se suspende con tampón de lavado menos la urea, usando 4 a 6 ml de tampón por gramo de células húmedas, entonces se centrifuga durante 30 min a 22.000 x g (12.000 rpm en (rotor JA-14), 4 °C.

Si fuera necesario, los sedimentos lavados pueden almacenarse a -80 °C.

Usando el homogeneizador de tejido, el sedimento se suspende con tampón de extracción que contiene HCl de guanidina. Si el extracto se someterá a filtración en gel, se usan 0,5 a 1,0 ml de tampón por gramo de peso en húmedo de células originales. Si el extracto se usará en procedimientos de plegamiento de proteínas, se usan 2 a 4 ml de tampón. Esta etapa se realiza a temperatura ambiente y se deja con agitación suave durante la noche a 4 °C. La suspensión se centrifuga durante 1 h a 35.000 x g a 4 °C. El sobrenadante se drena cuidadosamente del sedimento, y el sobrenadante se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. El extracto de cuerpos de inclusión clarificado se usa para preparar proteína plegada. El extracto puede almacenarse a -80 °C hasta que se requiera.

Los cuerpos de inclusión se diluyen en el siguiente tampón: Arginina 0,75 M, PEG 3350 al 0,055 % (peso/volumen), 20 % de glicerol; NaCl 10,56 mM; KCl 0,44 mM; MgCl₂ 2,2 mM; CaCl₂ 2,2 mM; Tris 0,055 M a pH 8,2 (pH a temperatura ambiente). El par redox y las concentraciones en este tampón de replegamiento son del siguiente modo: [DTT] = 0,5 mM; [Cistamina] = 0,2 mM. El par redox se añade al tampón inmediatamente antes de la dilución de los cuerpos de inclusión solubilizados. Se añaden gota a gota 55 ml de los cuerpos de inclusión solubles a 47 mg/ml (por ensayo de RP-HPLC), a temperatura ambiente, a 19 litros del tampón de replegamiento anterior con agitación vigorosa. La concentración de proteína diana final durante el replegamiento es 0,15 mg/ml. Tras la dilución, el recipiente se tapó y se dejó con agitación suave a temperatura ambiente durante 16 horas. En este momento, el ensayo de RP-HPLC indica un único pico afilado. La reacción se inactiva mediante la adición de ácido acético 25 mM y valoración del pH hasta pH 5,2. La reacción de replegamiento está ahora lista para la captura por HIC del producto. El medio replegado valorado extinguido se pasó a través de filtración de 0,45 micrómetros antes de cargar la columna butyl HIC para la captura de producto.

La reacción de replegamiento extinguida (pH 5,5) se filtro a través de 0,45 micrómetros. La preparación filtrada entera se alimenta a un lecho de Butyl 650-M de Toso Haas (5 cm de diámetro, 190 ml de lecho) a 30 ml/min mediante reparto en línea con (NH₄)₂SO₄ 3 M; ácido acético 25 mM a pH 5,2 como diluyente (proceso a temperatura ambiente). La relación para el reparto es 75 % de reacción de replegamiento con respecto a 25 % de diluyente (para suministrar conc. de alimentación nominal de (NH₄)₂SO₄ 0,75 M).

La corriente de alimentación se comporta ideal durante la carga de la columna de HIC, se observó desviación cero en la presión operacional durante toda la carga entera. Aproximadamente el 8 % de diana se pasó durante la carga estos parámetros operacionales. La columna se lavó hasta el nivel inicial con 20 VC de (NH₄)₂SO₄ 0,75 M; tampón ácido acético 25 mM a pH 5,2. Tras completarse el lavado, se inicia un gradiente de 3 VC desde la condición de lavado hasta ácido acético 25 mM; MOPS 25 mM; ácido bórico 25 mM a pH 5,2 ("multitampón A"). Durante esta conversión a fuerza iónica baja, poca proteína eluye de la matriz de HIC. Tras el lavado durante otros 5 VC se forma un gradiente de pH ascendente (durante 5 VC) entre el "multitampón A" a pH 5,2 y el mismo multitampón a pH 8,65 (multitampón B). Durante el gradiente de pH ascendente la proteína diana eluye con un máximo que se produce a aproximadamente pH 6,2, seguido de una ligera protuberancia durante las fracciones de cola a pH mayor. Por análisis de SDS-PAGE, el material que eluye primero es monomérico y presenta un desplazamiento de la movilidad cuando se comparan muestras de SDS-PAGE reducidas y no reducidas. Las fracciones posteriores (protuberancia de cola) revelan multímeros de orden superior y se excluyeron de las fracciones monoméricas reunidas.

El conjunto de HIC se ajusta a Tris 20 mM y el pH se ajusta a 7,8. Así ajustado, el material se carga directamente a un lecho de intercambio aniónico Poros HQ 50 (5 cm de diámetro, 366 ml de vol) a 30 ml / min. La columna se equilibra en Tris 20 mM a pH 7,8 (tampón A). No pasa proteína diana bajo estas condiciones como se ha determinado por ensayo de RP-HPLC en el efluente de columna. Tras completarse la carga, el lecho se lavó con tampón de equilibrio durante 10 VC antes de iniciar un gradiente de 20 VC formado entre el tampón de equilibrio

(tampón A) y el mismo tampón que contiene NaCl 0,5 M (tampón B) (exactamente 0 % al 60 % de B durante 20 VC). Muy pronto en este gradiente eluye un pico simétrico afilado seguido de un pico de bajo nivel ancho. Por análisis de SDS-PAGE y de HPLC el pico simétrico temprano es el producto, en forma monomérica, mientras que el pico ancho de absorción de bajo nivel posterior es especies principalmente agregadas no completamente excluidas del conjunto generado en la etapa de HIC previa. La proteína en el pico simétrico se reúne y se concentra para aplicación a la etapa de la columna de SEC.

