

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 002**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2001 PCT/US2001/20484**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2002 WO0200721**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2001 E 01952259 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 1325115**

54 Título: **Receptor ZCYTOR17 de citocina**

30 Prioridad:

26.06.2000 US 214282 P

29.06.2000 US 214955 P

08.02.2001 US 267963 P

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

05.12.2016

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)
Route 206 & Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**SPRECHER, CINDY, A.;
PRESNELL, SCOTT, R.;
GAO, ZEREN;
WHITMORE, THEODORE, E.;
KUIJPER, JOSEPH, L. y
MAURER, MARK, F.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 593 002 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

Receptor ZCYTOR17 de citocina

5 Las hormonas y los factores de crecimiento polipeptídicos controlan la proliferación y diferenciación de las células de los organismos multicelulares. Estas moléculas difusibles permiten a las células comunicarse entre sí y actuar al unísono para formar células y órganos y reparar tejidos dañados. Entre los ejemplos de hormonas y factores de crecimiento se incluyen las hormonas esteroideas (por ejemplo, estrógeno, testosterona), la hormona paratiroidea, la hormona estimuladora de folículos, las interleucinas, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), la eritropoyetina (EPO) y la calcitonina.

15 Las hormonas y los factores de crecimiento influyen en el metabolismo celular uniéndose a receptores. Los receptores pueden ser proteínas de membrana integral que están relacionadas con rutas de señalización dentro de la célula, tales como sistemas mensajeros secundarios. Otras clases de receptores son moléculas solubles, tales como factores de transcripción. Son de particular interés los receptores de citocinas, moléculas que promueven la proliferación y/o diferenciación de las células. Los ejemplos de citocinas incluyen la eritropoyetina (EPO), que estimula el desarrollo de los eritrocitos; la trombopoyetina (TPO), que estimula el desarrollo de células de linaje megacariocítico; y el factor estimulador de colonias de granulocitos (GCSF), que estimula el desarrollo de neutrófilos.

20 Estas citocinas son útiles en el restablecimiento de los niveles normales de las células sanguíneas en pacientes que padecen anemia, trombocitopenia y neutropenia o que reciben quimioterapia para el cáncer. El documento EP-A-1188830 describe el receptor de hemopoyetina NR10, implicado en la regulación de la hematopoyesis del sistema inmunitario *in vivo*, y usos del mismo, en la exploración de nuevos factores hematopoyéticos, o para el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de enfermedades del sistema

25 inmunitario/hematopoyético. Las actividades de estas citocinas, demostradas *in vivo*, ilustran el enorme potencial clínico y la necesidad de otras citocinas, agonistas de citocinas y antagonistas de citocinas. La presente invención aborda estas necesidades proporcionando un nuevo receptor de citocina hematopoyético, así como composiciones y métodos relacionados.

30 Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido se selecciona del grupo de:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 (Met) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

35 (b) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

(c) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 544 (Lys) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

(d) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1-239 de SEQ ID NO: 22;

40 (e) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 227 (Pro) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

(f) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 (Met) a 649 (Ile) como se muestra en la SEQ ID NO: 46; y

(g) una secuencia de aminoácidos que consiste los restos de aminoácidos 1-324 de SEQ ID NO: 18.

45 La Figura 1 es un alineamiento múltiple de las secuencias polinucleotídicas de zcytor17 SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 22.

50 En un aspecto, la presente memoria descriptiva describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 227 (pro); (b) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 519 (Glu); (c) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 543 (Leu); (d) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 de número de aminoácido 544 (Lys) al número de aminoácido 732 (Val); (e) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 46 del número de aminoácido 544 (Lys) al número de aminoácido 649 (Ile); (f) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 732 (Val); (g) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 649 (Ile); (h) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SE ID NO: 2 del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 732 (Val); e (i) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 46 del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 649 (He). La presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que consiste en: la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 227 (Pro); o la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 46 del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 649 (Ile); o que comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada de: la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 544 (Lys) al número de aminoácido

732 (Val); la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 732 (Val); y la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 732 (Val).

5 En otra realización, el polinucleótido aislado desvelado anteriormente consiste en una secuencia seleccionada de: un polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del número de nucleótido 228 al número de aminoácido 851; un polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 45 de número de nucleótido 162 al número de aminoácido 2108; y una secuencia de polinucleótidos complementaria a estas secuencias; o que comprende una secuencia seleccionada de: un polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del número de nucleótido 1800 al número
10 de aminoácido 2366; un polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del número de nucleótido 228 al número de aminoácido 2366; un polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del número de nucleótido 171 al número de aminoácido 2366; y una secuencia de polinucleótidos complementaria a estas secuencias. En otro aspecto el polinucleótido aislado desvelado anteriormente codifica un polipéptido que adicionalmente comprende un dominio transmembrana que consiste en los restos 520 (Ile) a 543 (Leu) de SEQ ID NO: 2. En otro aspecto el
15 polinucleótido aislado desvelado anteriormente codifica un polipéptido que comprende adicionalmente un dominio intracelular que consiste en los restos 544 (Lys) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2 o 544 (Lys) a 649 (Ile) de SEQ ID NO: 46. La memoria descriptiva proporciona adicionalmente que el polinucleótido aislado desvelado anteriormente codifica un polipéptido que tiene actividad medida mediante proliferación celular, activación de transcripción de un gen indicador, o en el que el polipéptido codificado por el nucleótido se une adicionalmente a un anticuerpo, en el
20 que el anticuerpo se suscita contra un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en: (a) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 20 (Ala) a 227 (Pro) de SEQ ID NO: 2; (b) el polipéptido que comprende el número de aminoácido (Ala) a 519 (Glu) de SEQ ID NO: 2; (c) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 20 (Ala) a 543 (Leu) de SEQ ID NO: 2; (d) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 544 (Lys) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2; (e) el polipéptido que comprende el número de
25 aminoácido 544 (Lys) a 649 (Ile) de SEQ ID NO: 4; (f) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 20 (Ala) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2; (g) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 20 (Ala) a 649 (Ile) de SEQ ID NO: 46; (h) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 1 (Met) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2; e (i) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 1 (Met) a 649 (Ile) de SEQ ID NO: 46, y en el que la unión del anticuerpo con el polipéptido aislado se mide mediante un ensayo biológico o bioquímico que incluye radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, transferencia de Western, o ensayo de inmunoabsorbancia ligado a
30 enzimas.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: un promotor de la transcripción; un segmento de ADN que codifica un polipéptido;
35 y un terminador de la transcripción, en el que el promotor está unido operativamente al segmento de ADN, y el segmento de ADN está unido operativamente al terminador de la transcripción; y en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado se selecciona del grupo que consiste en: (i) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2; (ii) una secuencia de aminoácidos que consiste o que comprende los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 732 (Val) como se
40 muestra en la SEQ ID NO: 2; y (iii) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 227 (Pro) como se muestra en la SEQ ID NO: 2. En una realización del vector de expresión desvelado anteriormente, el polipéptido codificado es como se define en (i) o (ii), y el vector de expresión comprende adicionalmente una secuencia señal secretora unida operativamente al segmento de ADN.

45 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una célula cultivada que comprende un vector de expresión como se desvela anteriormente, en el que la célula expresa un polipéptido codificado por el segmento de ADN. En un aspecto de la divulgación, el vector de expresión desvelado anteriormente comprende adicionalmente un dominio transmembrana que consta de los restos 520 (Ile) a 543 (Leu) de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto de la divulgación, el vector de expresión desvelado anteriormente comprende adicionalmente un dominio intracelular que
50 consiste en los restos 544 (Lys) a 732 (Val) de la SEQ ID NO: 2, o en los restos 544 (Lys) a 649 (Ile) de la SEQ ID NO: 46.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula cultivada en la que se ha introducido un vector de expresión como se define en las reivindicaciones, en el que la célula expresa un polipéptido de receptor soluble
55 codificado por el segmento de ADN.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión, comprendiendo la construcción de ADN: (i) un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido se selecciona del grupo de: (a) una secuencia de aminoácidos que
60 comprende los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2; (b) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 544 (Lys) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2; (c) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 732 (Val) como se muestra en la SQE ID NO: 2; y (d) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 227 (Pro) como se muestra en la SEQ ID NO: 2; y (ii) al menos otro segmento de ADN que codifica un
65 polipéptido adicional, en el que el polipéptido adicional es una proteína heteróloga seleccionada de: (a) una región o dominio de otra proteína de la familia de receptores de citocina; (b) un péptido señal secretor no nativo y/o no

relacionado que facilita la secreción de la proteína de fusión; y (c) una etiqueta de afinidad seleccionada de una proteína de unión a maltosa o un dominio de inmunoglobulina; en el que el primer y otros segmentos de ADN se conectan en fase; y en el que el primer y otros segmentos de ADN codifican la proteína de fusión.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: un promotor de la transcripción; una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión como se define en las reivindicaciones; y un terminador de la transcripción, en el que el promotor está unido operativamente a la construcción de ADN, y la construcción de ADN está unida operativamente al terminador de la transcripción.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula cultivada que comprende un vector de expresión como se define en las reivindicaciones, en el que la célula expresa un polipéptido codificado por la construcción de ADN.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de una proteína de fusión que comprende: cultivar una célula como se desvela anteriormente; y aislar el polipéptido producido por la célula.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 227 (Pro); (b) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 519 (Glu); (c) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 543 (Leu); (d) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 544 (Lys) al número de aminoácido 732 (Val); (e) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 46 del número de aminoácido 544 (Lys) al número de aminoácido 649 (Ile); (f) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 732 (Val); (g) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 649 (Ile); (h) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 732 (Val); e (i) la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 46 del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 649 (He).

La presente invención proporciona un polipéptido aislado que consiste en: la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 227 (Pro) o la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 46 del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 649 (Ile); o que comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada de: la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 544 (Lys) al número de aminoácido 732 (Val); la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 732 (Val); y la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 1 (Met) al número de aminoácido 732 (Val). En otro aspecto el polipéptido aislado desvelado anteriormente comprende adicionalmente un dominio transmembrana que consiste en los restos 520 (Ile) a 543 (Leu) de SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, el polipéptido aislado desvelado anteriormente comprende adicionalmente un dominio intracelular que consiste en los restos 544 (Lys) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2 o 544 (Lys) a 649 (He) de SEQ ID NO: 46. La memoria descriptiva proporciona adicionalmente que el polipéptido aislado desvelado anteriormente tenga actividad como se mide mediante proliferación celular, activación de transcripción de un gen indicador, o en el que el polipéptido codificado por el polinucleótido se une adicionalmente a un anticuerpo, en el que el anticuerpo se suscita contra un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en: (a) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 20 (Ala) a 227 (Pro) de SEQ ID NO: 2; (b) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 20 (Ala) a 519 (Glu) de SEQ ID NO: 2; (c) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 20 (Ala) a 543 (Leu) de SEQ ID NO: 2; (d) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 544 (Lys) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2; (e) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 544 (Lys) a 649 (He) de SEQ ID NO: 46; (f) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 20 (Ala) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2; (g) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 20 (Ala) a 649 (He) de SEQ ID NO: 46; (h) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 1 (Met) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2; e (i) el polipéptido que comprende el número de aminoácido 1 (Met) a 649 (Ile) de SEQ ID NO: 46, y en el que la unión del anticuerpo con el polipéptido aislado se divide mediante un ensayo biológico o bioquímico incluyendo radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, transferencia de Western o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de un polipéptido de zcytor17 que comprende: cultivar una célula como se desvela anteriormente; y aislar el polipéptido zcytor17 producido por la célula.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que consiste en: la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 227 (Pro); o la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 18, o que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 22; en el que el polipéptido carece sustancialmente de dominios

transmembrana en intracelulares habitualmente asociados con receptores hematopoyéticos. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de un polipéptido de zcytor17 que comprende: cultivar una célula como se desvela anteriormente; y aislar el polipéptido de zcytor17 producido por la célula. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de un anticuerpo contra un polipéptido de zcytor17 que comprende: inocular a un animal con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: un polipéptido que comprende los aminoácidos en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 732 (Val); un polipéptido que consiste en el número de aminoácido 20 (Ala) a 227 (Pro) de SEQ ID NO: 2; un polipéptido que comprende el número de aminoácido 544 (Lys) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2; un polipéptido que comprende el número de aminoácido 20 (Ala) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2; un polipéptido que comprende el número de aminoácido 1 (Met) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2; y un polipéptido que consiste en el número de aminoácido 1 (Met) a 649 (Ile) de SEQ ID NO: 46; y en el que el polipéptido suscita una respuesta inmunitaria en el animal para producir el anticuerpo; y aislar el anticuerpo del animal. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo producido por el método como se ha desvelado anteriormente, que se une específicamente a un polipéptido de zcytor17. En un aspecto el anticuerpo desvelado anteriormente es un anticuerpo monoclonal.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido como se desvela anteriormente. En una realización, el anticuerpo desvelado anteriormente se une a un polipéptido como se desvela anteriormente.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de detección, en una muestra de ensayo, de la presencia de un modulador de la actividad de la proteína zcytor17 que comprende: cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión como se desvela anteriormente, en el que la célula expresa la proteína codificada por el segmento de ADN en presencia y en la ausencia de una muestra de ensayo; y comparar los niveles de actividad de la proteína en presencia y en ausencia de una muestra de ensayo, mediante un ensayo biológico o bioquímico; y determinar, a partir de la comparación, la presencia de modulador de la actividad de proteína en la muestra de ensayo, como se indica en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar un ligando del receptor zcytor17 en una muestra de ensayo, que comprende: poner en contacto una muestra de ensayo con un polipéptido del grupo que consiste en: la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 227 (Pro); o la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 18; o poner en concepto una muestra de ensayo con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 22; y detectar en la muestra la unión del polipéptido con un ligando. En una realización se proporciona el método desvelado anteriormente en el que el polipéptido está unido a la membrana en una célula cultivada; y la etapa de detección comprende medir una respuesta biológica en la célula cultivada. En otra realización se proporciona el método desvelado anteriormente en el que la respuesta biológica es proliferación celular o activación de la transcripción de un gen indicador.

Antes de exponer con detalle la invención, puede ser de ayuda entender la misma para definir las siguientes expresiones:

La expresión "etiqueta de afinidad" se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que puede unirse a un segundo polipéptido para proporcionar la purificación o la detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para que el segundo polipéptido se una a un sustrato. En principio, como etiqueta de afinidad puede usarse cualquier péptido o proteína, para lo cual esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico. Las etiquetas de afinidad incluyen un segmento de polihistidina, 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), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:795220 4, 1985), sustancia P, péptido Flag™ (Hopp *et al.*, Biotechnology 6:1204-10, 1988), péptido de unión estreptavidina, u otro epítipo o dominio de unión antigénico. Véase, en líneas generales, Ford *et al.*, Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991. Los ADN que codifican etiquetas de afinidad se encuentran disponibles en proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

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

Las expresiones "amino terminal" y "carboxilo terminal" se usan en el presente documento para indicar posiciones en los polipéptidos. Cuando el contexto lo permita, estas expresiones se usan con referencia a una secuencia o porción particular de un polipéptido para indicar posición de proximidad o relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia en posición carboxilo terminal con respecto a una secuencia de referencia en un polipéptido, se localiza cerca del extremo carboxilo de la secuencia de referencia, aunque no necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

La expresión “par de complemento/anticomplemento” significa fracciones no idénticas que forman un par estable, asociado de manera no covalente, en condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o la estreptavidina) son miembros prototípicos de un par de complemento/anticomplemento. Otros pares a modo de ejemplos de complemento/anticomplemento incluyen pares de receptor/ligando, pares de anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos en sentido/antisentido y similares. Cuando se desea la disociación posterior del par de complemento/anticomplemento, dicho par tiene, preferentemente, una afinidad de unión de $<10^9$ M⁻¹.

La expresión “complementos de una molécula polinucleotídica” es una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de bases complementarias y una orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACG- GG 3' es complementaria a 5' CCCGTGCAT 3'.

El término “cóntigo” indica un polinucleótido que tiene un tramo contiguo de secuencia idéntico o complementario a otro polinucleótido. Se dice que las secuencias contiguas “solapan” con un segmento determinado de una secuencia polinucleotídica, bien en su totalidad o a lo largo de un segmento parcial del polinucleótido. Por ejemplo, cóntigos representativos con respecto a la secuencia de polinucleótidos 5'-ATGGCTTAGCTT-3' son 5'-TAGCTTgagtct-3' y 3'-gtcgacTACCGA-5'.

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

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

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

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

La expresión “unidos operativamente”, cuando se refiere a segmentos de ADN, indica que los segmentos se disponen de tal manera que actúan al unisono para sus fines esperados, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y prosigue a través del segmento codificante hacia el terminador.

El término “ortólogo” indica un polipéptido o una proteína que se obtiene de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la evolución de las especies.

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

Un “polinucleótido” es un polímero mono o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas desde el extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro*, o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviadas como “pb”) nucleótidos (“nt”) o kilobases (“kb”). Cuando el contexto lo permita, estos dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que son mono o bicatenarios. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, este se usa para indicar longitud completa y se entenderá que es equivalente a la expresión “pares de bases”. Los expertos en la técnica reconocerán que dos

cadena de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en cuanto a la longitud y que los extremos de las mismas pueden escalonarse como resultado de la escisión enzimática; por tanto, todos los nucleótidos en una molécula polinucleotídica bicatenaria pueden no estar emparejados.