El conjunto de Poros HQ 50 ALEX se concentró y se inyectó a un lecho de 320 ml (2,6 cm de diámetro) de Superdex 75 equilibrado en fosfato de Na 50 mM; NaCl 109 mM a pH 7,0. La proteína eluyó como un pico simétrico afilado a ~ 0,55-0,6 VC y no hubo multímero detectable en ninguna fracción por HPLC y geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie sobrecargados. Se reunieron las fracciones de pico; se esterilizaron por filtración a través de 0,2 micrómetros y se guardaron tal cual a 4 grados durante 2 días antes de separarse en alícuotas y congelarse a -80 °C. Las alícuotas se envían para AAA, determinación de la secuencia del extremo N, prueba de endotoxinas y análisis de SEC-MALLS.

Ejemplo 10

Ensayo de actividad de luciferasa de IL-31

Se cultivan células BAF3 transfectadas con Zcytor17 (humano o ratón), OSMRB (humano o ratón) y KZ134 a entre 5×10^5 - 1×10^6 células/ml. Las células se lavan con medio de ensayo (RPMI 1640, 10 % de FBS, L-glutamina, piruvato de sodio y Pen/estrep) 1,5x y a continuación se resuspenden a 3×10^5 célula/ml en medio de ensayo. En una placa opaca de 96 pocillos (Costar), patrones de IL-31 se valoran por duplicado de 600 pg/ml a 9,38 pg/ml en medio de ensayo mediante dilución sucesiva 1:2, 100 ul/pocillo. Se añaden patrones de control de calidad por duplicado a la placa a 350 pg/ml y 35 pg/ml a 100 ul/pocillo. Las muestras se añaden por duplicado a los pocillos de muestra. 100 ul de las células lavadas se añaden entonces a cada pocillo para una concentración final de 3×10^4 células/pocillo. Esta placa se incuba entonces 16-24 horas a 37 °C en una estufa de incubación con 5 % de CO₂. La placa se centrifuga entonces a 1200 rpm durante 5 minutos. El medio se sacudió y se añaden 25 ul/pocillo de tampón de lisis (Promega). Después de 10 minutos, la placa se lee en un luminómetro (Berthold). El luminómetro añade 40 ul/pocillo de mezcla de sustrato de luciferasa (Promega) e integra la luminiscencia durante el periodo de 4 segundos.

Se comparó proteína de *E. coli* transfectada con secuencia de polinucleótidos nativa humana o de ratón con la proteína de *E. coli* transfectada con el mutante C108S humano o de ratón en este ensayo. El material de mutante de cisteína tuvo actividad equivalente en este ensayo como material nativo.

Ejemplo 11

Actividad *in vivo* de IL-31 producida por *E. coli* y BHK

En este estudio se usaron mini-bombas osmóticas de 7 días rellenas con proteína Zcytor17lig derivada de *E. coli* o proteína derivada de BHK para examinar si la proteína derivada de *E. coli* tenía la misma actividad *in vivo* y causó el mismo fenotipo de pérdida de pelo y de rascado.

Se administraron ratones Balb/C con 5, 1 o 0,2 µg de dosis de IL-31 mediante mini-bombas osmóticas durante 6 días, y se monitorizaron estrechamente para signos de rascado y pérdida de pelo. Los ratones se dividieron en siete grupos: Grupo 1 (n = 5), N.º 401-405, implante s.c. de la bomba de ligando Zcytor17 producido por BHK a µg/día; Grupo 2 (n = 5) N.º 406-410, implante s.c. de la bomba de ligando Zcytor17 producido por BHK a 1 µg/día; Grupo 3 (n = 5) N.º 411-415, implante s.c. de la bomba de ligando Zcytor17 producido por BHK 0,2 µg/día; Grupo 4 (n = 5) N.º 416-420, implante s.c. de la bomba de ligando Zcytor17 producido por *E. coli* 5 µg/día; Grupo 5 (n = 5) N.º 421-425, implante s.c. de la bomba de ligando Zcytor17 producido por *E. coli* 1 µg/día; Grupo 6 (n = 5) N.º 426-430, implante s.c. de la bomba de ligando Zcytor17 producido por *E. coli* 0,2 µg/día; y Grupo 7 (n = 5) N.º 431-435, implante s.c. de control de vehículo (PBS/0,1 % de BSA). Se usó el modelo de bomba de 7 días de Alzet 1007D (Durect Corporation, Cupertino California). La proteína se diluyó con PBS estéril/0,1 % de BSA.

Los ratones se marcaron en la oreja antes del inicio del estudio. En el día -1, los ratones se anestesiaron y se recogieron pre-sangrados por vía retro-orbital para la recogida de suero. En el día 0, los ratones Balb/C se administraron con 5, 1 o 0,2 µg de dosis de Zcytor17L mediante mini-bombas osmóticas. En los días 1-5, los ratones se monitorizaron estrechamente cada día para los signos de rascado y pérdida de pelo. Cada día se les dio a los ratones una puntuación visual de 0 a 4, 0 = normal y 4 = pérdida de pelo grave / excesiva. En el día 6, los ratones se puntuaron visualmente, luego se sacrificaron, el suero se recogió para probar la expresión de citocinas.

Los resultados de las puntuaciones de las observaciones mostraron que IL-31 derivada de *E. coli* dio los mismos datos fenotípicos que el material derivado de BHK.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ZYMOGENETICS, INC. BRADY, LOWELL J. BUKOWSKI, THOMAS R. CHAN, CHUNG
- 5 <120> PREPARACIONES HOMOGÉNEAS DE IL-31
- <130> 05-01PC
- <150> 60/648.189
- 10 <151> 28-06-2005
- <160> 49
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 15 <210> 1
- <211> 904
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 20 <220>
- <221> CDS
- <222> (28)...(519)
- 25 <400> 1

```

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                    105

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

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

ES 2 579 758 T3

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

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

ggattggcag gaacttaagg agccttaaaa agatgaccga cagctaagtg tgggaactct 599
 gccgtgattc cttaagtaca tttttccaat gaataatctc agggaccctc catatgggct 659
 agtcccggga gggctgagat gtgaatttgt gaattacctt gaaaaacatt aggttattgt 719
 tattagtctt ggtatttatg gaatgctttt cttctgcagg ctttaagtctt acttattata 779
 ccctcgtgag ggtgggaggt ggcagctatg ttaatttatt gatatttatt gtactaagag 839
 ttgtcaatgc tccttggggg agcctcggga atctatntaa taaattatat tgaatttttc 899
 tcata 904

5 <210> 2
 <211> 164
 <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					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												

10
 15 <210> 3
 <211> 492
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polinucleótido degradado de II-31 humano de SEQ ID NO: 2

20 <221> misc_feature
 <222> 6, 9, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 42, 54, 57, 60, 66,
 69, 72, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 114
 <223> n = A, T, C o G

25 <221> misc_feature
 <222> 126, 135, 141, 144, 147, 156, 159, 168, 183, 186, 189, 192,
 195, 207, 210, 213, 219, 222, 225, 231, 237, 240, 255
 <223> n = A, T, C o G

30 <221> misc_feature

ES 2 579 758 T3

<222> 258, 261, 267, 270, 276, 282, 288, 294, 306, 309, 333, 342,
357, 360, 366, 375, 378, 381, 384, 390, 405, 414, 417
<223> n = A, T, C o G

5

<221> misc_feature
<222> 423, 435, 450, 453, 456, 462, 465, 468, 471, 474, 477, 486,
489, 492
<223> n = A, T, C o G

10

<400> 3

```
atggcnwsnc aywsnggncc nwsnacnwsn gtnytnntyy tnttytgytg yytnggnggn 60
tggytngcnw sncayacnyt nccngtnmgn ytnytnmgn cnwsngayga ygtncaraar 120
athgtngarg arytnarws nytnwsnaar atgytnytna argaygtnga rgargaraar 180
ggngtnytng tnwsncaraa ytayacnytn ccntgyytnw snccngaygc ncarccnccn 240
aayaayathc aywsnccngc nathmgngcn tayytnaara cnathmgnc rytnngayaay 300
aarwsngtna thgaygarat hathgarcaay ytnngayaary tnathttyca rgaygcncn 360
garacnaaya thwsngtncc nacngayacn caygartgya armgnttyat hytnacnath 420
wsncarcart tywsngartg yatggayytn gcnytnaarw snytnacnws nggngncnar 480
cargcnacna cn 492
```

15

<210> 4
<211> 755
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

20

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(489)

25

<400> 4

ES 2 579 758 T3

atg atc ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc 48
Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys
1 5 10 15

tgt ata gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca 96
Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro
20 25 30

ata tcg aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag 144
Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu
35 40 45

tct cag gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg 192
Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met
50 55 60

tca gca gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa 240
Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu
65 70 75 80

gca tta acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa 288
Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys
85 90 95

gtg ttg agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta 336
Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu
100 105 110

aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct 384
Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro
115 120 125

gga aat act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt 432
Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val
130 135 140

tta aag cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat 480
Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn
145 150 155 160

act aca tgc tgagtgatgg gggggggggg ggtgcagtgt cctcagcagt 529
Thr Thr Cys

gcctgtcctt cgagggctga gcttgcaacc caggacttaa ctccaaaggg actgtgcbgg 589
cattactagt catgttattt atgtttttat ttgtccact gaaatcttgt tctgctaccc 649
tgtagggact ggaagtggca gctatattta tttatttatg tactgagttt gttaacgctc 709
catggaggag ccttcagagt ctatttaata aattatattg acatga 755

<210> 5
<211> 163
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 5

5

ES 2 579 758 T3

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

<210> 6
 <211> 489
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polinucleótido degradado de II-31 humano de SEQ ID NO: 5

10

<221> misc_feature

<222> 15, 18, 21, 24, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 57, 60, 66, 69, 72,
 78, 81, 84, 90, 93, 96, 102, 114, 117, 120, 123, 132

15

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

<221> misc_feature

<222> 135, 147, 156, 171, 183, 186, 189, 195, 198, 207, 216, 219,
 228, 231, 237, 243, 246, 249, 258, 261, 270, 276, 285

20

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

<221> misc_feature

<222> 291, 294, 297, 306, 309, 315, 318, 324, 330, 336, 339, 348,
 360, 363, 369, 378, 381, 384, 387, 393, 402, 417, 423

25

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

<221> misc_feature

<222> 426, 429, 432, 435, 447, 459, 465, 471, 483, 486

30

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

<400> 6

35

ES 2 579 758 T3

```

atgathttyc ayacnggnac nacnaarecn acnytngtny tnytntgytg yathggnacn 60
tggytngcna cntgywsnyt nwsnttyggn gcncnathw snaargarga yytnmgnacn 120
acnathgayy tnytnaarca rgarwsncar gayytnaya ayaaytayws nathaarcar 180
gcnwsnggna tgwsngcnga ygarwsnath carytncnt gyttywsnyt ngaymgngar 240
gcnynacna ayathwsngt nathathgcn cayyngara argtnaargt nytnwsngar 300
aayacngtng ayacnwsntg ggtnathmgn tggynacna ayathwsntg yttyaayccn 360
ytnaayytna ayathwsngt nccnggnaay acngaygarw sntaygaytg yaargtntty 420
gtnytnacng tnytnaarca rtywsnaay tgyatggcng arytncargc naargayaay 480
acnactgy 489

```

5 <210> 7
 <211> 1557
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1557)

<400> 7