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

10 Las "sondas y/o cebadores", como se usan en el presente documento, pueden ser ARN o ADN. El ADN puede ser ADNc o ADN genómico. Las sondas y cebadores polinucleotídicos(os) son ADN o ARN mono o bicatenario, generalmente oligonucleótidos sintéticos, pero pueden generarse a partir de secuencias de ADNc o genómico clonadas o de sus complementos. Las sondas analíticas generalmente tendrán una longitud de al menos 20 nucleótidos, aunque pueden usarse sondas algo más cortas (14-17 nucleótidos). Los cebadores de la PCR tienen una longitud de al menos 5 nucleótidos, preferentemente de 15 o más nt, más preferentemente de 20-30 nt. Cuando el objetivo es analizar una región pequeña del gen pueden usarse polinucleótidos cortos. Para un análisis global de genes, una sonda polinucleotídica puede comprender un exón completo o más. Las sondas pueden marcarse para proporcionar una señal detectable, tal como con una enzima, biotina, un radionúclido, un fluoróforo, un quimioluminiscente, una partícula paramagnética y similar, que se encuentran disponibles en el comercio de muchas fuentes, tal como Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, y Amersham Corp., Arlington Heights, IL, usando técnicas que son muy conocidas en la materia.

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

30 Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos de hidratos de carbono. Los hidratos de carbono y otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína mediante la célula en la que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. En el presente documento, las proteínas se definen en términos de sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; los sustituyentes, tales como grupos de hidratos de carbono, generalmente no están especificados, aunque no obstante pueden estar presentes.

35 El término "receptor" se usa en el presente documento para indicar una proteína asociada a célula, o una subunidad polipeptídica de dicha proteína, que se une a una molécula bioactiva (el "ligando") y actúa como mediador del efecto del ligando sobre la célula. La unión del ligando con el receptor produce un cambio conformacional en el receptor (y, en algunos casos, la multimerización del receptor, es decir, la asociación de subunidades receptoras idénticas o diferentes) que causa interacciones entre el dominio (o dominios) efector y otra molécula (o moléculas) en la célula. Estas interacciones a su vez conducen a alteraciones en el metabolismo de la célula. Los eventos metabólicos que están relacionados con las interacciones de tipo receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, proliferación celular, aumento en la producción de AMP cíclico, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. Los receptores de citocina en la superficie celular se caracterizan por una estructura multidominio como se expone con más detalle más adelante. Estos receptores están anclados en la membrana celular mediante un dominio transmembrana caracterizado por una secuencia de restos de aminoácidos hidrófobos (normalmente de aproximadamente 21-25 restos), que está normalmente flanqueada por restos cargados positivamente (Lys o Arg). En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana, pueden ser receptores citosólicos o nucleares; monoméricos (por ejemplo, receptor de hormona estimuladora del tiroides, receptor beta-adrenérgico) o multiméricos (por ejemplo, receptor de PDGF, receptor de la hormona del crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6). La expresión "polipéptido receptor" se usa para indicar cadenas polipeptídicas receptoras completas y partes de las mismas, incluyendo dominios funcionales aislados (por ejemplo, dominios de unión a ligando).

55 Una "secuencia señal secretora" es una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como un componente de un polipéptido más largo, dirige el polipéptido más largo a través de una ruta secretora de una célula en la que esta se sintetiza. El péptido más largo se escinde habitualmente para retirar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

60 Un "receptor soluble" es un polipéptido receptor que no está unido a una membrana celular. Los receptores solubles son más habitualmente polipéptidos receptores de unión a ligando que carecen de dominios transmembrana y citoplasmáticos. Los receptores solubles pueden comprender restos de aminoácidos adicionales, tales como etiquetas de afinidad que permiten la purificación del polipéptido o proporcionan sitios para la unión del polipéptido con un sustrato, o secuencias de región constante de inmunoglobulina. Muchos receptores de superficie celular tienen homólogos solubles, de origen natural, que se producen mediante proteólisis. Se dice que los polipéptidos receptores solubles carecen sustancialmente de segmentos polipeptídicos transmembrana e intracelulares cuando carecen de partes suficientes de estos segmentos para proporcionar anclaje en la membrana o transducción de

señales, respectivamente.

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

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

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de una nueva secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene la estructura de un receptor de citocina de clase I. La secuencia de aminoácidos deducida indicó que el receptor codificado pertenecía a la subfamilia de receptores que incluye gpl30, LIF, IL-12, el receptor de oncostatina M (OSM-R), los receptores de WSX-1 (Sprecher CA *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 246:81-90 (1998), DCRS2 (Publicación WIPO No. WO00/73451), el receptor de IL-2 (subunidad β y el receptor común β (es decir, subunidades β del receptor de IL3, 1L-5 y GM-CSF). El polipéptido se ha denominado zcytor17. La secuencia de polinucleótidos de zcytor17 codifica toda la secuencia codificante de la proteína predicha. Zcytor17 es un nuevo receptor de citocina que puede estar implicado en regulación inmunitaria, en una ruta celular apoptótica, como una molécula de señalización de célula a célula, receptor de factor de crecimiento, o proteína asociada a la matriz extracelular con actividad de hormona de factor de crecimiento, o similar.

La secuencia del polipéptido de zcytor17 se dedujo a partir de ADN genómico, así como de clones identificados que contenían su secuencia de polinucleótidos correspondiente. Los clones se obtuvieron de una biblioteca de próstata. Otras bibliotecas que también podrían estudiarse para dichas secuencias incluyen líneas celulares de PBL, testículos, monocitos, timo, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, eritroleucemia humana, pulmón (por ejemplo, células WI-38) y leucemia monocítica aguda, otras líneas celulares linfoides y hematopoyéticas y similares.

Las secuencias nucleotídicas de ADN representativas que codifican zcytor17 se describen en la SEQ ID NO: 1 (del nucleótido 171 al 2366), con su secuencia deducida de 732 aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 45 (del nucleótido 162 al 2108), con su secuencia deducida de 649 aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 46; y en la SEQ ID NO: 53 (del nucleótido 497 al 2482), con su secuencia deducida de 662 aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 54. En su totalidad, el polipéptido de zcytor17 (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 54) representa un segmento polipeptídico de longitud completa (del resto 1 (Met) al resto 732 (Val) de la SEQ ID NO: 2; del resto 1 (Met) al resto 649 (Ile) de la SEQ ID NO: 46; del resto 1 (Met) al resto 662 (Ile) de la SEQ ID NO: 54). Adicionalmente, más adelante se describen los dominios y las características estructurales de los polipéptidos de zcytor17.

El análisis del polipéptido de zcytor17 codificado por la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 1, reveló una fase de lectura abierta que codificaba 732 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que comprendía un péptido señal secretor predicho de 19 restos de aminoácidos (resto 1 (Met) al resto 19 (Ala) de SEQ ID NO: 2) y un polipéptido maduro de 713 aminoácidos (del resto 20 (Ala) al resto 732 (Val) de SEQ ID NO: 2). El análisis del polipéptido de zcytor17 codificado por la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 45 reveló una fase de lectura abierta que codificaba 649 aminoácidos (SEQ ID NO: 46) que comprendía un péptido señal secretor predicho de 19 restos de aminoácidos (del resto 1 (Met) al resto 19 (Ala) de SEQ ID NO: 46) y un polipéptido maduro de 630 aminoácidos (del resto 20 (Ala) al resto 649 (Ile) de SEQ ID NO: 46). El análisis del polipéptido de zcytor17 codificado por la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 53 reveló una fase de lectura abierta que codificaba 662 aminoácidos (SEQ ID NO: 54) que comprendía un péptido señal secretor predicho de 32 restos de aminoácidos (del resto 1 (Met) al resto 32 (Ala) de SEQ ID NO: 54), y un polipéptido maduro de 630 aminoácidos (del resto 33 (Ala) al resto 662 (Ile) de SEQ ID NO: 54). Además del motivo WSXWS (SEQ ID NO: 3) (correspondiente a los restos 211 a 215 de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; y a los restos 224 a 228 de SEQ ID NO: 54), el receptor comprende un dominio extracelular (restos 20 (Ala) a 519 (Glu) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; restos 33 (Ala) a 532 (Glu) de SEQ ID NO: 54) que incluye un dominio de unión a citocina de aproximadamente 200 restos de aminoácidos (restos 20 (Ala) a 227 (Pro) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; restos 33 (Ala) a 240 (Pro) de SEQ ID NO: 54); un enlazador de dominio (restos 122 (Thr) a 125 (Pro) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; restos 135 (Thr) a 138 (Pro) de SEQ ID NO: 2); una región de penúltima cadena (restos 194 (Phe) a 202 (Arg) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; restos 207 (Phe) a 215 (Arg) de SEQ ID NO: 54); un dominio de fibronectina de tipo III (restos 228 (Cys) a 519 (Glu) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; restos 241 (Cys) a 532 (Glu) de SEQ ID NO: 54); un dominio transmembrana (restos 520 (Ile) a 543 (Leu) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; restos 533 (Ile) a 556 (Leu) de SEQ ID NO: 54); dominio de señalización intracelular completo (restos 544 (Lys) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2; restos 544 (Lys) a 649 (Ile) de SEQ ID NO: 46; y restos 557 (Lys) a 662 (Ile) de SEQ ID NO: 54) que contiene un sitio de señalización de "Caja I" (restos 554 (Trp) a 560 (Pro) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; restos 567 (Trp) a 573 (Pro) de SEQ ID NO: 54) y un sitio de señalización de "Caja II" (restos 617 (Gln) a 620 (Phe) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; restos 630 (Gln) a 633 (Phe) de SEQ ID NO: 54). Los expertos en la técnica reconocerán que estos límites de dominio son aproximados, y que se basan en

alineamientos con proteínas conocidas y predicciones de plegamiento de proteínas. Además de estos dominios, las características de receptor conservadas en el receptor codificado incluyen (como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46) un resto de Cys conservado en la posición 30 (posición 43 como se observa en la SEQ ID NO: 54), un motivo CXW (en el que X es cualquier aminoácido) en las posiciones 40-42 (posiciones 53-55 como se muestra en la SEQ ID NO: 54), resto de Trp en la posición 170 (posición 183 como se muestra en la SEQ ID NO: 54), y un resto de Arg conservado en la posición 202 (posición 215 como se muestra en la SEQ ID NO: 54). Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, dominios, motivos, restos y secuencias del polipéptido de zcytor17, descritos anteriormente, son como se muestran en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 53.

Además, parecen expresarse de manera natural, formas truncadas del polipéptido de zcytor17. Ambas formas codifican receptores zcytor17 solubles. Un polinucleótido que codifica una "forma larga" del receptor zcytor17 soluble, truncado en el dominio de fibronectina de tipo III, se muestra en la SEQ ID NO: 17 y el polipéptido correspondiente se muestra en la SEQ ID NO: 18. Esta forma truncada codifica los restos 1 (Met) a 324 (Lys) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46), y por tanto comprende una secuencia señal intacta, un motivo WSXWS (SEQ ID NO: 3), un enlazador, un dominio de unión a citocina, una penúltima cadena, una Cys conservada, un motivo CXW y restos Trp y Arg como se describe anteriormente. Un polinucleótido que codifica una "forma corta" del receptor zcytor17 soluble, truncado en el extremo del dominio de unión a citocina se muestra en la SEQ ID NO: 21 y el polipéptido correspondiente se muestra en la SEQ ID NO: 22. Esta forma truncada codifica un polipéptido de 239 restos que es idéntico en los restos 1 (Met) a 225 (Glu) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46 y después diverge, y comprende por tanto una secuencia señal intacta, un motivo WSXWS (SEQ ID NO: 3) un enlazador, un dominio de unión a citocina, una penúltima cadena, una Cys conservada, un motivo CXW y restos Trp y Arg como se describe anteriormente. En la figura 1 se muestra un alineamiento múltiple de las formas truncadas en comparación con las formas de longitud completa de zcytor17.

Adicionalmente, el ADNc de zcytor17 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 21 codifica polipéptidos que pueden usar una metionina iniciadora alternativa (en el nucleótido 75 de SEQ ID NO: 1, en el nucleótido 66 de SEQ ID NO: 45, en el nucleótido 66 de SEQ ID NO: 17 y en el nucleótido 66 de SEQ ID NO: 21) que codifique un polipéptido en la misma fase de lectura abierta (ORF, siglas en inglés de *Open Reading Frame*) que la de los polipéptidos de zcytor17 de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 22. El uso de la metionina iniciadora alternativa añadiría 32 aminoácidos (mostrados en la SEQ ID NO: 48) en fase con el extremo N de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 2. Además, el nucleótido 536 de SEQ ID NO: 53 puede servir como una metionina iniciadora alternativa, generando de este modo el mismo extremo N (comenzando en el aminoácido 14 (Met) de SEQ ID NO: 54) y una secuencia polipeptídica señal, como SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 22. Además, la segunda metionina en el aminoácido número 2 en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 22 (de manera similar en el aminoácido número 15 (Met) en SEQ ID NO: 54) también puede servir como una metionina iniciadora alternativa para los polipéptidos.

La presencia de regiones transmembrana, y de motivos conservados y de varianza baja generalmente se correlaciona con o define regiones estructurales importantes en las proteínas. Las regiones de varianza baja (es decir, grupos hidrófobos) están generalmente presentes en regiones de importancia estructural (Sheppard, P. *et al.*, indicado anteriormente). Dichas regiones de baja varianza a menudo contienen aminoácidos raros o poco frecuentes tales como triptófano. Las regiones flanqueantes y entre dichos motivos conservados y de baja varianza pueden ser más variables, pero a menudo son funcionalmente significativas porque pueden relacionarse con o definir estructuras y actividades importantes tales como dominios de unión, actividad biológica y enzimática, transducción de señales, interacción célula a célula, dominios de localización tisular y similares.

Las regiones de restos de aminoácidos conservados en zcytor17, descritas anteriormente, pueden usarse como herramientas para identificar nuevos miembros de familias. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) puede usarse para amplificar secuencias que codifican las regiones conservadas de ARN obtenidas de una variedad de fuentes tisulares o líneas celulares. En particular, para esta finalidad, son útiles cebadores muy degenerados diseñados a partir de las secuencias de zcytor17. El diseño y uso de dichos cebadores degenerados puede realizarlo fácilmente un experto habitual en la técnica.

La presente invención proporciona moléculas polinucleotídicas, incluyendo moléculas de ADN y ARN que codifican los polipéptidos de zcytor17, como se indica en las reivindicaciones.

Los expertos en la técnica reconocerán que, considerando la degeneración del código genético, es posible una variación de secuencia considerable entre estas moléculas polinucleotídicas. La presente memoria descriptiva describe la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 55, cuyas secuencias de ADN degeneradas incluyen todos los ADN que codifican el polipéptido de zcytor17 de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 54 respectivamente. Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias degeneradas de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 55 también proporcionan todas las secuencias de ARN que codifica la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 54 sustituyendo U por T. Los polinucleótidos que codifican el polipéptido de zcytor17 comprenden del nucleótido 1 al nucleótido 2196 de SEQ ID NO: 4, del nucleótido 1 al nucleótido 1947 de SEQ ID NO: 47 y del nucleótido 1 al nucleótido 1986 de SEQ ID NO: 55 y sus equivalentes de ARN se describen en el presente documento. La Tabla 1 presenta los códigos de una letra usados en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 47 y

SEQ ID NO: 55 para indicar posiciones nucleotídicas degeneradas. La columna de "Resolución" son los nucleótidos indicados mediante un código de letra. La columna "Complemento" indica el código para el nucleótido (o nucleótidos) complementario. Por ejemplo, el código Y indica C o T, y su complemento R indica A o G, siendo A complementario de T y G complementario de C.

5

TABLA 1

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

Los codones degenerados usados en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 55, que incluyen todos los codones posibles para un aminoácido determinado, se exponen en la Tabla 2.

10

TABLA 2

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

15 Un experto habitual en la técnica apreciará que, en la determinación de un codón degenerado, se introduce alguna ambigüedad representativa de todos los codones posibles que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para la serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar la arginina (AGR), y el codón degenerado de la arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar la serina (AGY). Existe una relación

similar entre codones que codifican la fenilalanina y la leucina. Por tanto, algunos polinucleótidos incluidos por la secuencia degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, pero un experto habitual en la técnica puede identificar fácilmente dichas secuencias variantes por referencia a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 54; o SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 93. La funcionalidad de las secuencias variantes puede ensayarse fácilmente como se describe en el presente documento.

Un experto habitual en la técnica también apreciará que especies diferentes pueden exhibir "uso de codón preferencial". En general, véase, 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, la expresión "uso de codón preferencial" o "codones preferenciales" es una expresión de la técnica que se refiere a codones de traducción de proteínas que se usan más frecuentemente en células de una especie determinada, favoreciendo de este modo a uno o a algunos representantes de los posibles codones que codifican cada aminoácido (véase la Tabla 2). Por ejemplo, el aminoácido treonina (Thr) puede codificarse con ACA, ACC, ACG o ACT, pero en células de mamífero ACC es el codón más habitualmente usado; en otras especies, por ejemplo, células de insectos, levaduras, virus o bacterias, los diferentes codones de Thr pueden ser preferenciales. Los codones preferenciales para una especie particular pueden introducirse en los polinucleótidos de la presente invención mediante diversos 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 que la traducción de la proteína sea más eficiente en un tipo de célula o especie particular. Por lo tanto, las secuencias de codones degeneradas desveladas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 55 sirven como moldes para optimizar la expresión de los polinucleótidos zcytor17 en diversos tipos de células y especies normalmente usadas en la técnica y desveladas en el presente documento. Las secuencias que contienen codones preferenciales pueden ensayarse y optimizarse con respecto a la expresión en diversas especies y ensayarse con respecto a la funcionalidad como se desvela en el presente documento.

Los polinucleótidos aislados descritos en el presente documento hibridarán con regiones de tamaño similar de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 54; o SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 93; o con una secuencia complementaria a las mismas, en condiciones rigurosas. En general, se seleccionan condiciones rigurosas que son aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la cual el 50 % de la secuencia diana se hibrida con una secuencia perfectamente coincidente. En la técnica se conocen numerosas ecuaciones para calcular la T_m y son específicas para el ADN, ARN e híbridos de ADN-ARN y secuencias sonda polinucleotídicas de longitud variable (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel *et al.*, (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger y Kimmel (eds.), Guide to Molecular Cloning Techniques. (Academic Press, Inc. 1987); y Wetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227 (1990)). Los programas informáticos de análisis de secuencias tales como OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) y *Primer Premier* 4.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA), así como sitios en Internet, son herramientas disponibles para analizar una secuencia determinada y calcular el punto de fusión térmico, T_f en función de criterios definidos por el usuario. Dichos programas también pueden analizar una secuencia determinada en condiciones definidas e identificar secuencias sonda adecuadas. Normalmente, la hibridación de secuencias polinucleotídicas más largas (por ejemplo, >50 pares de bases) se realiza a temperaturas de aproximadamente 20-25 °C por debajo del punto de fusión térmico T_f calculado. Para sondas más cortas (por ejemplo, <50 pares de bases) la hibridación se realiza normalmente al T_f o a 5-10 °C por debajo. Esto permite la velocidad máxima de hibridación para híbridos de ADN-ADN y ADN-ARN. Pueden obtenerse grados más altos de rigurosidad a temperaturas más bajas con la adición de formamida que reduce el punto de fusión térmico T_f del híbrido aproximadamente 1 °C por cada formamida al 1 % en la solución tampón. Las condiciones de hibridación rigurosas adecuadas son equivalentes a aproximadamente una incubación de 5 h a una noche a una temperatura de aproximadamente 42 °C en una solución que comprende: formamida a aproximadamente 40-50 %, hasta aproximadamente 6X SSC, aproximadamente solución de Denhardt 5X, de cero hasta aproximadamente 10 % de sulfato de dextrano y aproximadamente 10-20 µg/ml de ADN transportador desnaturizado disponible en el comercio. Generalmente, dichas condiciones rigurosas incluyen temperaturas de 20-70 °C y un tampón de hibridación que contiene hasta 6X SSC y formamida al 0-50 %; realizándose después de la hibridación filtros de lavado en hasta aproximadamente 2X SSC. Por ejemplo, una rigurosidad de lavado adecuada es equivalente a de 0,1X SSC a 2X SSC, SDS al 0,1 %, a una temperatura de 55 °C a 65 °C. Pueden usarse diferentes grados de rigurosidad durante la hibridación y el lavado para conseguir una unión específica máxima con la secuencia diana. Normalmente, después de la hibridación, los lavados se realizan a grados crecientes de rigurosidad para retirar las sondas polinucleotídicas no hibridadas de los complejos hibridados. La hibridación y las condiciones de lavado rigurosas dependen de la longitud de la sonda, que se refleja en el T_f , en la hibridación y en las soluciones de lavado usadas, y que determina rutinariamente, de manera empírica, un experto en la técnica.

Como se ha indicado anteriormente, los polinucleótidos aislados de la presente invención incluyen ADN y ARN. En la técnica se conocen métodos para preparar ADN y ARN. En general, el ARN se aísla de un tejido o de una célula que produce grandes cantidades de ARN de zcytor17. Dichos tejidos y células se identifican mediante transferencia de Northern (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201, 1980) e incluyen líneas celulares de PBL, bazo, timo,

- médula ósea, próstata, y de tejidos linfáticos, de leucemia eritrocítica humana, leucemia monocítica aguda, otras celulares linfoides y hematopoyéticas y similares. El ARN total puede prepararse usando extracción con isotiocianato de guanidinio seguido de aislamiento por centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin *et al.*, Biochemistry 18: 52-94, 1979). El ARN poli (A)⁺ se prepara a partir de ARN total usando el método de Aviv y Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408-12, 1972). El ADN complementario (ADNc) se prepara a partir de ARN poli (A)⁺ usando métodos conocidos. Como alternativa, el ADN genómico puede aislarse. Los polinucleótidos que codifican polipéptidos de zcytor17 se identifican después y se aíslan, por ejemplo, mediante hibridación o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis, Patente de Estados Unidos n.º 4.683.202).
- 10 Un clon de longitud completa que codifica zcytor17 puede obtenerse mediante procedimientos de clonación convencionales. Se prefieren clones de ADN complementario (ADNc), aunque en algunas aplicaciones (por ejemplo expresión en animales transgénicos) puede ser preferible usar un clon genómico, o modificar un clon de ADNc que incluya al menos un intrón genómico. Los métodos para la preparación de clones de ADNc y genómico son muy conocidos y se están dentro del nivel de capacidad habitual en la técnica, e incluyen el uso de la secuencia desvelada en el presente documento, o partes de la misma, para la exploración o cebado de una biblioteca. Las bibliotecas de expresión pueden explorarse con anticuerpos contra zcytor17, con fragmentos del receptor o con otros compañeros de unión específicos.
- 15 Los polinucleótidos de la presente invención también pueden sintetizarse usando sintetizadoras de ADN. Actualmente el método de elección es el método de la fosforamida. Si se requiere sintetizar químicamente ADN bicatenario para una aplicación, tal como la síntesis de un gen o de un fragmento génico, entonces cada cadena complementaria se fabrica por separado. La producción de polinucleótidos cortos (de 60 a 80 pb) es técnicamente sencilla y puede realizarse sintetizando las cadenas complementarias y después hibridándolas. Sin embargo, para la producción de polinucleótidos más largos (>300 pb), normalmente se emplean estrategias especiales, porque la eficacia de acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis química de ADN es raramente del 100 %. Para superar este problema, los genes sintéticos (bicatenarios) se ensamblan en forma modular a partir de fragmentos monocatenarios que tienen una longitud de 20 a 100 nucleótidos.
- 20 Un modo alternativo para preparar un gen de longitud completa es sintetizar un conjunto específico de oligonucleótidos (de 40 a 100 nucleótidos) solapantes. Después de hibridar las regiones complementarias solapantes cortas (de 6 a 10 nucleótidos) 3' y 5', sigue habiendo huecos grandes, pero las regiones cortas de bases emparejadas son tanto suficientemente largas como suficientemente estables para mantener la estructura en conjunto. Los huecos se llenan y el ADN dúplex se completa mediante síntesis de ADN enzimática con la ADN polimerasa I de *E. coli*. Después de completar la síntesis enzimática, las muescas se sellan con ADN ligasa de T4.
- 25 Las construcciones bicatenarias se ligan secuencialmente entre sí para formar la secuencia génica completa que se verifica mediante análisis de secuencia de ADN. Véase Glick y Pasternak, Molecular Biotechnology. Principles & Applications of Recombinant DNA. (ASM Press, Washington, D. C. 1994); Itakura *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 53: 323-56, 1984 y Climie *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 633-7, 1990. Además, generalmente se añaden otras secuencias que contienen señales para el inicio y la terminación apropiados de la transcripción y la traducción.
- 30 La presente memoria descriptiva también describe polipéptidos y polinucleótidos homólogos de otras especies (ortólogos). Estas especies incluyen, pero sin limitación, especies de mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y de otros vertebrados e invertebrados. De particular interés son los polipéptidos de zcytor17 de otras especies de mamíferos, incluyendo polipéptidos de murino, porcino, ovino, bovino, canino, felino, equino y de otros primates. Los ortólogos de zcytor17 humano pueden clonarse usando la información y las composiciones que proporciona la presente invención en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, un ADNc puede clonarse usando ARNm obtenido de un tipo de tejido o célula que exprese zcytor17 como se desvela en el presente documento. Fuentes adecuadas de ARNm pueden identificarse explorando transferencias de Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias desveladas en el presente documento. Después, se prepara una biblioteca de ARNm de un tejido positivo o de una línea celular positiva. Un ADNc que codifica zcytor17 puede después aislarse mediante diversos métodos, tal como mediante exploración con un ADNc humano, completo o parcial, o con un conjunto o más de sondas degeneradas basándose en las secuencias desveladas. Un ADNc puede también clonarse usando PCR (Mullis, citado anteriormente), usando cebadores diseñados a partir de la secuencia de zcytor17 humana representativa desvelada en el presente documento. En un método adicional, la biblioteca de
- 35 ADNc puede usarse para transformar o transfectar células hospedadoras, y la expresión del ADNc de interés puede detectarse con un anticuerpo contra el polipéptido de zcytor17. También pueden aplicarse técnicas similares para el aislamiento de clones genómicos.
- 40 Se ha identificado una secuencia de polinucleótidos para el ortólogo de ratón de zcytor17 humano y se muestra en la SEQ ID NO: 56 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la SEQ ID NO: 57. El análisis del polipéptido de zcytor17 de ratón codificado por la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 56 reveló una fase de lectura abierta que codificaba 662 aminoácidos (SEQ ID NO: 57) que comprendía un péptido señal secretor predicho de 45 restos de aminoácidos (resto 1 (Met) al resto 45 (Ala) de SEQ ID NO: 57), y un polipéptido maduro de 617 aminoácidos (resto 46 (Val) al resto 662 (Cys) de SEC ID NO: 57). Además, un resto de Met adicional, Met (28) puede usarse como una metionina iniciadora; que comprende un segundo péptido señal secretor predicho de 18 restos de aminoácidos (resto 28 (Met) al resto 45 (Ala) de SEQ ID NO: 57) y el mismo polipéptido maduro de 617

aminoácidos (resto 46 (Val) al resto 662 (Cys) de SEC ID NO: 57. Además del motivo WSXWS (SEQ ID NO: 3) correspondiente a los restos 224-228 de SEQ ID NO: 57, el receptor comprende un dominio extracelular de los restos 46 (Val) a 533 (Glu) de SEQ ID NO: 57) que incluye un dominio de unión a citocina de aproximadamente 200 restos de aminoácidos (restos 46 (Val) a 240 (Pro) de SEQ ID NO: 57) y un dominio de fibronectina III (restos 241 (His) a 533 (Glu) de SEQ ID NO: 57); un motivo CXW (restos 66 (Cys) a 68 (Trp) de SEQ ID NO: 57); un enlazador de dominio (restos 142 (Thr) a 145 (Pro) de SEQ ID NO: 57); una región de penúltima cadena (restos 207 (Phe) a 215 (Arg) de SEQ ID NO: 57); un dominio transmembrana (restos 534 (Ile) a 550 (Ile) de SEC ID NO: 57); dominio de señalización intracelular completo (restos 551 (Lys) a 662 (Cys) de SEC ID NO: 57) contiene un sitio de señalización de "Caja I" (restos 568 (Cys) a 574 (Pro) de SEQ ID NO: 57), y un sitio de señalización de "caja II" (restos 628 (Glu) a 631 (Ile) de SEC ID NO: 57). Los restos conservados comunes a receptores de citocina de clase I, están en los restos 56 (Cys), 187 (Trp) y 215 (Arg). Una comparación de las secuencias de aminoácidos de ser humano y de ratón revela que los polipéptidos tanto humanos como ortólogos contienen características estructurales correspondientes descritas anteriormente. La secuencia madura para el zcytor17 de ratón comienza en Val₄₆ (como se muestra en la SEQ ID NO: 57), que corresponde a Ala₃₃ (como se muestra en la SEQ ID NO: 54) en la secuencia humana. Hay una identidad de aproximadamente un 61 % entre las secuencias de ratón y de ser humano en toda la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 57. El porcentaje de identidad anterior se determinó usando un programa FASTA con un valor ktup = 1, una penalización por apertura de hueco = 12, una penalización por extensión de hueco = 2 y una matriz de sustitución = BLOSUM62, con otros parámetros establecidos por defecto. Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, los dominios, los motivos, los restos y las secuencias del polipéptido de zcytor17 de ratón, que se han descrito anteriormente, son como se muestra en la SEQ ID NO: 56.

Adicionalmente, parece expresarse de manera natural una forma soluble truncada del polipéptido receptor zcytor17 de ratón. Se ha identificado una secuencia de polinucleótidos para una forma soluble truncada del receptor zcytor17 de ratón y se muestra en la SEQ ID NO: 92, y la secuencia de aminoácidos correspondiente mostrada en la SEQ ID NO: 93. El análisis del polipéptido de zcytor17 de ratón soluble truncado codificado por la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 92 reveló una fase de lectura abierta que codifica 547 aminoácidos (SEQ ID NO: 93) que comprende un péptido señal secretor predicho de 45 restos de aminoácidos (del resto 1 (Met) al resto 45 (Ala) de SEQ ID NO: 93), y un polipéptido maduro de 502 aminoácidos (del resto 46 (Val) al resto 547 (Val) de SEC ID NO: 93). Además, puede usarse un resto de Met adicional, Met (28), como una metionina iniciadora; que comprende un segundo péptido señal secretor predicho de 18 restos de aminoácidos (del resto 28 (Met) al resto 45 (Ala) de SEQ ID NO: 93), y el mismo polipéptido maduro de 502 aminoácidos (del resto 46 (Val) al resto 547 (Val) de SEC ID NO: 93). Además del motivo WSXWS (SEQ ID NO: 3) correspondiente a los restos 224-228 de SEQ ID NO: 93, el receptor comprende un dominio extracelular de los restos 46 (Val) a 533 (Trp) de SEQ ID NO: 93) que incluye un dominio de unión a citocina de aproximadamente 200 restos de aminoácidos (restos 46 (Val) a 240 (Pro) de SEQ ID NO: 93) y un dominio de fibronectina III (restos 241 (His) a 533 (Trp) de SEQ ID NO: 93); un motivo CXW (restos 66 (Cys) a 68 (Trp) de SEQ ID NO: 93); un enlazador de dominio (restos 142 (Thr) a 145 (Pro) de SEQ ID NO: 93); una región de penúltima cadena (restos 207 (Phe) a 215 (Arg) de SEQ ID NO: 93); y una región de cola C terminal (restos 534 (Leu) a 547 (Val). Los restos conservados comunes a receptores de citocina de clase I, están en los restos 56 (Cys), 187 (Trp) y 215 (Arg). Una comparación de las secuencias de aminoácidos de ser humano y de ratón, incluyendo zcytor17 de ratón soluble truncado, reveló que los polipéptidos tanto humanos como ortólogos contenían características estructurales correspondientes descritas anteriormente. Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, dominios, motivos, restos y secuencias del polipéptido de zcytor17 de ratón soluble truncado, que se han descrito anteriormente, son como se muestra en la SEQ ID NO: 92.

Las subunidades de los receptores de citocina se caracterizan por una estructura multidominio que comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana que ancla el polipéptido en la membrana celular y un dominio intracelular. El dominio extracelular puede ser un dominio de unión a ligando, y el dominio intracelular puede ser un dominio efector implicado en la transducción de señales, aunque las funciones efectoras y de unión a ligando pueden residir en subunidades distintas de un receptor multimérico. El dominio de unión a ligando puede ser en sí mismo una estructura multidominio. Los receptores multiméricos incluyen homodímeros (por ejemplo, isoformas $\alpha\alpha$ y $\beta\beta$ del receptor de PDGF, receptor de eritropoyetina, MPL y receptor de G-CSF), heterodímeros cuyas subunidades tienen cada una de ellas dominios de unión a ligando y efectores (por ejemplo, isoforma $\alpha\beta$ del receptor de PDGF) y multímeros que tienen subunidades componentes con funciones dispares (por ejemplo, receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 y GM-CSF). Algunas subunidades receptoras son comunes a una pluralidad de receptores. Por ejemplo, la subunidad AIC2B, que por sí sola no puede unirse al ligando, pero incluye un dominio de transducción de señal intracelular, es un componente de receptores de IL-3 y de GM-CSF. Muchos receptores de citocina pueden pertenecer a una de las cuatro familias relacionadas, en función de su estructura y función. Los receptores hematopoyéticos, por ejemplo, se caracterizan por la presencia de un dominio que contiene restos de cisteína conservados y el motivo WSXWS (SEQ ID NO: 3). La estructura del receptor de citocina se ha revisado en Urdal, Ann. Reports Med. Chem. 26: 221-228, 1991 y Cosman, Cytokine 5: 95-106, 1993. Bajo presión selectiva de organismos para adquirir nuevas funciones biológicas, surgen nuevos miembros de familias de receptores probablemente a partir de la duplicación de genes de receptores existentes, lo que conduce a la existencia de familias multigénicas. Los miembros de las familias por tanto contienen vestigios del gen ancestral, y estos rasgos característicos pueden aprovecharse en el aislamiento e identificación de miembros de familias adicionales. Por tanto, la superfamilia de receptores de citocina se subdivide en diversas familias, por ejemplo, la familia de la

inmunoglobulina (incluyendo receptores de CSF-1, MGF, IL-1, y PDGF); la familia de la hemopoyetina (incluyendo la subunidad β del receptor de IL-2, la subunidad α del receptor de GM-CSF, la subunidad β del receptor de GM-CSF, y los receptores de G-CSF, EPO, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 e IL-9); la familia del receptor de TNF (incluyendo receptores de TNF (p80) TNF (p60), CD27, CD30, CD40, Fas y receptor de NGF).