```

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

```

ES 2 579 758 T3

cg	gtg	aaa	cca	g	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	g	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	cg	aag	gat	aaa	aac	caa	acg	tac	aac	ctc	acg	ggg	ctg	cag	576
Lys	Asn	Arg	Lys	Asp	Lys	Asn	Gln	Thr	Tyr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	
		180						185					190			
cct	ttt	aca	gaa	tat	gtc	ata	gct	ctg	cga	tgt	gcg	gtc	aag	gag	tca	624
Pro	Phe	Thr	Glu	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu	Arg	Cys	Ala	Val	Lys	Glu	Ser	
		195					200					205				
aag	ttc	tgg	agt	gac	tgg	agc	caa	gaa	aaa	atg	gga	atg	act	gag	gaa	672
Lys	Phe	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Gln	Glu	Lys	Met	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	
	210					215					220					
gaa	gct	cca	tgt	ggc	ctg	gaa	ctg	tgg	aga	gtc	ctg	aaa	cca	gct	gag	720
Glu	Ala	Pro	Cys	Gly	Leu	Glu	Leu	Trp	Arg	Val	Leu	Lys	Pro	Ala	Glu	
225					230					235					240	
gcg	gat	gga	aga	agg	cca	gtg	cgg	ttg	tta	tgg	aag	aag	gca	aga	gga	768
Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	
			245						250					255		
gcc	cca	gtc	cta	gag	aaa	aca	ctt	ggc	tac	aac	ata	tgg	tac	tat	cca	816
Ala	Pro	Val	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Trp	Tyr	Tyr	Pro	
			260					265					270			
gaa	agc	aac	act	aac	ctc	aca	gaa	aca	atg	aac	act	act	aac	cag	cag	864
Glu	Ser	Asn	Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Thr	Met	Asn	Thr	Thr	Asn	Gln	Gln	
		275					280					285				
ctt	gaa	ctg	cat	ctg	gga	ggc	gag	agc	ttt	tgg	gtg	tct	atg	att	tct	912
Leu	Glu	Leu	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Ser	Phe	Trp	Val	Ser	Met	Ile	Ser	
	290					295					300					
tat	aat	tct	ctt	ggg	aag	tct	cca	gtg	gcc	acc	ctg	agg	att	cca	gct	960
Tyr	Asn	Ser	Leu	Gly	Lys	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Ile	Pro	Ala	
305					310					315					320	
att	caa	gaa	aaa	tca	ttt	cag	tgc	att	gag	gtc	atg	cag	gcc	tgc	g	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					

ES 2 579 758 T3

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 gcc	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> 8
 <211> 519
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

5

ES 2 579 758 T3

Met	Met	Trp	Thr	Trp	Ala	Leu	Trp	Met	Leu	Pro	Ser	Leu	Cys	Lys	Phe
1				5					10					15	
Ser	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Cys	Val	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Tyr	Arg	Lys	Asn	Leu	Thr	Cys	Thr	Trp	Ser	Pro	Gly	Lys	Glu	Thr
		35					40					45			
Ser	Tyr	Thr	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Arg	Thr	Tyr	Ala	Phe	Gly	Glu	Lys
						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		
					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		
					295						300						
Tyr	Asn	Ser	Leu	Gly	Lys	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Ile	Pro	Ala		
					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		
							360					365					
Thr	Leu	Ser	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Gln		
						375						380					
Gln	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Phe	Trp	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro		
					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		
							440					445					
Arg	Lys	Gly	Ile	Ile	Cys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly		
						455					460						
Gly	Lys	Gly	Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Tyr	Gly		
					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													

<210> 9
 <211> 2748
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (237)...(2222)

10

<400> 9

```

gatggggccc tgaatggtga tctgacagaa ttccagacca acctggtggt tattgtcett 60
ttcatctggt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaaggtgct gctgtccggg 120
ctctcagaga aggcagtgct ggaggcgctt ctggcccggg tctctccta ctgttctg 180
tagcccagcc ttctcggggt ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239
Met
1
    
```

ES 2 579 758 T3

ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac	287
Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His	
5 10 15	
gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg	335
Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu	
20 25 30	
tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act	383
Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr	
35 40 45	
aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act	431
Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Thr	
50 55 60 65	
tgc act tgg aga cca gag aag gaa acc aat gat acc agc tac att gtg	479
Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Val	
70 75 80	
act ttg act tac tcc tat gga aaa agc aat tat agt gac aat gct aca	527
Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala Thr	
85 90 95	
gag gct tca tat tct ttt ccc cgt tcc tgt gca atg ccc cca gac atc	575
Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp Ile	
100 105 110	
tgc agt gtt gaa gta caa gct caa aat gga gat ggt aaa gtt aaa tct	623
Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys Ser	
115 120 125	
gac atc aca tat tgg cat tta atc tcc ata gca aaa acc gaa cca cct	671
Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro	
130 135 140 145	
ata att tta agt gtg aat cca att tgt aat aga atg ttc cag ata caa	719
Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile Gln	
150 155 160	
tgg aaa ccg cgt gaa aag act cgt ggg ttt cct tta gta tgc atg ctt	767
Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met Leu	
165 170 175	
cgg ttc aga act gtc aac agt agc cgc tgg acg gaa gtc aat ttt gaa	815
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu	
180 185 190	
aac tgt aaa cag gtc tgc aac ctc aca gga ctt cag gct ttc aca gaa	863
Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr Glu	
195 200 205	
tat gtc ctg gct cta cga ttc agg ttc aat gac tca aga tat tgg agc	911
Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp Ser	
210 215 220 225	
aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtg act atg gag gaa gtt cca cat	959
Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro His	
230 235 240	
gtc ctg gac ctg tgg aga att ctg gaa cca gca gac atg aac gga gac	1007
Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly Asp	
245 250 255	

ES 2 579 758 T3

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 tgg 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

ES 2 579 758 T3

gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc 1823
Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile
515 520 525

agt gtg ttt gaa att gtc ctt cta aca tct cta gtt gga gga ggc ctt 1871
Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu
530 535 540 545

ctt cta ctt agc atc aaa aca gtg act ttt ggc ctc aga aag cca aac 1919
Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro Asn
550 555 560

cgg ttg act ccc ctg tgt tgt cct gat gtt ccc aac cct gct gaa agt 1967
Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser
565 570 575

agt tta gcc aca tgg ctc gga gat ggt ttc aag aag tca aat atg aag 2015
Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met Lys
580 585 590

gag act gga aac tct ggg aac aca gaa gac gtg gtc cta aaa cca tgt 2063
Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro Cys
595 600 605

ccc gtc ccc gcg gat ctc att gac aag ctg gta gtg aac ttt gag aat 2111
Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Asn
610 615 620 625

ttt ctg gaa gta gtt ttg aca gag gaa gct gga aag ggt cag gcg agc 2159
Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala Ser
630 635 640

att ttg gga gga gaa gcg aat gag tat atc tta tcc cag gaa cca agc 2207
Ile Leu Gly Gly Glu Ala Asn Glu Tyr Ile Leu Ser Gln Glu Pro Ser
645 650 655

tgt cct ggc cat tgc tgaagctacc ctcagggtcc aggacagctg tcttgttggc 2262
Cys Pro Gly His Cys
660

acttgactct ggcaggaacc tgatctctac ttttcttctc cctgtctccg gacactttct 2322
ctccttcagc cagagaccag gactagagcg gattcctcat ggtttgccag gctcctcagt 2382
ccttgctcgg gctcaggatc ttcaacaatg ccttttctgg gacactccat catccactta 2442
tatttatttt ttgcaacatt gtggattgaa cccagggact tgtttatgcg cgcaacttca 2502
gtaactgtgg cagagactta ggaatggaga tctgaccctt tgcagaaggt ttctggacat 2562
cctcctctgt gtgagcctca gacagcattg tctttacttt gaatcagctt ccaagttaat 2622
aaaagaaaaa cagagaggtg gcataacagc tctgtcttcc tgacctgctt gagttccagt 2682
tctgacttcc tttggtgatg aacagcaatg tgggaagtgt aagctgaata aaccctttcc 2742
tcccca 2748

<210> 10
<211> 662
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 10

ES 2 579 758 T3

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

Thr	Cys	Thr	Trp	Arg	Pro	Glu	Lys	Glu	Thr	Asn	Asp	Thr	Ser	Tyr	Ile
65					70					75					80
Val	Thr	Leu	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Lys	Ser	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asn	Ala
				85					90					95	
Thr	Glu	Ala	Ser	Tyr	Ser	Phe	Pro	Arg	Ser	Cys	Ala	Met	Pro	Pro	Asp
			100					105					110		
Ile	Cys	Ser	Val	Glu	Val	Gln	Ala	Gln	Asn	Gly	Asp	Gly	Lys	Val	Lys
		115					120					125			
Ser	Asp	Ile	Thr	Tyr	Trp	His	Leu	Ile	Ser	Ile	Ala	Lys	Thr	Glu	Pro
	130					135					140				
Pro	Ile	Ile	Leu	Ser	Val	Asn	Pro	Ile	Cys	Asn	Arg	Met	Phe	Gln	Ile
145					150					155					160
Gln	Trp	Lys	Pro	Arg	Glu	Lys	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	Leu	Val	Cys	Met
				165					170					175	
Leu	Arg	Phe	Arg	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Arg	Trp	Thr	Glu	Val	Asn	Phe
			180					185					190		
Glu	Asn	Cys	Lys	Gln	Val	Cys	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Phe	Thr
		195					200					205			
Glu	Tyr	Val	Leu	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg	Phe	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Trp
	210					215					220				
Ser	Lys	Trp	Ser	Lys	Glu	Glu	Thr	Arg	Val	Thr	Met	Glu	Glu	Val	Pro
225					230					235					240
His	Val	Leu	Asp	Leu	Trp	Arg	Ile	Leu	Glu	Pro	Ala	Asp	Met	Asn	Gly
				245						250				255	
Asp	Arg	Lys	Val	Arg	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Val
			260					265					270		
Leu	Glu	Lys	Thr	Phe	Gly	Tyr	His	Ile	Gln	Tyr	Phe	Ala	Glu	Asn	Ser
			275				280					285			
Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Gln	Gln	Tyr	Glu	Leu
	290					295					300				
Leu	Leu	Met	Ser	Gln	Ala	His	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Ser	Phe	Asn	Ser
305					310					315					320
Leu	Gly	Lys	Ser	Gln	Glu	Thr	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Asp	Val	His	Glu
				325					330					335	
Lys	Thr	Phe	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ser	Met	Gln	Ala	Tyr	Ile	Ala	Glu	Pro
			340					345					350		
Leu	Leu	Val	Val	Asn	Trp	Gln	Ser	Ser	Ile	Pro	Ala	Val	Asp	Thr	Trp
			355				360					365			
Ile	Val	Glu	Trp	Leu	Pro	Glu	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Phe	Pro	Ala	Leu
	370					375					380				
Ser	Trp	Glu	Ser	Val	Ser	Gln	Val	Thr	Asn	Trp	Thr	Ile	Glu	Gln	Asp
385					390					395					400
Lys	Leu	Lys	Pro	Phe	Thr	Cys	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Tyr	Pro	Val	Leu
				405					410					415	
Gly	His	Arg	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Ala	Lys	Glu
			420					425					430		
Gly	Thr	Pro	Leu	Lys	Gly	Pro	Glu	Thr	Arg	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Leu
		435					440					445			
Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn
	450					455					460				
Gly	Phe	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Val	Phe	Tyr	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys
465					470					475					480
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	

ES 2 579 758 T3

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> 11
 <211> 2964
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (13)...(2949)

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 579 758 T3

gtg gaa gaa ggc acc aat gtt acc att tgt tac gtt tct agg aac att	531
Val Glu Glu Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile	
160 165 170	
caa aat aat gta tcc tgt tat ttg gaa ggg aaa cag att cat gga gaa	579
Gln Asn Asn Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu	
175 180 185	