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

20 Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias desveladas en la SEQ ID NO 1, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 53 representan alelos de zcytor17 humano y se espera que se produzca variación alélica y corte y empalme alternativo. Las variantes alélicas de esta secuencia pueden clonarse explorando bibliotecas de ADNc o genómico de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos convencionales. En el presente documento se describen variantes alélicas de la secuencia de ADN mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 53, incluyendo aquellas que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones producen cambios en la secuencia de aminoácidos, al igual que proteínas que son variantes alélicas de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 93. Los ADNc generados a partir de ARNm cortados y empalmados alternativamente, que conservan las propiedades del polipéptido de zcytor17, se describen en el presente documento, al igual que los polipéptidos codificados por dichos ADNc y ARNm. Las variantes alélicas y las variantes de corte y empalme de estas secuencias pueden clonarse explorando bibliotecas de ADNc o genómico de diferentes individuos o tejidos de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, la forma corta y la forma larga de los receptores zcytor17 solubles descritos anteriormente y en la SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 pueden considerarse variantes alélicas o de corte y empalme de zcytor17.

35 La presente memoria descriptiva también describe polipéptidos de zcytor17 aislados que son sustancialmente similares a los polipéptidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 54 y sus ortólogos, por ejemplo, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID N°: 93. La expresión "sustancialmente similar" se usa en el presente documento para indicar polipéptidos que tienen al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, de identidad de secuencia con las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 54 o sus ortólogos, por ejemplo, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 93. Dichos polipéptidos serán preferentemente al menos 90 % idénticos y lo más preferentemente 95 % o más idénticos a la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 54 o sus ortólogos). El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, Bull. Math. Bio. 48: 603-616, 1986 y Henikoff and 25 Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919, 1992. En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar las puntuaciones del alineamiento usando una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 1, y la matriz de puntuación "blosum 62" de Henikoff y Henikoff (mencionado anteriormente) como se muestra en la Tabla 3 (los aminoácidos se indican mediante los códigos convencionales de una letra). El porcentaje de identidad se calcula por tanto como:

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

Tabla 3

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

La identidad de secuencia de las moléculas polinucleotídicas se determina mediante métodos similares usando una proporción como se desvela anteriormente.

5 Los expertos en la técnica aprecian que hay muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un método de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento y la secuencia de aminoácidos de una supuesta variante de zcytor17. El algoritmo FASTA se describe en Pearson y Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988) y en Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990).

10

En resumen, FASTA caracteriza en primer lugar la similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia a investigar (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 93) y una secuencia de ensayo que tiene la densidad más alta de identidades (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si la ktup = 2), sin considerar sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos conservativas. Las diez regiones con la densidad más alta de identidades se vuelven a puntuar después comparando la similitud de todos los aminoácidos emparejados usando una matriz de sustitución de aminoácidos, y los extremos de las regiones se "recortan" para incluir solo aquellos restos que contribuyan a la puntuación más alta. Si hay varias regiones con puntuaciones mayores que el valor "límite" (calculado mediante una fórmula predeterminada basándose en la longitud de la secuencia y en el valor de ktup), entonces las regiones iniciales recortadas se examinan para determinar si las regiones pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con huecos. Finalmente, las regiones de puntuación más alta de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787 (1974)), que permite realizar inserciones y deleciones de aminoácidos. Los parámetros preferidos para el análisis FASTA son: ktup = 1, penalización por apertura de hueco = 10, penalización por extensión de hueco = 1 y matriz de sustitución = BLOSUM62, con otros parámetros establecidos por defecto. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de la matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el Anexo 2 de Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990).

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

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

Los polipéptidos de zcytor17 variantes o polipéptidos de zcytor17 sustancialmente homólogos se caracterizan porque tienen una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferentemente de una naturaleza inferior, es decir, que las sustituciones de aminoácidos conservativas (véase la Tabla 4) y otras sustituciones no afectan significativamente al plegamiento o a la actividad del polipéptido; pequeñas deleciones, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tal como un resto de metionina amino-terminal, un péptido enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 restos, o una etiqueta de afinidad. La presente memoria descriptiva describe por lo tanto polipéptidos que comprenden una secuencia que es al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, y más preferentemente 95 % o más idéntica a la región correspondiente de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 93 excluyendo las secuencia de etiquetas, extensión, enlazadoras y similares. Los polipéptidos que comprenden etiquetas de afinidad pueden comprender adicionalmente un sitio de escisión proteolítica entre el polipéptido de zcytor17 y la etiqueta de afinidad. Los sitios adecuados incluyen sitios de escisión de trombina y sitios de escisión del factor Xa.

Tabla 4

Sustituciones de aminoácidos conservativas

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

alanina
serina
treonina
metionina

La presente memoria descriptiva describe adicionalmente una variedad de otras fusiones de polipéptidos y proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones de polipéptidos. Por ejemplo, un polipéptido de zcytor17 puede prepararse como una fusión con una proteína dimerizante como se desvela en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.155.027 y 5.567.584. Las proteínas dimerizantes preferidas en este aspecto incluyen dominios de región constante de inmunoglobulina. Las fusiones de inmunoglobulina-polipéptido de zcytor17 pueden expresarse en células modificadas genéticamente para producir una variedad de análogos de zcytor17 multiméricos. Dominios auxiliares pueden fusionarse con polipéptidos de zcytor17 para dirigirlos a células, tejidos o macromoléculas (por ejemplo colágeno) específicos. Un polipéptido de zcytor17 puede fusionarse con dos o más fracciones, tal como una etiqueta de afinidad para la purificación y un dominio de direccionamiento. Las fusiones polipeptídicas también pueden comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase, Tuan *et al.*, *Connective Tissue Research* 34: 1-9, 1996.

Las proteínas de la presente invención también pueden comprender restos de aminoácidos de origen no natural. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxioprolina, *trans*-4-hidroxioprolina, *N*-metilglicina, *alo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipercolico, ácido tiazolidín carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *terc*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. En la técnica se conocen diversos métodos para incorporar en las proteínas restos de aminoácidos de origen no natural. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro* en el que se supriman mutaciones sin sentido usando ARNt supresor químicamente aminoacilado. En la técnica se conocen métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se realiza en un sistema acelular que comprende un extracto de S30 de *E. coli* y enzimas disponibles en el comercio y otros reactivos. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véase, 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: 806-9, 1993; y Chung *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10145-9, 1993). En un segundo método, la traducción se realiza en ovocitos de *Xenopus* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresor aminoacilado químicamente (Turcatti *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 19991-8, 1996). En un tercer método, células de *E. coli* se cultivan en ausencia de un aminoácido natural que va a reemplazarse (por ejemplo, fenilalanina), y en presencia del aminoácido (o aminoácidos) de origen no natural deseado (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural se incorpora en la proteína en lugar de su homólogo natural. Véase, Koide *et al.*, *Biochem.* 33: 7470-7476, 1994. Los restos de aminoácidos de origen natural pueden transformarse en especies de origen no natural mediante modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida a sitio para expandir adicionalmente el rango de sustituciones (Wynn and Richards, *Protein Sci.* 2: 395-403, 1993).

Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético, aminoácidos de origen no natural y aminoácidos no naturales puede sustituirse por restos de aminoácidos de zcytor17.

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida a sitio o la mutagénesis mediante alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989; Bass *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4498-502, 1991). En la última técnica, se introducen mutaciones de una sola alanina en cada resto de la molécula y las moléculas mutantes resultantes se someten a ensayo para determinar la actividad biológica (por ejemplo unión a ligando y traducción de señal) como se desvela más adelante para identificar restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708, 1996. También pueden determinarse sitios de interacción de tipo receptor-ligando, proteína-proteína u otra interacción biológica, mediante análisis físicos de estructura, determinados mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje con fotoafinidad, junto con mutación de supuestos aminoácidos en sitios de contacto. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, *Science* 255: 306-312, 1992; Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904, 1992; Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309: 59-64, 1992. Las identidades de los aminoácidos esenciales también pueden deducirse a partir de análisis de homología con receptores relacionados.

La determinación de restos de aminoácidos que están en regiones o dominios que son críticos para mantener la integridad estructural puede determinarse. En estas regiones pueden determinarse restos específicos que serán más o menos tolerantes al cambio y mantendrán la estructura terciaria global de la molécula. Como métodos para analizar la estructura de las secuencias se incluyen, pero sin limitación, el alineamiento de secuencias múltiples con análisis informáticos y de alta identidad de nucleótidos o aminoácidos, usando programas informáticos disponibles (por ejemplo, el visualizador Insight II® y herramientas de modelado de homología; MSI, San Diego, CA), propensiones de estructura secundaria, patrones binarios, empaquetamiento complementario e interacciones polares enterradas (Barton, *Current Opin. Struct. Biol.* 5: 372-376, 1995 y Cordes *et al.*, *Current Opin. Struct. Biol.* 6:

3-10, 1996). En general, cuando se diseñan modificaciones en las moléculas o se identifican fragmentos específicos la determinación de la estructura estará acompañada por la evaluación de la actividad de las moléculas modificadas.

5 En los polipéptidos de zcytor17 se realizan cambios en la secuencia de aminoácidos para minimizar la alteración de estructuras de orden superior, esencial para la actividad biológica. Por ejemplo, cuando el polipéptido de zcytor17 comprende uno o más hélices, se realizarán cambios en los restos de aminoácidos de tal manera que no se altere la geometría de la hélice ni los otros componentes de la molécula, donde los cambios en la conformación menguan alguna función crítica, por ejemplo, la unión de la molécula con sus compañeros de unión. Los efectos de los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden predecirse, por ejemplo, mediante modelado informático, como se desvela anteriormente o determinarse mediante análisis de la estructura cristalina (véase, por ejemplo, Laphorn *et al.*, Nat. Struct. Biol. 2: 266-268, 1995). Otras técnicas muy conocidas en la materia comparan el plegamiento de una proteína variante con una molécula convencional (por ejemplo, la proteína natural). Por ejemplo, puede hacerse una comparación del patrón de cisteína en una variante y en moléculas convencionales. La espectrometría de masas y la modificación química usando reducción y alquilación proporcionan métodos para determinar restos de cisteína que están asociados con enlaces disulfuro o que carecen de dichas asociaciones (Bean *et al.*, Anal. Biochem. 201: 216-226, 1992; Gray, Protein Sci. 2: 1732-1748, 1993; y Patterson *et al.*, Anal. Chem. 66: 3727-3732, 1994). Generalmente se piensa que si una molécula modificada no tiene el mismo patrón de enlaces disulfuro que la molécula convencional, el plegamiento se vería afectado. Otro método muy conocido y aceptado para medir el plegamiento es el diroísmo circular (DC). La medición y comparación de los espectros DC generados por una molécula modificada y una molécula convencional es habitual (Johnson, Proteins 7: 205-214, 1990). La cristalografía es otro método muy conocido para analizar el plegamiento y la estructura. La resonancia magnética nuclear (RMN), el mapeo peptídico digestivo y el mapeo epitópico son también métodos conocidos para analizar el plegamiento y similitudes estructurales entre las proteínas y los polipéptidos (Schaanan *et al.*, Science 257: 961-964, 1992).

25 Puede generarse un perfil de hidrofiliidad de Hopp/Woods de la secuencia de la proteína zcytor17, como se muestra en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 93 (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). Véase la Figura 1. El perfil se basa en una ventana corredera de seis restos. Los restos G, S y T enterrados y los restos H, Y y W expuestos se ignoraron. Por ejemplo, en zcytor17, las regiones hidrófilas incluyen los restos de aminoácidos 43 a 48 de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46 (los restos 56 a 61 de SEQ ID NO: 54), los restos de aminoácidos 157 a 162 de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46 (los restos 170 a 175 de SEQ ID NO: 54), los restos de aminoácidos 158 a 163 de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46 (los restos 171 a 176 de SEQ ID NO: 54), los restos de aminoácidos 221 a 226 de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46 (los restos 234 a 239 de SEQ ID NO: 54), y los restos de aminoácidos 426 a 431 de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46 (los restos 439 a 444 de SEQ ID NO: 54).

35 Los expertos en la técnica reconocerán que la hidrofiliidad o hidrofobicidad se tendrán en cuenta se diseñen modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de zcytor17, de manera que no altere el perfil estructural y biológico global. De particular interés para el reemplazo son los restos hidrófobos seleccionados del grupo que consiste en Val, Leu e Ile del grupo que consiste en Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp. Por ejemplo, los restos tolerantes de sustitución incluirían restos tales como muestra en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 93. Sin embargo, los restos de cisteína serían relativamente intolerantes de sustitución.

45 Las identidades de los aminoácidos esenciales también pueden deducirse a partir del análisis de similitud de secuencia entre miembros de la familia del receptor de citocina de clase I con zcytor17. Usando métodos tales como el análisis "FASTA" descrito anteriormente, se identifican regiones de alta similitud dentro de una familia de proteínas y se usan para analizar la secuencia de aminoácidos para regiones conservadas. Una estrategia alternativa para identificar un polinucleótido zcytor17 variante basándose en la estructura, es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un posible polinucleótido zcytor17 variante puede hibridar con una molécula de ácido nucleico que tenga la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 53, como se expone anteriormente.

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

65 La presente invención también incluye polipéptidos que corresponden a fragmentos funcionales de polipéptidos de zcytor17 y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales, como se define en las reivindicaciones. Un zcytor17 "funcional" o fragmento del mismo definido en el presente documento se caracteriza por su actividad proliferativa o diferenciadora, mediante su capacidad para inducir o inhibir funciones celulares especializadas, o mediante su capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo anti-zcytor17 o ligando de

zcytor17 (soluble o inmovilizado). Además, los fragmentos funcionales también incluyen el péptido señal, el dominio de señalización intracelular y similar. Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, zcytor17 se caracteriza por una estructura de receptor de citocina de clase I. La presente memoria describe adicionalmente proteínas de fusión que incluyen: (a) moléculas polipeptídicas que comprenden un dominio extracelular, un dominio de unión a citocina, o un dominio intracelular descrito en el presente documento; y (b) fragmentos funcionales que comprenden uno o más de estos dominios. La otra parte polipeptídica de la proteína de fusión la puede aportar otro receptor de citocina de clase I, por ejemplo, receptor de gp130, LIF, IL-12, WSX-1, la subunidad β del receptor de IL-2 y el receptor β común (es decir, subunidades beta del receptor de IL3, IL-5 y GM-CSF) o un péptido señal secretor no natural y/o no relacionado que facilita la secreción de la proteína de fusión.

Pueden realizarse análisis de delección rutinarios de moléculas de ácido nucleico para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de zcytor17. Como una ilustración, moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 53 o fragmentos de las mismas, pueden digerirse con nucleasa Bal31 para obtener una serie de delecciones anidadas. Estos fragmentos de ADN se insertan después en vectores de expresión en fases de lectura adecuadas y los polipéptidos expresados se aíslan y se ensayan con respecto a la actividad de zcytor17, o con respecto a la capacidad de unirse a anticuerpos anti-zcytor17 o ligandos de zcytor17. Una alternativa a la digestión con exonucleasa es usar mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para introducir delecciones o codones de terminación para la producción específica de un fragmento de zcytor17 deseado. Como alternativa, pueden sintetizarse fragmentos particulares de un polinucleótido zcytor17 usando la reacción en cadena de la polimerasa.

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

Pueden realizarse y ensayarse sustituciones de aminoácidos múltiples usando métodos conocidos de mutagénesis y exploración tales como los desvelados por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241: 53-57, 1988) o Bowie y Sauer (*Proc Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156, 1989). Resumiendo, estos autores desvelan métodos para la aleatorización simultánea de dos o más polipéptidos, seleccionando un polipéptido funcional y después secuenciando los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones admisibles en cada posición. Otros métodos que pueden usarse incluyen presentación en fagos (por ejemplo, Lowman *et al.*, *Biochem.* 30: 10832-10837, 1991; Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.223.409; Huse, Publicación WIPO WO 92/062045) y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire *et al.*, *Gene* 46: 145, 1986; Ner *et al.*, *DNA* 7: 127, 1988).

Pueden generarse variantes de las secuencias de ADN y polipeptídicas de zcytor17 desvelado a través de barajado de ADN como se desvela en Stemmer, *Nature* 370: 389-91, 1994, Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-51, 1994 y en la publicación WIPO WO 97/20078. En resumen, se generan ADN variantes mediante recombinación homóloga *in vitro* por fragmentación al azar de un ADN parental seguido de reensamblaje usando PCR, dando como resultado mutaciones puntuales introducidas al azar. Esta técnica puede modificarse usando una familia de ADN parentales, tales como variantes alélicas o ADN de diferentes especies, para introducir variabilidad adicional en el proceso. La selección o exploración para la actividad deseada, seguido de iteraciones adicionales de mutagénesis y ensayo proporciona una "evolución" rápida de secuencias seleccionando mutaciones deseables al mismo tiempo que se seleccionan simultáneamente contra cambios perjudiciales.

Los métodos de mutagénesis como se desvela en el presente documento pueden combinarse con métodos de exploración automáticos, de alto rendimiento, para detectar la actividad de polipéptidos del receptor zcytor17 clonado, mutagenizado en células hospedadoras. Los ensayos preferidos en este aspecto incluyen ensayos de proliferación celular y ensayos de unión a ligando basados en biosensores, que se describen más adelante. Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican receptores activos o partes de los mismos (por ejemplo, fragmentos de unión a ligando, dominios de señalización y similares) pueden recuperarse de las células hospedadoras y secuenciarse rápidamente usando equipos modernos. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de restos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

Además, las proteínas de la presente memoria descriptiva (o sus fragmentos polipeptídicos), pueden unirse a otras moléculas bioactivas, particularmente a receptores de citocina, para proporcionar moléculas multifuncionales. Por ejemplo, uno o más dominios del receptor soluble zcytor17 pueden unirse a otros receptores solubles de citocina para potenciar sus propiedades biológicas o eficacia de producción.

- La presente memoria descriptiva proporciona por tanto una serie de moléculas nuevas, híbridas en las que un segmento que comprende uno o más de los dominios de zcytor17 se fusiona con otro polipéptido. La fusión se realiza preferentemente mediante corte y empalme a nivel de ADN para permitir la expresión de moléculas quiméricas en sistemas de producción recombinantes. Las moléculas resultantes se evalúan después para
- 5 determinar propiedades tales como solubilidad mejorada, estabilidad mejorada, semivida de eliminación prolongada, niveles de secreción y expresión mejorados y farmacodinámica. Dichas moléculas híbridas pueden comprender adicionalmente restos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, un enlazador polipeptídico) entre las proteínas o polipéptidos componentes.
- 10 Usando los métodos desvelados en el presente documento, un experto habitual en la técnica puede identificar y/o preparar diversos fragmentos polipeptídicos o variantes de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 93 que conserven la actividad de transducción de señal o de unión a ligando. Por ejemplo, se puede construir un "receptor soluble" zcytor17 preparando diversos polipéptidos que sean sustancialmente
- 15 homólogos al dominio de unión a citocina (restos 20 (Ala) a 227 (Pro) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; restos 33 (Ala) a 24 (Pro) de SEQ ID NO: 54), el dominio extracelular (restos 20 (Ala) a 519 (Glu) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; restos 33 (Ala) a 532 (Glu) de SEQ ID NO: 2), o variantes alélicas u ortólogos de especies de las mismas (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 93 y fragmentos funcionales de las mismas como se describe en el presente documento)), y que conserven la actividad de unión a ligando de la proteína zcytor17 de tipo silvestre. Además, los receptores solubles zcytor17 variantes tales como los mostrados en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 22
- 20 pueden aislarse. Dichos polipéptidos pueden incluir aminoácidos adicionales de, por ejemplo, parte o todo el dominio transmembrana e intracelular. Dichos polipéptidos también pueden incluir segmentos polipeptídicos adicionales como los generalmente desvelados en el presente documento tales como marcadores, etiquetas de afinidad y similares.
- 25 Para cualquier polipéptido de zcytor17, incluyendo variantes, receptores solubles y polipéptidos o proteínas de fusión, un experto habitual en la técnica puede generar fácilmente una secuencia de polinucleótidos completamente degenerada que codifique esa variante usando la información expuesta en las Tablas 1 y 2 anteriores.
- Los polipéptidos de zcytor17 de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden producirse en
- 30 células hospedadoras modificadas genéticamente de acuerdo con técnicas convencionales. Las células hospedadoras adecuadas son aquellos tipos de células que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y crecer en cultivos, e incluyen bacterias, células fúngicas y células eucarióticas superiores cultivadas. Se prefieren células eucariotas, particularmente células cultivadas de organismos multicelulares. En Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2^a 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, se desvelan técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir ADN exógeno en una diversidad de células hospedadoras.
- 35 En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de zcytor17 está unida operativamente a otros elementos genéticos necesarios para su expresión, generalmente incluyendo un promotor y un terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá normalmente uno o más marcadores de selección y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la técnica reconocerán que pueden proporcionarse determinados sistemas de marcadores de selección en vectores distintos y la replicación del ADN exógeno puede proporcionarse mediante la integración en el genoma de célula hospedadora. La selección de
- 40 promotores, terminadores, marcadores de selección, vectores y otros elementos es una cuestión de diseño rutinario dentro del nivel de la capacidad habitual en la técnica. Muchos de estos elementos se describen en la bibliografía y se encuentran disponibles en proveedores comerciales.
- Para dirigir un polipéptido de zcytor17 en la ruta secretora de una célula hospedadora, en el vector de expresión se
- 50 proporciona una secuencia señal secretora (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre). La secuencia señal secretora puede ser la de zcytor17, o puede proceder de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA) o sintetizarse de nuevo. La secuencia señal secretora está unida operativamente a la secuencia de ADN de zcytor17, es decir, las dos secuencias están unidas en la fase de lectura correcta y se colocan para dirigir el polipéptido recién sintetizado en la ruta secretora de la célula hospedadora. Las secuencias señal secretoras se
- 55 colocan normalmente en dirección 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque determinadas secuencias señales secretoras pueden colocarse en cualquier parte en la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.037.743; Holland *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.143.830).
- 60 Como alternativa, la secuencia señal secretora contenida en los polipéptidos descritos en el presente documento se usa para dirigir otros polipéptidos en la ruta secretora. Dichos polipéptidos de fusión se describen en el presente documento. Usando métodos conocidos en la técnica y desvelados en el presente documento puede crearse un polipéptido de fusión de señal en el que una secuencia señal secretora, que procede del aminoácido 1 (Met) al
- 65 aminoácido 19 (Ala) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46, o en el que una secuencia señal secretora que procede del aminoácido 1 (Met) al aminoácido 32 (Ala) de SEQ ID NO: 54, o del aminoácido 1 (Met) al aminoácido 45 (Ala) de SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 93) o del aminoácido 28 (Met) al resto 45 (Ala) de SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 93),

esté unida operativamente a otro polipéptido. La secuencia señal secretora contenida en los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento está preferentemente fusionada en el extremo amino en un péptido adicional para dirigir al polipéptido adicional en la ruta secretora. Dichas construcciones tienen numerosas aplicaciones conocidas en la técnica. Por ejemplo, estas nuevas construcciones de fusión de secuencia de señal secretoras pueden dirigir la secreción de un componente activo de una proteína normalmente no secretada. Dichas fusiones pueden usarse *in vivo* o *in vitro* para dirigir péptidos a través de la ruta secretora.

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

La selección de fármacos se usa generalmente para seleccionar células de mamífero cultivadas en las que se ha insertado ADN extraño. Dichas células reciben normalmente el nombre de "transfectantes". Las células que se han cultivado en presencia de un agente selectivo y que pueden transferir el gen de interés a su ascendencia se denominan "transfectantes estables". Un marcador de selección preferido es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección se realiza en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similar. También pueden usarse sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un proceso que recibe el nombre de "amplificación". La amplificación se realiza cultivando transfectantes en presencia de un nivel bajo del agente selectivo y después aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar células que produzcan niveles altos de los productos de los genes introducidos. Un marcador de selección amplificable preferido es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato. Otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a higromicina, resistencia a fármacos múltiples, puromicina acetiltransferasa) también pueden usarse. Pueden usarse marcadores alternativos que introducen un fenotipo alterado, tal como la proteína fluorescente verde, o proteínas de superficie celular tales como CD4, CD8, MHC de clase I, fosfatasa alcalina de placenta, para separar las células transfectadas de las no transfectadas mediante medios tales como tecnología de separación de células activadas por fluorescencia, FACS, o de separación con perlas magnéticas.

Como hospedadores también pueden usarse otras células eucariotas superiores, entre las que se incluyen células vegetales, células de insecto y células de ave. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como un vector para expresar genes en células vegetales se ha revisado en Sinkar *et al.*, J. Biosci. (Bangalore) 11: 47-58, 1987. La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos exógenos en su interior se desvela en Guarino *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.162.222 y publicación WIPO WO 94/06463. Las células de insecto pueden infectarse con baculovirus recombinante, normalmente procedente del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). Véase, King, L. A. y Possee, R. D., The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, London, Chapman & Hall; O'Reilly, D. R. *et al.*, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Nueva York, Oxford University Press., 1994; y, Richardson, C. D., Ed., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995. Un segundo método de preparación de baculovirus de zcytor17 recombinante utiliza un sistema basado en transposones descrito por Luckow (Luckow, VA, *et al.*, J Virol 67: 4566-79, 1993). Este sistema, que utiliza vectores de transferencia, se comercializa en el kit Bac-to-Bac™ (Life Technologies, Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, pFastBac1™ (Life Technologies) que contiene un transposón Tn7 para transportar el ADN que codifica el polipéptido de zcytor17 en un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un gran plásmido denominado "bácmido". Véase, Hill-Perkins, M. S. y Possee, R. D., J Gen Virol 71: 971-6, 1990; Bonning, A. C. *et al.*, J Gen Virol 75: 1551-6, 1994; y, Chazembalk, GD, y Rapoport, B., J Biol Chem 270: 1543-9, 1995. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en fase con ADN que codifica una etiqueta epitópica en el extremo C o N del polipéptido de zcytor17 expresado, por ejemplo, una etiqueta epitópica Glu-Glu (Grussenmeyer, T. *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. 82: 7952-4, 1985). Usando una técnica conocida en la materia, un vector de transferencia que contiene zcytor17 se transforma en *E. Coli*, y se explora para bácmidos que contienen un gen lacZ interrumpido indicativo de baculovirus recombinante. El ADN del bácmido que contiene el genoma de baculovirus recombinante se aísla, usando técnicas habituales, y se usa para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, por ejemplo, células Sf9. El virus recombinante que expresa zcytor17 se produce posteriormente. Con los métodos normalmente usados en la técnica se preparan reservas de virus recombinantes.

Los virus recombinantes se usan para infectar células hospedadoras, normalmente una línea celular procedente del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*. Véase, en general, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington, D. C., 1994. Otra línea celular adecuada es la línea celular High FiveO™ (Invitrogen) procedente de *Trichoplusia ni* (Patente de Estados Unidos n.º 5.300.435). Para cultivar y mantener las células se usan medios asépticos disponibles en el comercio. Son medios adecuados Sf900 II™ (Life Technologies) o ESF 921™ (Sistemas de Expresión) para las células Sf9; y ExcellO405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) o Express FiveO™ (Life Technologies) para las células de *T. ni*. Generalmente se usan procedimientos descritos en manuales de laboratorio disponibles (King, L. A. y Possee, R.D., *ibid.*; O'Reilly, D. R. *et al.*, *ibid.*; Richardson, C. D., *ibid.*). La purificación posterior del polipéptido de zcytor17 del sobrenadante puede realizarse usando métodos descritos en el presente documento.

En la presente invención, también pueden usarse células fúngicas, incluyendo células de levadura. Como especies de levadura de particular interés en este aspecto se incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Se desvelan métodos para la transformación de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y para la producción de polipéptidos recombinantes a partir del mismo, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 4.599.311 de Kawasaki; Kawasaki *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.931.373; Brake, Patente de Estados Unidos n.º 4.870.008; Welch *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.037.743.; y Murray *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por fenotipo determinado por el marcador de selección, normalmente resistencia a fármacos o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema de vector preferido para su uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema de vector POT1 desvelado por Kawasaki *et al.* (Patente de Estados Unidos n.º 4.931.373), que permite seleccionar células transformadas por crecimiento en medios que contienen glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para su uso en levaduras incluyen los de los genes de enzimas glucolíticas (véase, por ejemplo, Kawasaki, Patente de Estados Unidos n.º 4.599.311; Kingsman *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.615.974; y Bitter, Patente de Estados Unidos n.º 4.977.092) y genes de la alcohol deshidrogenasa. Véanse también las Patentes de Estados Unidos n.º 4.990.446.; 5.063.154; 5.139.936 y 4.661.454. En la técnica se conocen sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guillemondii* y *Candida maltosa*. Véanse, por ejemplo, Gleeson *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459-3465, 1986 y Cregg, Patente de Estados Unidos n.º 4.882.279. Las células de *Aspergillus* pueden utilizarse de acuerdo con los métodos de McKnight *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.935.349. En Sumino *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.162.228 se desvelan métodos para la transformación de *Acremonium chrysogenum*. En Lambowitz, Patente de Estados Unidos n.º 4.486.533, se desvelan métodos para la transformación de *Neurospora*.

En las publicaciones WIPO WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536, WO 98/02565 se desvela el uso de *Pichia methanolica* como hospedador para la producción de proteínas recombinantes. Las moléculas de ADN para su uso en la transformación de *P. methanolica* se prepararan habitualmente como plásmidos circulares, bicatenarios, que preferentemente, se linealizan antes de la transformación. Para la producción de polipéptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y el terminador en el plásmido sean de un gen de *P. methanolica*, tal como un gen de utilización de alcohol de *P. methanolica* (AUG1 o AUG2). Otros promotores útiles incluyen los de los genes de la dihidroxiacetona sintasa (DHAS), de la formato deshidrogenasa (FMD) y de la catalasa (CAT). Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma del hospedador, se prefiere tener todo el segmento de expresión del plásmido flanqueado en ambos extremos por secuencias de ADN del hospedador. Un marcador de selección preferido para su uso en *Pichia methanolica* es un gen ADE2 de *P. methanolica*, que codifica la fosforribosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), que permite que las células hospedadoras ade2 crezcan en ausencia de adenina. Para procesos industriales a gran escala, donde es deseable minimizar el uso de metanol, se prefiere el uso de células hospedadoras en las que los dos genes de utilización de metanol (AUG1 y AUG2) se delecionan. Para la producción de proteínas secretadas, se prefieren células hospedadoras deficientes en genes de proteasa vacuolar (PEP4 y PRB1). La electroporación se usa para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un polipéptido de interés en células de *P. methanolica*. Se prefiere transformar células de *P. methanolica* mediante electroporación usando un campo eléctrico impulsado, exponencialmente debilitante que tiene una fuerza de campo de 2,5 a 4,5 kV/cm, preferentemente de aproximadamente 3,75 kV/cm, y una constante de tiempo (t) de 1 a 40 milisegundos, más preferentemente de aproximadamente 20 milisegundos.

Las células hospedadoras procariontas, incluyendo cepas de las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus* y de otros géneros, también son células hospedadoras útiles en la presente invención. En la materia se conocen técnicas para transformar estos hospedadores y expresar secuencias de ADN extraño clonadas en su interior (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente). Cuando un polipéptido de zcytor17 se expresa en bacterias, tal como en *E. coli*, el polipéptido puede retenerse en el citoplasma, normalmente como gránulos insolubles, o puede dirigirse al espacio periplasmático mediante 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 puede después replegarse y dimerizarse diluyendo el desnaturalizante, tal como mediante diálisis frente a una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguido de diálisis frente a una solución salina tamponada. En el último caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplasmático en una forma soluble y funcional alterando las células (por ejemplo, mediante ultrasonido o choque osmótico) para liberar el contenido del espacio periplasmático y recuperar la proteína, evitando de este modo tener que efectuar la

desnaturalización y el repliegamiento.

Las células hospedadoras transformadas o transfectadas se cultivan de acuerdo con procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes necesarios para el crecimiento de las células hospedadoras seleccionadas. Una diversidad de medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos, se conoce en la técnica 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 contengan el ADN añadido de forma exógena mediante, por ejemplo, selección de fármacos o deficiencia en un nutriente esencial que está complementado por el marcador de selección transportado en el vector de expresión o cotransfectado en la célula hospedadora. Las células de *P. methanolica* se cultivan en un medio que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y oligoelementos adecuados a una temperatura de aproximadamente 25 ° C a 35 ° C. Los cultivos líquidos se proporcionan con suficiente oxigenación por medios convencionales tales como agitación de frascos pequeños o aspersión de fermentadores. Un medio de cultivo preferido para *P. methanolica* es YEPD (D-glucosa al 2 %, Bacto™ Peptona al 2 % (Difco Laboratories, Detroit, MI), extracto de levadura Bacto™ al 1 % (Difco Laboratories), adenina al 0,004 % y L- leucina al 0,006 %).

En un aspecto de la presente memoria descriptiva, un receptor de citocina zcytor17 (incluyendo dominios transmembrana e intracelulares) se produce mediante una célula cultivada, y la célula se usa para explorar ligandos para el receptor, incluyendo el ligando natural, así como agonistas y antagonistas del ligando natural. Para resumir esta estrategia, un ADNc o un gen que codifica el receptor, se combina con otros elementos genéticos necesarios para su expresión (por ejemplo, un promotor de transcripción), y el vector de expresión resultante se inserta en la célula hospedadora. Las células que expresan el ADN y que producen el receptor funcional se seleccionan y se usan en una variedad de sistemas de exploración.

Las células de mamífero adecuadas para su uso en la expresión de los nuevos polipéptidos receptores de la presente invención y para la transducción de una señal mediada por receptores incluyen células que expresan una subunidad β , tal como gp130, y células que coexpresan receptor de gp130 y de LIF (*leukemia inhibitory factor*, factor inhibidor de leucemia) (Gearing *et al.*, EMBO J. 10: 2839-2848, 1991; Gearing *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.284.755). En este aspecto, generalmente se prefiere emplear una célula que sea sensible a otras citocinas que se unen a receptores en la misma subfamilia, tal como IL-6 o LIF, dado que dichas células contendrán la ruta (o rutas) de transducción de señal necesarias. Las células preferidas de este tipo incluyen células BaF3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al.*, Mol Cell Biol 6: 4133-4135, 1986), la línea celular TF-1 humana (ATCC número CRL-2003) y la línea celular DA-1 (Branch *et al.*, Blood 69: 1782, 1987; Broudy *et al.*, Blood 75: 1622-1626, 1990). Como alternativa, pueden modificarse genéticamente células hospedadoras adecuadas para producir una subunidad β u otro componente celular necesario para la respuesta celular deseada. Por ejemplo, la línea celular murina BaF3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al.*, Mol Cell Biol 6: 4133-4135, 1986), una línea celular renal de cría de hámster (BHK) o la línea celular CTLL-2 (ATCC TIB-214), puede transfectarse para expresar la subunidad gp130 de ratón, o el receptor de gp130 y de LIF de ratón, además de zcytor17. Generalmente, se prefiere el uso de una célula hospedadora y de uno o más receptores de la misma especie, sin embargo esta estrategia permite que las líneas celulares se modifiquen genéticamente para expresar subunidades receptoras múltiples de cualquier especie, superando de este modo posibles limitaciones que surgen de la especificidad de las especies. Como alternativa, pueden clonarse homólogos de especies del ADNc receptor humano y usarse en líneas celulares de la misma especie, tal como ADNc de ratón en la línea celular BaF3. Las líneas celulares que son dependientes del factor de crecimiento hematopoyético, tal como IL-3, pueden por tanto modificarse genéticamente para hacerse dependientes de un ligando de zcytor17 o anticuerpo contra zcytor17.