caa ctt gat cca cat gta act gca ttc aac ttg aat agt gtg cct ttc	627
Gln Leu Asp Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe	
190 195 200 205	
att agg aat aaa ggg aca aat atc tat tgt gag gca agt caa gga aat	675
Ile Arg Asn Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn	
210 215 220	
gtc agt gaa ggc atg aaa ggc atc gtt ctt ttt gtc tca aaa gta ctt	723
Val Ser Glu Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu	
225 230 235	
gag gag ccc aag gac ttt tct tgt gaa acc gag gac ttc aag act ttg	771
Glu Glu Pro Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu	
240 245 250	
cac tgt act tgg gat cct ggg acg gac act gcc ttg ggg tgg tct aaa	819
His Cys Thr Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys	
255 260 265	
caa cct tcc caa agc tac act tta ttt gaa tca ttt tct ggg gaa aag	867
Gln Pro Ser Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys	
270 275 280 285	
aaa ctt tgt aca cac aaa aac tgg tgt aat tgg caa ata act caa gac	915
Lys Leu Cys Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp	
290 295 300	
tca caa gaa acc tat aac ttc aca ctc ata gct gaa aat tac tta agg	963
Ser Gln Glu Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg	
305 310 315	
aag aga agt gtc aat atc ctt ttt aac ctg act cat cga gtt tat tta	1011
Lys Arg Ser Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu	
320 325 330	
atg aat cct ttt agt gtc aac ttt gaa aat gta aat gcc aca aat gcc	1059
Met Asn Pro Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala	
335 340 345	
atc atg acc tgg aag gtg cac tcc ata agg aat aat ttc aca tat ttg	1107
Ile Met Thr Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu	
350 355 360 365	
tgt cag att gaa ctc cat ggt gaa gga aaa atg atg caa tac aat gtt	1155
Cys Gln Ile Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val	
370 375 380	
tcc atc aag gtg aac ggt gag tac ttc tta agt gaa ctg gaa cct gcc	1203
Ser Ile Lys Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala	
385 390 395	
aca gag tac atg gcg cga gta cgg tgt gct gat gcc agc cac ttc tgg	1251
Thr Glu Tyr Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp	
400 405 410	

ES 2 579 758 T3

aaa tgg agt gaa tgg agt ggt cag aac ttc acc aca ctt gaa gct gct	1299
Lys Trp Ser Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala	
415 420 425	
ccc tca gag gcc cct gat gtc tgg aga att gtg agc ttg gag cca gga	1347
Pro Ser Glu Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly	
430 435 440 445	
aat cat act gtg acc tta ttc tgg aag cca tta tca aaa ctg cat gcc	1395
Asn His Thr Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala	
450 455 460	
aat gga aag atc ctg ttc tat aat gta gtt gta gaa aac cta gac aaa	1443
Asn Gly Lys Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys	
465 470 475	
cca tcc agt tca gag ctc cat tcc att cca gca cca gcc aac agc aca	1491
Pro Ser Ser Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr	
480 485 490	
aaa cta atc ctt gac agg tgt tcc tac caa atc tgc gtc ata gcc aac	1539
Lys Leu Ile Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn	
495 500 505	
aac agt gtg ggt gct tct cct gct tct gta ata gtc atc tct gca gac	1587
Asn Ser Val Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp	
510 515 520 525	
ccc gaa aac aaa gag gtt gag gaa gaa aga att gca ggc aca gag ggt	1635
Pro Glu Asn Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly	
530 535 540	
gga ttc tct ctg tct tgg aaa ccc caa cct gga gat gtt ata ggc tat	1683
Gly Phe Ser Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr	
545 550 555	
gtt gtg gac tgg tgt gac cat acc cag gat gtg ctc ggt gat ttc cag	1731
Val Val Asp Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln	
560 565 570	
tgg aag aat gta ggt ccc aat acc aca agc aca gtc att agc aca gat	1779
Trp Lys Asn Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp	
575 580 585	
gct ttt agg cca gga gtt cga tat gac ttc aga att tat ggg tta tct	1827
Ala Phe Arg Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser	
590 595 600 605	
aca aaa agg att gct tgt tta tta gag aaa aaa aca gga tac tct cag	1875
Thr Lys Arg Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln	
610 615 620	
gaa ctt gct cct tca gac aac cct cac gtg ctg gtg gat aca ttg aca	1923
Glu Leu Ala Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr	
625 630 635	
tcc cac tcc ttc act ctg agt tgg aaa gat tac tct act gaa tct caa	1971
Ser His Ser Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln	
640 645 650	
cct ggt ttt ata caa ggg tac cat gtc tat ctg aaa tcc aag gcg agg	2019
Pro Gly Phe Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg	
655 660 665	

ES 2 579 758 T3

cag tgc cac cca cga ttt gaa aag gca gtt ctt tca gat ggt tca gaa	2067
Gln Cys His Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu	
670 675 680 685	
tgt tgc aaa tac aaa att gac aac ccg gaa gaa aag gca ttg att gtg	2115
Cys Cys Lys Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val	
690 695 700	
gac aac cta aag cca gaa tcc ttc tat gag ttt ttc atc act cca ttc	2163
Asp Asn Leu Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe	
705 710 715	
act agt gct ggt gaa ggc ccc agt gct acg ttc acg aag gtc acg act	2211
Thr Ser Ala Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr	
720 725 730	
ccg gat gaa cac tcc tcg atg ctg att cat atc cta ctg ccc atg gtt	2259
Pro Asp Glu His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val	
735 740 745	
ttc tgc gtc ttg ctc atc atg gtc atg tgc tac ttg aaa agt cag tgg	2307
Phe Cys Val Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp	
750 755 760 765	
atc aag gag acc tgt tat cct gac atc cct gac cct tac aag agc agc	2355
Ile Lys Glu Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser	
770 775 780	
atc ctg tca tta ata aaa ttc aag gag aac cct cac cta ata ata atg	2403
Ile Leu Ser Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met	
785 790 795	
aat gtc agt gac tgt atc cca gat gct att gaa gtt gta agc aag cca	2451
Asn Val Ser Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro	
800 805 810	
gaa ggg aca aag ata cag ttc cta ggc act agg aag tca ctc aca gaa	2499
Glu Gly Thr Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu	
815 820 825	
acc gag ttg act aag cct aac tac ctt tat ctc ctt cca aca gaa aag	2547
Thr Glu Leu Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys	
830 835 840 845	
aat cac tct ggc cct ggc ccc tgc atc tgt ttt gag aac ttg acc tat	2595
Asn His Ser Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr	
850 855 860	
aac cag gca gct tct gac tct ggc tct tgt ggc cat gtt cca gta tcc	2643
Asn Gln Ala Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser	
865 870 875	
cca aaa gcc cca agt atg ctg gga cta atg acc tca cct gaa aat gta	2691
Pro Lys Ala Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val	
880 885 890	
cta aag gca cta gaa aaa aac tac atg aac tcc ctg gga gaa atc cca	2739
Leu Lys Ala Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro	
895 900 905	
gct gga gaa aca agt ttg aat tat gtg tcc cag ttg gct tca ccc atg	2787
Ala Gly Glu Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met	
910 915 920 925	

ES 2 579 758 T3

ttt gga gac aag gac agt ctc cca aca aac cca gta gag gca cca cac	2835
Phe Gly Asp Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His	
930 935 940	
tgt tca gag tat aaa atg caa atg gca gtc tcc ctg cgt ctt gcc ttg	2883
Cys Ser Glu Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu	
945 950 955	
cct ccc ccg acc gag aat agc agc ctc tcc tca att acc ctt tta gat	2931
Pro Pro Pro Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp	
960 965 970	
cca ggt gaa cac tac tgc taaccagcac tcgag	2964
Pro Gly Glu His Tyr Cys	
975	

<210> 12
 <211> 979
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

5

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

ES 2 579 758 T3

		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> 13
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 13

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

10

<210> 14
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 14

ES 2 579 758 T3