Las células que expresan zcytor17 funcional se usan en ensayos de exploración. En la técnica se conocen diversos ensayos adecuados. Estos ensayos se basan en la detección de una respuesta biológica en la célula diana. Un ensayo de este tipo es un ensayo de proliferación celular. Las células se cultivan en presencia o en ausencia de un compuesto de ensayo, y la proliferación celular se detecta, por ejemplo, midiendo la incorporación de timidina tritiada o mediante ensayo colorimétrico basado en la reducción o degradación metabólica de Alymar Blue™ (AccuMed, Chicago, IL) o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Mosman, J. Immunol Meth. 65: 55-63, 1983). Un formato de ensayo alternativo usa células que se modifican genéticamente de un modo adicional para expresar un gen indicador. El gen indicador está relacionado con un elemento promotor que es responsable de la ruta relacionada con el receptor, y el ensayo detecta la activación de la transcripción del gen indicador. Un elemento promotor preferido en este sentido es un elemento de respuesta a suero, STAT o SRE (véase, por ejemplo, Shaw *et al.*, Cell 56: 563-572, 1989). Un gen indicador preferido de este tipo es un gen de luciferasa (de Wet *et al.*, Mol. Cell. Biol. 7: 725, 1987). La expresión del gen de luciferasa se detecta mediante luminiscencia usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Baumgartner *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 19094-29101, 1994; Schenborn y Goiffin, Promega Notes 41:11, 1993). Los kits de ensayo con luciferasa se encuentran disponibles en el comercio, por ejemplo, de Promega Corp., Madison, WI. Para la exploración de bibliotecas de compuestos químicos, medios de cultivo celulares acondicionados, caldos fúngicos, muestras de suelo, muestras de agua y similar, pueden usarse líneas de células diana de este tipo. Por ejemplo, en una célula diana, pueden ensayarse muestras de un banco de células o de medios tisulares acondicionados, para identificar células que producen ligandos. Las células positivas se usan después para producir una biblioteca de ADNc en un vector de expresión de células de mamífero, que se divide en

grupos, se transfecta en células hospedadoras y se expresa. Las muestras de medios de las células transfectadas se ensayan después, con división posterior de grupos, retransfección, subcultivo y reensayo de células positivas para aislar una línea de células clonales que expresan el ligando. Las muestras de medios acondicionados por tejidos de riñón, hígado, bazo, timo, otros tejidos linfoides, o linfocitos T, son fuentes preferidas de ligandos para su uso en procedimientos de exploración.

También puede identificarse un ligando natural para zcytor17 mediante la mutagenización de una línea celular dependiente de citocinas que expresa zcytor17 y cultivándola en condiciones que seleccionen el crecimiento autocrino. Véase la publicación WIPO WO 95/21930. En un procedimiento típico, las células que expresan zcytor17 se mutagenizan, tal como con EMS. Después, se deja que las células se recuperen en presencia de la citocina requerida, transfiriéndose a continuación a un medio de cultivo que carece de la citocina. Las células que sobreviven se exploran para la producción de un ligando para zcytor17, tal como, añadiendo al medio de cultivo, polipéptido receptor soluble que comprende el dominio de unión a citocina zcytor17 descrito en el presente documento, para competir contra el ligando o ensayando los medios acondicionados en células de tipo silvestre en comparación con las células transfectadas que expresan el receptor zcytor17. Las líneas celulares preferidas para su uso en este método incluyen células que están transfectadas para expresar gp130 o gp130 en combinación con el receptor de LIF. Dichas líneas de células hospedadoras preferidas incluyen células CTLL-2 transfectadas (Gillis y Smith, *Naturaleza* 268: 154-156, 1977) y células BaF3 transfectadas.

Adicionalmente, puede usarse un método trampa de secreción empleando el polipéptido receptor soluble zcytor17 para aislar un ligando de zcytor17 (Aldrich, *et al*, *Cell* 87: 1161-1169, 1996). Una biblioteca de expresión de ADNc preparada a partir de una fuente de ligando conocida o supuesta, se transfecta en células COS-7. El vector de la biblioteca de ADNc generalmente tiene un origen de SV40 para la amplificación en células COS-7, y un promotor de CMV para una expresión alta. Las células COS-7 transfectadas se cultivan en una monocapa y después se fijan y permeabilizan. El receptor soluble zcytor17 etiquetado o marcado con biotina, descrito en el presente documento, se pone después en contacto con la capa celular y se deja que se una a células en la monocapa que expresan una molécula anti-complementaria, es decir, un ligando de zcytor17. Una célula que expresa un ligando estará, por tanto, unida a moléculas receptoras. Un anticuerpo anti-etiqueta (anti-Ig para fusiones de Ig, M2 o anti-FLAG para fusiones con etiqueta FLAG, estreptavidina, etiqueta anti-Glu-Glu y similares) que se conjuga con peroxidasa de rábano picante (HRP) se usa para visualizar estas células a las que se ha unido el receptor soluble zcytor17 etiquetado o marcado con biotina. La HRP catalizada de deposición de un reactivo de tiramida, por ejemplo, tiramida-FTTC. Para esta detección puede usarse un kit disponible en el comercio (por ejemplo, el Kit de Renaissance TSA-Direct™; NEN Life Science Products, Boston, MA). Las células que expresan el ligando del receptor zcytor17 se identificaran con un microscopio de fluorescencia como células verdes y se seleccionarán para la clonación posterior del ligando usando procedimientos para el rescate de plásmidos como se indica en Aldrich, *et al.*, citados anteriormente, seguido de rondas posteriores de ensayo de trampa de secreción, o exploración convencional de grupos de bibliotecas de ADNc, hasta identificar clones sencillos.

Como un receptor, la actividad del polipéptido de zcytor17 puede medirse mediante un microfisiómetro biosensor basado en silicio, que mide la tasa de acidificación extracelular o la excreción de protones asociada con la unión al receptor y posteriores respuestas celulares fisiológicas. Un dispositivo a modo de ejemplo es el microfisiómetro Cytosensor™ fabricado por Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Mediante este método pueden medirse diversas respuestas celulares, tales como, proliferación celular, transporte de iones, producción de energía, respuesta inflamatoria, activación reguladora y receptora y similar. Véase, 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. El microfisiómetro puede usarse para ensayar células eucariotas, procariotas, adherentes o no adherentes. Midiendo cambios de acidificación extracelular en los medios celulares, a lo largo del tiempo, el microfisiómetro mide directamente respuestas celulares contra diversos estímulos, incluyendo agonistas, ligandos o antagonistas del polipéptido de zcytor17. Preferentemente, el microfisiómetro se usa para medir respuestas de una célula eucariota que expresa zcytor17, en comparación con una célula eucariota de control que no expresa el polipéptido de zcytor17. Las células eucariotas que expresan zcytor17 comprenden células en las que zcytor17 se ha transfectado o infectado mediante un vector de adenovirus, y similar, como se describe en el presente documento, creando una célula que es sensible a estímulos que modulan a zcytor17, o son células que expresan zcytor17 de manera natural, tal como células que expresan zcytor17 procedentes de tejido linfóide, bazo, timo o PBL. Las diferencias, medidas por un aumento o disminución en la acidificación extracelular, en la respuesta de células que expresan zcytor17, respecto a un control, son una medición directa de respuestas celulares moduladas por zcytor17. Además, dichas respuestas moduladas por zcytor17 pueden ensayarse bajo una diversidad de estímulos. Además, usando del microfisiómetro, se proporciona un método para identificar agonistas y antagonistas del polipéptido de zcytor17, que comprende proporcionar células que expresen un polipéptido de zcytor17, cultivar una primera parte de las células en ausencia de un compuesto de ensayo, cultivar una segunda parte de las células en presencia de un compuesto de ensayo, y detectar un aumento o una disminución en una respuesta celular de la segunda parte de las células en comparación con la primera parte de las células. Usando este método pueden identificarse rápidamente antagonistas y agonistas, incluyendo el ligando natural para el polipéptido de zcytor17.

Ensayos adicionales descritos en el presente documento incluyen el uso de polipéptidos receptores híbridos. Estos

polipéptidos híbridos se encuentran en dos clases generales. En la primera clase, el dominio intracelular de zcytor17, que comprende aproximadamente los restos 544 (Lys) a 732 (Val) de SEQ ID NO: 2, los restos 544 (Lys) a 649 (Ile) de SEQ ID NO: 46, o los restos 557 (Lys) a 662 (Ile) de SEQ ID NO: 54, o los restos 551 (Lys) a 662 (Cys) de SEC ID NO: 57, se une al dominio de unión a ligando de un segundo receptor. Se prefiere que el segundo receptor sea un receptor de citocina hematopoyético, tal como el receptor de mpl (Souyri *et al*, Cell 63: 1137-1147, 1990). El receptor híbrido comprenderá adicionalmente un dominio transmembrana, que puede proceder de cualquier receptor. Después, una construcción de ADN que codifica el receptor híbrido se inserta en una célula hospedadora. Las células que expresan el receptor híbrido se cultivan en presencia de un ligando para el dominio de unión y se ensayan para una respuesta. Este sistema proporciona un medio para analizar la transducción de señal mediada por zcytor17 al mismo tiempo que usa ligandos de fácil acceso. Este sistema también puede usarse para determinar si líneas celulares particulares pueden responder a señales transducidas por zcytor17. Una segunda clase de polipéptidos receptores híbridos comprende el dominio extracelular (unión a ligando) (aproximadamente los restos 20 (Ala) a 519 (Glu) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; aproximadamente los restos 33 (Ala) a 532 (Glu) de SEQ ID NO: 54) o el dominio de unión a citocina de zcytor17 (aproximadamente los restos 20 (Ala) a 227 (Pro) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; o aproximadamente los restos 33 (Ala) a 240 (Pro) de SEQ ID NO: 54; aproximadamente los restos 46 (Val) a 533 (Glu) de SEQ ID NO: 57, o aproximadamente los restos 46 (Val) a 533 (Trp) de SEQ ID NO: 93) con un dominio citoplasmático de un segundo receptor, preferentemente un receptor de citocina, y un dominio transmembrana. El dominio transmembrana puede proceder de cualquier receptor. Los receptores híbridos de esta segunda clase se expresan en células que se sabe que pueden responder a señales transducidas por el segundo receptor. En su conjunto, estas dos clases de receptores híbridos permiten el uso de un amplio espectro de tipos de células en sistemas de ensayo basados en receptores.

Las células descubiertas que expresan un ligando para zcytor17 se usan después para preparar una biblioteca de ADNc a partir de la cual puede aislarse el ADNc que codifica el ligando, como se desvela anteriormente. La presente memoria descriptiva describe, además de unos nuevos polipéptidos receptores, métodos para la clonación de ligandos polipeptídicos para los receptores.

La estructura y la expresión en tejidos de zcytor17, sugiere una función en el desarrollo hematopoyético y timocítico temprano y en la regulación de la respuesta inmunitaria o inflamación. Estos procesos implican estimulación de proliferación y diferenciación celular en respuesta a la unión de una o más citocinas con sus receptores afines. A la vista de la distribución tisular observada para este receptor, los agonistas (incluyendo el ligando natural) y antagonistas tienen un enorme potencial en aplicaciones tanto *in vivo* como *in vitro*. Los compuestos identificados como agonistas de receptores son útiles para la estimulación de la proliferación y desarrollo de células diana *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, compuestos agonistas o anticuerpos contra zcytor17, son útiles como componentes de medios de cultivo celular definidos, y pueden usarse en solitario o en combinación con otras citocinas y hormonas para reemplazar el suero que normalmente se usa en el cultivo celular. Los agonistas son por tanto útiles para promover específicamente el crecimiento y/o desarrollo o activación de monocitos, linfocitos T, linfocitos B y otras células de linaje linfóide y mieloide y células hematopoyéticas en cultivo.

Los ligandos agonistas para zcytor17, o anticuerpos contra zcytor17 y compañeros de unión, pueden ser útiles en la estimulación de la inmunidad mediada por células y para la estimulación de la proliferación de linfocitos, tal como en el tratamiento de infecciones que implican inmunosupresión, incluyendo determinadas infecciones víricas. Usos adicionales incluyen supresión tumoral, donde la transformación neoplásica produce células tumorales que son antigénicas. Los ligandos agonistas o anticuerpos contra zcytor17 y compañeros de unión podrían usarse para inducir citotoxicidad, que puede estar mediada a través de la activación de células efectoras, tales como linfocitos T, linfocitos NK (*natural killer*, linfocitos citolíticos naturales), o linfocitos LAK (linfocitos citolíticos activados por células linfoides), o inducida directamente a través de rutas apoptóticas. Los ligandos agonistas, anticuerpos contra zcytor17 y compañeros de unión también pueden ser útiles en el tratamiento de leucopenias, aumentando los niveles del tipo de célula afectada, para potenciar la regeneración del repertorio de linfocitos T después de trasplante de médula ósea; o para potenciar la proliferación o activación de monocitos, y para un uso diagnóstico y otros usos descritos en el presente documento.

Los ligandos antagonistas, compuestos o anticuerpos contra zcytor17 pueden encontrar utilidad en la supresión del sistema inmunitario, tal como en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, incluyendo artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, etc. La inmunosupresión también puede usarse para reducir el rechazo trasplantes e injertos de tejidos u órganos y para tratar leucemias o linfomas específicos de linfocitos T, linfocitos B o monocitos y otros cánceres de células inmunitarias, inhibiendo la proliferación del tipo de célula afectada. Además, los polinucleótidos zcytor17, anticuerpos contra zcytor17 y compañeros de unión pueden usarse para detectar monocitos y ayudar en el diagnóstico de dicha enfermedad autoinmunitaria, particularmente en patologías en las que los monocitos están elevados o activados.

Los polipéptidos de zcytor17 también pueden usarse en sistemas de diagnóstico para la detección de niveles de ligando en la circulación. En un aspecto relacionado, los anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente a polipéptidos receptores zcytor17 pueden usarse para detectar polipéptidos receptores en la circulación. El receptor zcytor17 parece expresarse de manera natural como un receptor soluble, como se muestra mediante las formas receptoras solubles mostradas en la SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 22. Los niveles elevados o reducidos de ligando

o polipéptidos receptores pueden ser indicativos de afecciones patológicas, incluyendo cáncer. Los polipéptidos receptores solubles pueden contribuir a procesos patológicos y pueden ser un marcador indirecto de una enfermedad subyacente. Por ejemplo, niveles elevados de receptor IL-2 soluble en suero humano se han asociado con una amplia variedad de afecciones inflamatorias y neoplásicas, tales como infarto de miocardio, asma, miastenia grave, artritis reumatoide, leucemia de linfocitos T aguda, 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). De manera similar, zcytor17 está elevado en monocitos activados, y por tanto zcytor17 y/o sus receptores solubles pueden asociarse con, o servir como marcador, para afecciones inflamatorias y neoplásicas asociadas con ello.

Un polipéptido de unión a ligando de un receptor zcytor17, o "receptor soluble", puede prepararse usando un ADN truncado que codifica el dominio de unión a citocina de zcytor17 (aproximadamente del resto 20 (Ala) al resto 227 (Pro) del receptor humano de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; aproximadamente del resto 33 (Ala) al resto 240 (Pro) del receptor humano de SEQ ID NO: 54) o el dominio extracelular (aproximadamente del resto 20 (Ala) al resto 519 (Glu) de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; aproximadamente del resto 33 (Ala) al resto 532 (Glu) de SEQ ID NO: 54) o la región correspondiente de un receptor no humano, por ejemplo, tal como las regiones correspondientes descritas en el presente documento para la SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 93. Se prefiere que el dominio extracelular se prepare en una forma sustancialmente libre de segmentos polipeptídicos transmembrana e intracelular. Además, los fragmentos polipeptídicos de unión a ligando dentro del dominio de unión de citocina de zcytor17 descrito anteriormente, también pueden servir como receptores solubles de zcytor17 para los usos descritos en el presente documento. Para dirigir la exportación de un polipéptido receptor de la célula hospedadora, el ADN receptor se liga a un segundo segmento de ADN que codifica un péptido secretor, tal como un péptido secretor t-PA o un péptido secretor zcytor17. Para facilitar la purificación del polipéptido receptor secretado, una extensión C terminal, tal como una etiqueta de polihistidina, un péptido de etiqueta Glu-Glu, sustancia P, péptido Flag™ (Hopp *et al.*, Bio/Technology 6: 1204-1210, 1988; disponible en Eastman Kodak Co., New Haven, CT) u otro polipéptido o proteína para el cual está disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico, puede fusionarse al polipéptido receptor.

En una estrategia alternativa, un dominio extracelular receptor puede expresarse como una fusión con regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina, normalmente un fragmento F_c (por ejemplo, Fc4), que contiene dos dominios de región constante y que carece de la región variable. Dichas fusiones se secretan normalmente como moléculas multiméricas en las que las partes F_c se unen entre sí por enlaces disulfuro y dos polipéptidos receptores se disponen muy próximos entre sí. Las fusiones de este tipo pueden usarse para purificar por afinidad el ligando afin de la solución, como una herramienta de ensayo *in vitro*, para bloquear señales *in vitro* ajustando específicamente el ligando, y como antagonistas *in vivo* administrándolas por vía parenteral para unirse al ligando en circulación y eliminándolo de la misma. Para purificar el ligando, una quimera de zcytor17-Ig se añade a una muestra que contiene el ligando (por ejemplo medio de cultivo celular acondicionado o extractos tisulares) en condiciones que faciliten la unión del receptor con el ligando (normalmente a una temperatura, pH y fuerza iónica, casi fisiológicas). El complejo quimera-ligando se separa después de la mezcla usando la proteína A, que se inmoviliza en un soporte sólido (por ejemplo, perlas de resina insolubles). Después, el ligando se eluye usando técnicas químicas convencionales, tal como con un gradiente de sal o de pH. Como alternativa, la propia quimera puede unirse a un soporte sólido, realizándose la unión y la elución como se ha indicado anteriormente. Las fracciones recogidas pueden volver a fraccionarse hasta alcanzar el nivel de pureza deseado.

Adicionalmente, pueden usarse receptores zcytor17 solubles como un "drenaje de ligando", es decir, antagonistas, para unir el ligando *in vivo* o *in vitro* en aplicaciones terapéuticas u otras aplicaciones en las que no se desea la presencia de ligando. Por ejemplo, en cánceres que están expresando una gran cantidad de ligando zcytor17 bioactivo, pueden usarse receptores solubles zcytor17 como un antagonista directo del ligando *in vivo*, y pueden ayudar a reducir la progresión y síntomas asociados con la enfermedad. Adicionalmente, el receptor soluble zcytor17 puede usarse para retrasar la progresión de cánceres que sobreexpresan receptores zcytor17, uniendo el ligando *in vivo*, lo que podría, de otra manera, potenciar la proliferación de esos cánceres. Aplicaciones similares *in vitro* para un receptor soluble zcytor17 pueden usarse, por ejemplo, como una selección negativa para seleccionar líneas celulares que crecen en ausencia de ligando zcytor17.

Además, el receptor soluble zcytor17 puede usarse *in vivo* o en aplicaciones de diagnóstico para detectar cánceres que expresan el ligando zcytor17 *in vivo* o en muestras de tejido. Por ejemplo, el receptor soluble zcytor17 puede conjugarse con un radiomarcador o con un marcador fluorescente, como se describe en el presente documento, y usarse para detectar la presencia del ligando en una muestra de tejido usando un ensayo de unión de tipo ligando-receptor *in vitro*, o un ensayo de formación de imágenes fluorescentes. Además, podría administrarse *in vivo* un receptor soluble zcytor17 radiomarcado para detectar tumores sólidos que expresan ligandos a través de un método de formación de radioimágenes conocido en la técnica.

Los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, tienen particular uso en el grupo de monocitos/macrófagos del sistema inmunitario. Por ejemplo, el interferón gamma (IFN γ) es un fuerte activador de fagocitos mononucleares. El aumento en la expresión de zcytor17 después de la activación de células THP-1 (ATCC n.º TIB-202) con interferón gamma sugiere que este receptor está implicado en la activación de monocitos. Los monocitos son células incompletamente diferenciadas que migran a diversos tejidos en donde maduran y se convierte en macrófagos. Los macrófagos desempeñan una función esencial en la respuesta

inmunitaria presentando el antígeno a linfocitos y desempeñando una función de soporte como células accesorias a linfocitos secretando numerosas citocinas. Los macrófagos pueden internalizar moléculas extracelulares y después de la activación tienen una capacidad aumentada para destruir microorganismos intracelulares y células tumorales. Los macrófagos activados también están implicados en la estimulación de inflamación aguda o local. Además, se ha

5 mostrado que la función de monocitos-macróforos es anómala en diversas patologías. Véase, por ejemplo, Johnston, RB, New Eng. J. Med. 318: 747-752, 1998.

Un experto en la técnica reconocería que los agonistas de zcytor17 son útiles. Por ejemplo, se ha descrito migración reducida de monocitos en poblaciones con una predisposición a infección, tal como en recién nacidos, pacientes que

10 reciben corticosteroides u otra terapia inmunosupresora y pacientes con diabetes mellitus, quemaduras o SIDA. Los agonistas para zcytor17, tales como anticuerpos contra zcytor17 y compañeros de unión, así como el ligando natural, podrían dar como resultado un aumento en la capacidad de los monocitos para migrar y posiblemente prevenir la infección en estas poblaciones. También hay un defecto profundo de destrucción fagocítica mediante

15 fagocitos mononucleares de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. Esto produce la formación de abscesos subcutáneos así como abscesos en el hígado, pulmones, bazo y ganglios linfáticos. Un agonista de zcytor17 tal como anticuerpos contra zcytor17 y compañeros de unión, así como el ligando natural, podrían corregir o mejorar este efecto fagocítico. Además, se ha comunicado citotoxicidad de monocitos defectuosa en pacientes con

20 cáncer y síndrome de Wiskott-Aldrich (eccema, trombocitopenia e infecciones recurrentes). La activación de monocitos mediante agonistas de zcytor17 tales como anticuerpos contra zcytor17 y compañeros de unión, así como el ligando natural, podrían ayudar en el tratamiento de estas afecciones. El sistema monocito-macróforos está notablemente implicado en diversas enfermedades de almacenamiento de lípidos (esfingolipidosis) tal como la enfermedad de Gaucher. La resistencia a infección puede mejorarse debido a un defecto en la función de

25 macróforos, que podría tratarse con agonistas contra zcytor17 tales como anticuerpos contra zcytor17 y compañeros de unión, así como el ligando natural.

Adicionalmente, un experto en la técnica reconocería que los antagonistas de zcytor17 son útiles. Por ejemplo, en lesiones ateroscleróticas, una de las primeras anomalías es la localización de monocitos/macróforos en células

30 endoteliales. Estas lesiones podrían prevenirse con el uso de antagonistas contra zcytor17. Los anticuerpos contra zcytor17 y compañeros de unión también pueden usarse como antagonistas contra el ligando natural de zcytor17. Adicionalmente, la leucemia monoblástica está asociada con diversas anomalías clínicas que reflejan la liberación de los productos biológicos de los macróforos, cuyos ejemplos incluyen altos niveles de lisozima en el suero y orina y fiebre alta. Adicionalmente, dichas leucemias presentan un aumento anómalo de células monocíticas. Estos efectos podrían prevenirse posiblemente con antagonistas contra zcytor17, tal como se describe en el presente documento. Adicionalmente, los anticuerpos contra zcytor17 y compañeros de unión pueden conjugarse con moléculas tales

35 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 zcytor17 en las patologías desveladas en el presente

40 documento, inflamación, cáncer o infección así como otras patologías que implican células monocíticas. Además, como zcytor17 se expresa de una manera específica de monocito, 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 agentes de diagnóstico para detectar dichas anomalías de células monocíticas e indicar la presencia de enfermedad. Dichos métodos implican tomar una

45 muestra biológica de un paciente, tal como sangre, saliva, o una biopsia y compararla con una muestra de control normal. Pueden usarse métodos histológicos, citológicos, de citometría de flujo, bioquímicos u otros para determinar los niveles relativos o la localización de zcytor17, o de células que expresan zcytor17, es decir, monocitos, en la muestra del paciente en comparación con el control normal. Un cambio en el nivel (aumento o disminución) de la expresión de zcytor17, o un cambio en el número o localización de monocitos (por ejemplo, un aumento o infiltración

50 de células monocíticas en tejidos en los que no están normalmente presentes) en comparación con un control, sería indicativo de enfermedad. Dichos métodos de diagnóstico también pueden incluir el uso de etiquetas radiométricas, fluorescentes y colorimétricas unidas a los polinucleótidos, polipéptidos o anticuerpos de la presente invención. Dichos métodos son muy conocidos en la técnica y se desvelan en el presente documento.

Las secuencias de aminoácidos que tienen actividad de Zcytor17 pueden usarse para modular el sistema inmunitario uniéndose al ligando de Zcytor17, y por lo tanto, impidiendo la unión del ligando de Zcytor17 con el receptor Zcytor17

55 endógeno. Los antagonistas de Zcytor17, tales como anticuerpos contra Zcytor17, también pueden usarse para modular el sistema inmunitario inhibiendo la unión del Zcytor17 del ligando de Zcytor17 con el receptor Zcytor17 endógeno. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva describe el uso de proteínas, polipéptidos y péptidos que tienen actividad de Zcytor17 (tales como polipéptidos de Zcytor17, análogos de Zcytor17 (por ejemplo anticuerpos contra Zcytor17 antiidiotipo), y proteínas de fusión de Zcytor17) a un sujeto que carece de una cantidad adecuada de este polipéptido, o que produce un exceso de ligando de Zcytor17. Los antagonistas de Zcytor17 (por

60 ejemplo anticuerpos contra Zcytor17) también pueden usarse para tratar a un sujeto que produce un exceso de ligando de Zcytor17 o de Zcytor17. Los sujetos adecuados incluyen mamíferos tales como seres humanos.

65

Se ha mostrado que Zcytor17 está regulado positivamente en células monocíticas, y que puede estar implicado en la regulación de la inflamación. Como tales, los polipéptidos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden ensayarse y usarse con respecto a su capacidad de modificar la inflamación, o pueden usarse como un marcador para la inflamación. En la técnica se conocen métodos para determinar calidades proinflamatorias y antiinflamatorias de zcytor17 y se analizan en el presente documento. Además, puede estar implicado en la regulación positiva de la producción de reactantes de fase aguda, tal como amiloide A sérico (SAA), $\alpha 1$ antiqumotripsina, y haptoglobina, y la expresión del ligando de zcytor17 puede estar aumentada después de la inyección de lipopolisacárido (LPS) *in vivo* que está implicado en respuestas inflamatorias (Dumoutier, L. *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000). La producción de proteínas de fase aguda, tales como (SAA), se considera como un mecanismo de supervivencia a corto plazo en el que la inflamación es beneficiosa; sin embargo, el mantenimiento de proteínas de fase aguda durante periodos más largos contribuye a 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 Gauldie, J. Immunology Today 15: 74-80, 1994. Además, la proteína de fase aguda SAA, está implicada en la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias crónicas, en la aterosclerosis y artritis reumatoide, y es la precursora de la proteína A amiloidea, depositada en la amiloidosis (Uhlar, CM y Whitehead, citado anteriormente). Por tanto, cuando un ligando para zcytor17 que actúa como una molécula proinflamatoria e induce la producción de SAA, los antagonistas serían útiles en el tratamiento de enfermedad inflamatoria y otras enfermedades asociadas con proteínas de respuesta de fase aguda inducida por el ligando. Dichos antagonistas se describen en el presente documento. Por ejemplo, un método para la reducción de la inflamación comprende la administración, a un mamífero con inflamación, de una cantidad de una composición de receptor que comprende zcytor17 soluble, o anticuerpo contra zcytor17, que sea suficiente para reducir la inflamación. Adicionalmente, un método de supresión de una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación puede comprender: (1) determinar un nivel de proteína amiloide A sérica; (2) administrar, en un vehículo farmacéutico aceptable, una composición que comprenda un polipéptido receptor de citocina zcytor17 soluble como se describe en el presente documento; (3) determinar un nivel de administración posterior de proteína amiloide A sérica; (4) comparar el nivel de proteína amiloide A sérica en la etapa (1) con el nivel de proteína amiloide A sérica en la etapa (3), en el que una ausencia de aumento o una disminución en el nivel de proteína amiloide A sérica es indicativa de supresión de una respuesta inflamatoria.

La presente memoria descriptiva describe receptores que incluyen al menos una subunidad del receptor zcytor17. Un segundo polipéptido receptor incluido en el receptor soluble heterodimérico pertenece a la subfamilia de receptores que incluye las subunidades de receptores de citocinas de clase I. Además de un polipéptido receptor zcytor17 monomérico u homodimérico, un receptor zcytor17 soluble heterodimérico, como se ilustra en una realización que comprende un componente heterodimérico de receptor de Clase I + receptor zcytor17 soluble, puede actuar como un antagonista del ligando de zcytor17 natural. La memoria descriptiva también describe receptores multiméricos solubles que comprenden zcytor17.

El análisis de la distribución tisular del ARNm correspondiente al ADNc de zcytor17 mostró que el nivel de ARNm era más alto en monocitos y en células de próstata, y que era elevado en monocitos activados y en células CD4+ activadas, CD8+ activadas, y CD3+ activadas. Por tanto, zcytor17 está implicado en la inducción de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. La presente memoria descriptiva describe el uso de heterodímeros de zcytor17 solubles como antagonistas en enfermedades inflamatorias e inmunitarias o afecciones tales como pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Grave, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad de Crohn, cáncer de colon e intestinal, diverticulosis, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, trasplante de órganos o médula ósea; inflamación debido a traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad de injerto contra huésped; y en las que la inhibición de la inflamación, supresión inmunitaria, reducción de proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (incluyendo linfocitos Th1 y Th2, linfocitos CD4+ y CD8+), supresión de respuesta inmunitaria contra un patógeno o antígeno. Además la presencia de la expresión de zcytor17 en células inmunitarias activadas tales como células CD4+ y CD19+ muestra que zcytor17 puede estar implicado en las reacciones de defensa inmunitaria del organismo contra invasores extraños: tales como microorganismos y desechos celulares, y desempeñarían una función en las respuestas inmunitarias durante la inflamación y formación de cáncer. Como tales, los anticuerpos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, que son agonistas o antagonistas de la función de zcytor17, pueden usarse para modificar la respuesta inmunitaria y la inflamación.

Además, los anticuerpos o polipéptidos de unión que unen a polipéptidos, monómeros, homodímeros, heterodímeros y multímeros de zcytor17, descritos en el presente documento y/o los propios polipéptidos, monómeros, homodímeros, heterodímeros y multímeros de zcytor17 son útiles para:

- 1) Antagonizar o bloquear la señalización mediante los receptores zcytor17 en el tratamiento de inflamación aguda, inflamación como resultado de traumatismo, lesión de tejidos, cirugía, septicemia o infección, y enfermedades inflamatorias crónicas, tales como asma, enfermedad intestinal inflamatoria (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 con la inducción de la respuesta de fase aguda.
- 2) Antagonizar o bloquear la señalización mediante los receptores zcytor17 en el tratamiento de enfermedades

- autoinmunitarias tales como IDDM, esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (SLE), miastenia grave, artritis reumatoide e IBD para prevenir o inhibir la señalización en células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos, monocitos, leucocitos) mediante zcytor17 (Hughes C *et al*, J. Immunol 153: 3319-3325, 1994). Como alternativa, también pueden usarse anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales (mAb) contra receptores que comprenden zcytor17, como un antagonista para agotar células inmunitarias no deseadas para tratar enfermedades autoinmunitarias. El asma, la alergia y otras enfermedades atópicas pueden tratarse con un mAb contra, por ejemplo, receptores solubles zcytor17 o heterodímeros zcytor17/CRF2-4, para inhibir la respuesta inmunitaria o para agotar células ofensivas. El bloqueo o la inhibición de la señalización mediante zcytor17, usando los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, también pueden beneficiar a enfermedades de las células del páncreas, del riñón, de la pituitaria y neuronales. La IDDM, NIDDM, pancreatitis y el carcinoma pancreático pueden beneficiarse. Zcytor17 puede servir como una diana para carcinoterapia con mAb, donde un mAb antagonizante inhibe el crecimiento del cáncer y se dirige a la destrucción mediada por el sistema inmunitario (Holliger P y Hoogen-boom, H: Nature Biotech. 16: 10151016, 1998). Los mAb contra monómeros, homodímeros, heterodímeros y multímeros de zcytor17 soluble también pueden ser útiles para tratar neuropatías tales como glomeruloesclerosis, neuropatía membranosa, amiloidosis (que, entre otros tejidos, también afecta a los del riñón), arteriosclerosis renal, glomerulonefritis de diversos orígenes, enfermedades fibroproliferativas del riñón, así como disfunción renal asociada con SLE, IDDM, diabetes de 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 anticuerpos monoclonales contra zcytor17, contra heterodímero y multímero 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 auxiliares contra un patrón alternativo de secreción de citocina puede desviar una respuesta autoinmunitaria para mejorar la enfermedad (Smith JA *et al*, J. Immunol 160: 4841 a 4849, 1998). De manera similar, los anticuerpos monoclonales agonistas contra zcytor17, contra heterodímero y multímero, pueden usarse para señalar, agotar y desviar células inmunitarias implicadas en asma, alergia y enfermedad atópica. La señalización mediante zcytor17 también puede beneficiar a enfermedades de las células del páncreas, del riñón, de la pituitaria y neuronales. La IDDM, NIDDM, pancreatitis y carcinoma pancreático pueden beneficiarse. Zcytor17 puede servir como una diana para carcinoterapia pancreática con MAb, donde una señalización de mAb inhibe el crecimiento del cáncer y dirige la destrucción mediada por el sistema inmunitario (Tutt, AL *et al*, J Immunol 161: 3175-3185, 1998). De manera similar, leucemias específicas de linfocitos T, linfomas y carcinoma pueden tratarse con anticuerpos monoclonales de la presente invención, tales como los indicados en las reivindicaciones.
- Los polipéptidos de zcytor17 solubles monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos descritos en el presente documento pueden usarse para neutralizar/bloquear la actividad del ligando de zcytor17 en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, enfermedad atópica, NIDDM, pancreatitis y disfunción renal como se describe anteriormente. Una forma soluble de zcytor17 puede usarse para promover una respuesta de anticuerpos mediada por linfocitos T y/o promover la producción de IL-4 u otras citocinas mediante linfocitos u otras células inmunitarias.
- Los polipéptidos receptores que comprenden zcytor17 soluble de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, son útiles como antagonistas de su ligando natural. Dichos efectos antagonistas pueden realizarse por neutralización directa o unión de su ligando natural. Además de los usos antagonistas, los polipéptidos receptores solubles de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden unirse al ligando zcytor17 y actuar como proteínas transportadoras para el ligando, para transportar el ligando a diferentes tejidos, órganos y células en el organismo. Como tales, los polipéptidos receptores solubles de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden fusionarse o acoplarse a moléculas, polipéptidos o restos químicos que dirigen el complejo receptor soluble-ligando a un sitio específico, tal como a un tejido, a una célula inmunitaria específica, a monocitos o a un tumor. Por ejemplo, en infección aguda o en algunos cánceres, el beneficio puede resultar de la inducción de la inflamación y de proteínas de respuesta de fase aguda local. Por tanto, los polipéptidos receptores solubles de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden usarse para dirigir específicamente la acción de un ligando proinflamatorio. Véase, Cosman, D. Cytokine 5: 95-106, 1993; y Fernandez-Botran, R. Exp. Opin. Invest. Drugs 9: 497-513,2000.
- Además, los polipéptidos receptores solubles de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden usarse para estabilizar el ligando de zcytor17, para aumentar la biodisponibilidad, la longevidad terapéutica y/o eficacia del ligando estabilizando el ligando de la degradación o eliminación, o direccionando el ligando a un sitio de acción dentro del organismo. Por ejemplo, el complejo IL-6/IL-6R soluble de origen natural, estabiliza IL-6 y puede señalar a través del receptor de gp130. Véase, Cosman, D. citado anteriormente, y Fernandez-Botran, R. citado anteriormente. Además, Zcytor17 puede combinarse con un ligando afín, tal como con su ligando para que comprenda un complejo ligando/receptor soluble. Dichos complejos pueden usarse para estimular respuestas de células que presentan una subunidad receptora acompañante. La especificidad celular de complejos zcytor17/ligando puede diferenciarse de la observada para el ligando administrado en solitario. Adicionalmente los complejos pueden tener propiedades farmacocinéticas distintas tales como las que afectan a la semivida, dosis/respuesta y especificidad de órgano o tejido. Los complejos Zcytor17/ ligando pueden tener por tanto actividad agonista para potenciar una respuesta inmunitaria o estimular células mesangiales o para estimular células

5 hepáticas. Como alternativa únicamente los tejidos que expresan una subunidad de señalización de los heterodímeros con el complejo pueden estar afectados de manera análoga a la respuesta contra complejos IL6/IL6R (Hirota H. *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. 92: 4862-4866, 1995; Hirano, T. in Thomason, A. (Ed.) "The Cytokine Handbook", 3ª Ed., p. 208-209). Los complejos receptor soluble/citocina para IL12 y CNTF presentan actividades similares.