```

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

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

```

5 <210> 15
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

```

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

```

10 <210> 16
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

ES 2 579 758 T3

```

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

```

<210> 17
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 17

```

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

```

10

<210> 18
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 18

ES 2 579 758 T3

```

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

```

<210> 19
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

```

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

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

```

10

<210> 20
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 20

ES 2 579 758 T3

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

5 <210> 21
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

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

10 <210> 22
 <211> 133
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 22

ES 2 579 758 T3

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

<210> 23
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 23

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

10

<210> 24
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 24

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

ES 2 579 758 T3

```

      50              55              60
Val Lys Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg
65              70              75              80
Trp Leu Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser
              85              90              95
Val Pro Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu
              100              105              110
Thr Val Leu Lys Gln Phe Ser Asn Ser Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys
              115              120              125
Asp Asn Thr Thr Cys
130

```

5 <210> 25
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 25

```

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

```

10
 <210> 26
 <211> 134
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 26

```

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

```

ES 2 579 758 T3

5 <210> 27
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 27

```

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

10 <210> 28
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 28

```

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

20 <210> 29
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 29

ES 2 579 758 T3

```

Met Ala Pro Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu
 1          5          10          15
Lys Gln Glu Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala
          20          25          30
Ser Gly Met Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu

          35          40          45
Asp Arg Glu Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu
 50          55          60
Lys Val Lys Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile
 65          70          75          80
Arg Trp Leu Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile
          85          90          95
Ser Val Pro Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val
          100          105          110
Leu Thr Val Leu Lys Gln Phe Ser Asn Ser Met Ala Glu Leu Gln Ala
          115          120          125
Lys Asp Asn Thr Thr Cys
          130

```

5 <210> 30
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 30

```

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

```

10 <210> 31
 <211> 516
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

```

atggcctctc actcaggccc ctcgacgtct gtgctctttc tgttctgctg cctgggaggc 60
tggctggcct cccacacggt gcccgctccgt ttactacgac caagtgatga tgtacagaaa 120
atagtcgagg aattacagtc cctctcgaag atgcttttga aagatgtgga ggaagagaag 180
ggcgtgctcg tgtcccagaa ttacacgctg ccgtgtctca gccctgacgc ccagccgcca 240
aacaacatcc acagcccagc catccgggca tatctcaaga caatcagaca gctagacaac 300
aatctgttta ttgatgagat catagagcac ctgcacaaac tcatatttca agatgcacca 360
gaaacaaaca tttctgtgcc aacagacacc catgaatgta aacgcttcat cctgactatt 420
tctcaacagt ttccagagtg catggacctc gcactaaaat cattgacctc tggagcccaa 480
caggccacca ctgaagaata catgccgatg gaataa 516

```

ES 2 579 758 T3

<210> 32
 <211> 49
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41607

 10 <400> 32
 tccaggaat tcatataggc cggccacat ggcctctcac tcaggcccc 49

 <210> 33
 <211> 82
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41605
 20 <400> 33

 caaccccaga gctgttttaa ggcgcgcctc tagattatta ttccatcggc atgtattcctt 60
 cagtggtagc ctgttgggct cc 82

 25 <210> 34
 <211> 513
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 30 <400> 34

 atgatcttcc acacaggaac aacgaagcct accctgggtgc tgctttgctg tataggaacc 60
 tggtggcca cctgcagctt gtccttcggt gccccaatat cgaaggaaga cttagaact 120
 acaattgacc tcttgaaaca agagtctcag gatctttata acaactatag cataaagcag 180
 gcactctggga tgtcagcaga cgaatcaata cagctgccgt gtttcagcct ggaccgggaa 240
 gcattaacca acatctcggc catcatagca catctggaga aagtcaaagt gttgagcgag 300
 aacacagtag atacttcttg ggtgataaga tggctaacaa acatcagctg tttcaacca 360
 ctgaatttaa acatttctgt gcctggaaat actgatgaat cctatgattg taaagtgttc 420
 gtgcttacgg ttttaagca gttctcaaac tgcattggcag aactgcaggc taaggacaat 480
 actacatgcg aagaatacat gccgatggaa tga 513

 35 <210> 35
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41643

 40 <400> 35
 tccaggaat tcatataggc cggccacat gatctccac acaggaaca 49

 45 <210> 36
 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC41641

 <400> 36

ES 2 579 758 T3

caaccccaga gctgttttaa ggcgcgctc tagattatca ttccatcggc atgtattctt 60
cgcatgtagt attgtcctta gcctg 85

5 <210> 37
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC43156
<400> 37

ctagaaataa ttttgtttaa cttaagaag gagatatata tatgttgccc gtccgtttac 60
tacgac 66

15 <210> 38
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC45307

25 <400> 38
tgagaaatag tcaggatgaa gcgttagat tcatgggtgt ctgtggcac 50

30 <210> 39
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC43137

35 <400> 39
tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcacc cgccaaaaca ttaagtgggtg gcctgttggg 60
ctcc 64

40 <210> 40
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC45306

45 <400> 40
gtgccaacag acacccatga atctaaacgc ttcacctga ctatttctca 50

50 <210> 41
<211> 420
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 41

ES 2 579 758 T3

atgttgcccg tccgtttact acgaccaagt gatgatgtac agaaaatagt cgaggaatta 60
 cagtccctct cgaagatgct tttgaaagat gtggaggaag agaagggcgt gctcgtgtcc 120
 cagaattaca cgctgccgtg tctcagcctt gacgccagc cgccaaacaa catccacagc 180
 ccagccatcc gggcatatct caagacaatc agacagctag acaacaaatc tgttattgat 240
 gagatcatag agcacctcga caaactcata tttcaagatg caccagaaac aacattttct 300
 gtgccaacag acacccatga atctaaacgc ttcctcctga ctattttctca acagttttca 360
 gagtgcatgg acctcgcact aaaatcattg acctctggag cccaacagge caccacttaa 420

<210> 42
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 42

Met Leu Pro Val Arg Leu Leu Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile
 1 5 10 15
 Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu
 20 25 30
 Glu Glu Lys Gly Val Leu Val Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu
 35 40 45

 Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg
 50 55 60
 Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Ile Glu His Leu Asp Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu
 85 90 95
 Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr Asp Thr His Glu Ser Lys Arg Phe Ile
 100 105 110
 Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys
 115 120 125
 Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln Gln Ala Thr Thr
 130 135

10

<210> 43
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC43883

20

<400> 43

tagaaataat tttgtttaac ttttaagaagg agatatatat atggccccaa tatcgaagga 60
 agacttaa 68

25

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

30

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC45302

<400> 44
 tttaaaaccg taagcacgaa cacttagaa tcataggatt catcagttatt 50

35

<210> 45
 <211> 64

ES 2 579 758 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC43875

<400> 45

tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcacc cgccaaaact cagcatgtag tattgtcctt 60
agcc 64

10 <210> 46
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC45303

20 <400> 46
aatactgatg aatcctatga ttctaaagtg ttcgtgctta cggttttaa 50

25 <210> 47
<211> 405
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 47

atggcccaa tatcgaagga agacttaaga actacaattg acctcttgaa acaagagtct 60
caggatcttt ataacaacta tagcataaag caggcatctg ggatgtcagc agacgaatca 120
atacagctgc cgtggttcag cctggaccgg gaagcattaa ccaacatctc ggatcgcata 180
gcacatctgg agaaagtcaa agtggttgagc gagaacacag tagatacttc ttgggtgata 240
agatggctaa caaacatcag ctggttcaac ccaactgaatt taaacatttc tgtgcctgga 300
aatactgatg aatcctatga ttctaaagtg ttcgtgctta cggttttaa gcaagtctca 360
aactgcatgg cagaactgca ggctaaggac aatactacat gctga 405

30 <210> 48
<211> 134
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35 <400> 48

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

ES 2 579 758 T3

<210> 49
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 49

```

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

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 18, 23, 28 y resto 2 a resto 133 de SEQ ID NO: 23.
2. Un polipéptido aislado según la reivindicación 1, que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 18, 23, 28 y resto 2 a resto 133 de SEQ ID NO: 23.
- 10 3. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es pro-inflamatorio.
4. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 15 o 18.
5. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 23 o 28.
- 15 6. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente ligados:
un promotor de la transcripción;
un segmento de ADN que codifica un polipéptido de cualquier reivindicación anterior; y
un terminador de la transcripción.
- 20 7. Una célula cultivada en la que se ha introducido un vector de expresión de la reivindicación 6, en donde la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN.
- 25 8. La célula cultivada según la reivindicación 7, en donde la célula cultivada es una célula procariota.
9. La célula cultivada según la reivindicación 8, en donde la célula es una célula Gram-negativa, preferentemente en donde la célula es *E. coli*, más preferentemente en donde la célula de *E. coli* es la cepa W3110 de *E. coli*.
- 30 10. Un proceso de producción de un polipéptido que comprende:
cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión de la reivindicación 6, en donde la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN; y
recuperar el polipéptido expresado.
- 35 11. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se unen específicamente a un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 40 12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo humanizado derivado de un anticuerpo monoclonal murino, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo neutralizante y un anticuerpo monoclonal humano.
13. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 11, en donde el fragmento de anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en F(ab'), F(ab), Fab', Fab, Fv, scFv y unidad mínima de reconocimiento.
- 45 14. Un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo de la reivindicación 11.
15. Una formulación que comprende:
un polipéptido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-5; y
50 un vehículo farmacéuticamente aceptable.
16. Un kit que comprende la formulación de la reivindicación 15.