10 Los polipéptidos receptores Zcytor17 homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos también pueden usarse en sistemas de diagnóstico para la detección de niveles de ligando en la circulación y en la detección de respuestas inflamatorias de fase aguda. En una realización relacionada, los anticuerpos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden usarse para detectar polipéptidos receptores en la circulación; por el contrario, los propios receptores solubles Zcytor17 pueden usarse para detectar polipéptidos ligando en la circulación o que actúan localmente. Niveles elevados o reducidos de polipéptidos ligando o receptores pueden ser indicativos de afecciones patológicas, incluyendo inflamación o cáncer. Además, la detección de proteínas o moléculas de fase aguda, tales como ligando zcytor17 puede ser indicativa de una afección inflamatoria crónica en determinadas patologías (por ejemplo, artritis reumatoide). La detección de dichas afecciones sirve como ayuda para realizar el diagnóstico de la enfermedad, así como de ayuda al médico para seleccionar la terapia apropiada.

20 La diferenciación es un proceso progresivo y dinámico, que comienza con células madre pluripotentes y termina con células terminalmente diferenciadas. Las células madre pluripotentes que pueden regenerarse sin compromiso a un linaje expresan un conjunto de marcadores de diferenciación que se pierden cuando se hace un compromiso de linaje celular. Las células progenitoras expresan un conjunto de marcadores de diferenciación que pueden o no continuar expresándose a medida que las células progresan hacia abajo de la ruta de linaje celular hacia la maduración. Los marcadores de diferenciación expresados exclusivamente por células maduras son propiedades normalmente funcionales tales como productos celulares, enzimas para producir productos celulares y receptores. La fase de diferenciación de una población celular se controla por identificación de marcadores presentes en la población celular. Se piensa que los miocitos, osteoblastos, adipocitos, condrocitos, fibroblastos y células reticulares se originan de una célula madre mesenquimática común (Owen *et al.*, Ciba Fdn. Sump. 136: 42-46. 1988). Los marcadores para células madre mesenquimáticas no se han identificado bien (Owen *et al.*, J. of Cell Sci. 87: 731-738, 1987), de manera que la identificación normalmente se realiza en las fases de células progenitoras y maduras. Los nuevos polipéptidos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden ser útiles en estudios para aislar células madre mesenquimáticas y miocitos u otras células progenitoras, tanto *in vivo* como *ex vivo*.

35 Existen pruebas que sugieren que los factores que estimulan o regulan tipos de células específicos hacia abajo de una ruta hacia la diferenciación o desdiferenciación terminal, afectan a toda la población de células que se origina de un precursor común o de una célula madre, y pueden usarse para estimular o inhibir la proliferación de células linfoides, células hematopoyéticas y células endoteliales. Por tanto, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden tener uso en la inhibición de células tumorales, y particularmente de células tumorales linfoides, hematopoyéticas, prostáticas, endoteliales y tiroideas.

40 Los ensayos para medir la diferenciación incluyen, por ejemplo, la medición de marcadores celulares asociados con la expresión, específica de fase, de un tejido, actividad enzimática, actividad funcional o cambios morfológicos (Watt, FASEB, 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989). Como alternativa, el propio polipéptido de zcytor17 puede servir como un marcador adicional de superficie celular o secretado, asociado con la expresión, específica de fase, de un tejido. Como tal, la medición directa del polipéptido de zcytor17, o su pérdida de expresión en un tejido a medida que se diferencia, puede servir como un marcador para la identificación o diferenciación, por ejemplo, de tejido prostático o células monocíticas.

50 De manera similar, la medición directa del polipéptido de zcytor17, o su pérdida de expresión en un tejido, puede determinarse en un tejido o células a medida que experimenta progresión tumoral. El aumento de la invasividad y motilidad de las células, o la ganancia o pérdida de expresión de zcytor17 en una afección precancerosa o cancerosa, en comparación con tejido normal, puede servir como un diagnóstico para la transformación, invasión y metástasis en la progresión tumoral. Como tal, el conocimiento de una fase de progresión tumoral o metástasis ayudará al médico a escoger la terapia más adecuada, o la agresividad del tratamiento, para un paciente con cáncer individual determinado. En la técnica se conocen bien métodos de medición de ganancia y pérdida de expresión (de ARNm o de proteína) y se describen en el presente documento, y pueden aplicarse para la expresión de zcytor17. Por ejemplo, la aparición o desaparición de polipéptidos que regulan la motilidad celular puede usarse para ayudar en el diagnóstico y pronóstico de cáncer de próstata (Banyard, J. y Zetter, B. R., Cancer and Metast. Rev. 17: 449-458, 1999). Como un efector de motilidad, activación, proliferación, o diferenciación celular, la ganancia o pérdida de expresión de zcytor17 puede servir como un diagnóstico para cáncer linfóide, hematopoyético, de próstata, endotelial, tiroideo y otros cánceres.

65 Además, como zcytor17 es específico de monocitos y de próstata, pueden usarse sondas polinucleotídicas, anticuerpos contra zcytor17, y polipéptidos de detección de la presencia de zcytor17 en tejidos para evaluar si están presentes monocitos o tejido protático, por ejemplo, después de cirugía que implique la extirpación de una próstata

enferma o cancerosa, o en la evaluación de infiltración de monocitos en tejidos enfermos o infectados o cánceres de monocitos. Como tales, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden usarse como una ayuda para determinar si se extirpa todo el tejido prostático después de cirugía, por ejemplo, después de cirugía para el cáncer de próstata. En dichos casos, es especialmente importante extirpar todo el tejido posiblemente enfermo para maximizar la recuperación del cáncer y para minimizar la recurrencia. Además, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden usarse como una ayuda para determinar si en los tejidos enfermos, (por ejemplo, inflamados o infectados), hay infiltración de monocitos, para controlar la recuperación de enfermedades o cánceres. Las realizaciones preferidas incluyen anticuerpos contra zcytor17 fluorescentes, radiomarcados, o marcados calorimétricamente, y compañeros de unión de polipéptidos de zcytor17, que pueden usarse histológicamente o *in situ*.

Por otra parte, la actividad y el efecto de zcytor17 sobre la progresión y metástasis tumoral pueden medirse *in vivo*. Se han desarrollado diversos modelos de ratón singénico para estudiar la influencia de polipéptidos, compuestos u otros tratamientos sobre la progresión tumoral. En estos modelos, las células tumorales con pasen en cultivo, se implantan en ratones de la misma cepa que la del donante del tumor. Las células se desarrollarán en tumores que tienen similares características en el ratón receptor, y también se producirá la metástasis en algunos de los modelos. Los modelos tumorales apropiados de nuestros estudios incluyen, entre otros, carcinoma de pulmón de Lewis (ATCC n.º CRL-1642) y melanoma B16 (ATCC n.º CRL-6323). Estas dos líneas son líneas tumorales, que se usan habitualmente, singénicas para el ratón C57BL6, que se cultivan y manipulan fácilmente *in vitro*. Los tumores resultantes de la implantación de cualquiera de estas líneas celulares pueden metastatizar en el pulmón en ratones C57BL6. El modelo de carcinoma de pulmón de Lewis se ha usado recientemente en ratones para identificar un inhibidor de la angiogénesis (O'Reilly MS, *et al.* Cell 79: 315-328, 1994). Ratones C57BL6/J se tratan con un agente experimental bien a través de inyección diaria de proteína, agonista o antagonista recombinante o con una inyección una vez de adenovirus recombinante. Tres días después de este tratamiento, se implantan de 10^5 a 10^6 células en la piel dorsal. Como alternativa, las propias células pueden infectarse con adenovirus recombinante, tal como uno que exprese zcytor17, antes del implante, de manera que la proteína se sintetiza en el sitio del tumor o intracelularmente, en lugar de sistémicamente. Los ratones normalmente desarrollan tumores visibles a los 5 días. Los tumores se dejan crecer durante un período de hasta 3 semanas, tiempo durante el cual pueden alcanzar un tamaño de 1500 - 1800 mm³ en el grupo tratado con control. A lo largo del experimento el tamaño del tumor y el peso corporal se monitorizan detenidamente. A la hora del sacrificio, el tumor se extirpa y se pesa junto con los pulmones y el hígado. Se ha mostrado que el peso de los pulmones se correlaciona bien con la carga tumoral metastásica. Como una medición adicional, se cuenta la metástasis de la superficie pulmonar. El tumor, los pulmones y el hígado resecaados se preparan para el examen histopatológico, inmunohistoquímico, e hibridación *in situ*, usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. Por tanto puede evaluarse la influencia del polipéptido expresado en cuestión, por ejemplo, zcytor17, sobre la capacidad del tumor para reclutar vasculatura y experimentar metástasis. Además, aparte del uso de adenovirus, las células implantadas pueden transfectarse de manera transitoria con zcytor17. En la técnica se conoce el uso de transfectantes de zcytor17 estables, así como el uso de promotores inducibles para activar la expresión de zcytor17 *in vivo* y puede usarse en este sistema para evaluar la inducción de metástasis de zcytor17. Adicionalmente, en este modelo de ratón, puede inyectarse directamente medio acondicionado de zcytor17 o zcytor17 purificado, y por tanto usarse en este sistema. Para una referencia general, véase, O'Reilly MS, *et al.* Cell 79: 315-328, 1994; y Rusciano D, *et al.* Murine Models of Liver Metastasis. Invasion Metastasis 14: 349-361, 1995.

La actividad de zcytor17 y de sus derivados (conjugados) sobre el crecimiento y diseminación de células tumorales procedentes de neoplasias hematológicas humanas también puede medirse *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de ratón. Se han desarrollado diversos modelos de ratón en los que se implantan células tumorales humanas en ratones inmunodeficientes, denominados en su conjunto modelos de xenoinjerto. Véase Cattan, AR y Douglas, E Leuk. Res. 18: 513-22, 1994; y Flavell, DJ, Hematological Ontology 14: 67-82, 1996. Las características del modelo de enfermedad varían con el tipo y con la cantidad de células administradas al ratón. Normalmente, las células tumorales proliferarán rápidamente y podrán encontrarse circulando en la sangre y estableciéndose en numerosos sistemas orgánicos. Como estrategias terapéuticas apropiadas para el ensayo en dicho modelo se incluyen terapias basadas en toxicidad inducida por anticuerpos, conjugados de ligando-toxina o basadas en células. El último método, normalmente denominado inmunoterapia adoptiva, implica el tratamiento del animal con componentes del sistema inmunitario humano (es decir, linfocitos, células NK) y puede incluir la incubación de células *ex vivo* con zcytor17 o con otros agentes inmunomoduladores.

El ARNm que corresponde a este nuevo ADN, que mostró expresión en tejidos linfoides, incluyendo timo, se expresó en médula ósea y próstata, monocitos y monocitos activados, linfocitos B CD19+, y puede expresarse en bazo, ganglios linfáticos y leucocitos de sangre periférica. Estos datos indican un papel para el receptor zcytor17 en la proliferación, diferenciación y/o activación de células inmunitarias y sugiere un papel en el desarrollo y en la regulación de respuestas inmunitarias. Los datos también sugieren que la interacción de zcytor17 con su ligando puede estimular la proliferación y el desarrollo de células mieloides y puede, al igual que IL-2, IL-6, LIF, IL-11, IL-12 y OSM (Baumann *et al.*, J. Biol Chem 268: 8414-8417, 1993), inducir la síntesis de proteínas de fase aguda en hepatocitos.

Se prefiere purificar los polipéptidos de la presente invención a una pureza de $\geq 80\%$, más preferentemente a una pureza de $\geq 90\%$, incluso más preferentemente a una pureza de $\geq 95\%$, y particularmente se prefiere un estado puro desde el punto de vista farmacéutico, con una pureza mayor de 99,9%, con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y libre de agentes infecciosos y pirogénicos.

5 Preferentemente, un polipéptido purificado carece sustancialmente de otros polipéptidos, particularmente de otros polipéptidos de origen animal.

Los polipéptidos de zcytor17 recombinantes (o polipéptidos de zcytor17 quiméricos o de fusión) expresados, pueden purificarse usando fraccionamiento y/o métodos y medios de purificación convencionales. La precipitación con sulfato de amonio y ácido o la extracción caotrópica pueden usarse para el fraccionamiento de muestras. Las etapas de purificación a modo de ejemplos pueden incluir hidroxapatita, exclusión por tamaño, FPLC y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa. Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poli(acrilamida), sílices de especialidad, y similares. Se prefieren derivados de PEI, DEAE, QAE y Q. Los medios cromatográficos a modo de ejemplos incluyen los medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como Fenil-Sefarosa FF (Farmacia), Toyopearl butilo 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octil-Sefarosa (Farmacia) y similares; o resinas poli(acrilicas), tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticuladas, perlas de poliestireno, resinas de poli(acrilamida) reticuladas y similares que son insolubles en las condiciones en las que se van a usar. Estos soportes pueden modificarse con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas mediante grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de hidratos de carbono. Los ejemplos de química de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con *N*-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida, y derivados carboxilo y amino para químicas de acoplamiento con carbodiimida. Estos y otros medios sólidos se conocen bien y se usan ampliamente en la técnica, y se encuentran disponibles en proveedores comerciales. En la técnica se conocen bien métodos para la unión de polipéptidos receptores a medios de soporte. La selección de un método particular es una cuestión de diseño rutinario y viene determinada, en parte, por las propiedades del soporte seleccionado. Véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography Principles & Methods*, Farmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988.

Los polipéptidos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden aislarse aprovechando sus propiedades bioquímicas, estructurales y biológicas. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de adsorción por iones metálicos inmovilizados (IMAC) para purificar proteínas ricas en histidina, incluyendo aquellas que comprenden etiquetas de polihistidina. En resumen, en primer lugar se carga un gel con iones metálicos divalentes para formar un quelato (Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3: 1-7, 1985). Las proteínas ricas en histidina se adsorberán en esta matriz con diferentes afinidades, dependiendo del ion metálico que se use, y se eluirán mediante elución competitiva, disminuyendo el pH, o uso de fuertes agentes quelantes. Otros métodos de purificación incluyen purificación de proteínas glucosiladas por cromatografía de afinidad con lectina y cromatografía de intercambio iónico (*Methods in Enzymol.*, Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, págs. 529-39). En realizaciones adicionales de la invención, para facilitar la purificación, puede construirse una fusión del polipéptido de interés y una etiqueta de afinidad (por ejemplo, proteína de unión a maltosa, un dominio de inmunoglobulina).

Además, usando los métodos descritos en la técnica, se construyen polipéptidos de fusión, o proteínas zcytor17 híbridas, usando regiones o dominios del zcytor17 de la invención en combinación con los de otras proteínas de la familia de receptores de citocina humana, o proteínas heterólogas (Sambrook *et al.*, citado anteriormente, Altschul *et al.*, citado anteriormente, Picard, *Cur. Opin. Biology.* 5:511-5, 1994, y referencias en su interior). Estos métodos permiten determinar la importancia biológica de dominios o regiones más grandes en un polipéptido de interés. Dichos híbridos pueden alterar cinéticas de reacción, unión, restringir o ampliar la especificidad del sustrato, o alterar la localización tisular y celular de un polipéptido, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

Pueden prepararse polipéptidos o proteínas de fusión mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica preparando cada componente de la proteína de fusión y conjugándolo químicamente. Como alternativa, puede generarse un polinucleótido que codifique uno o más componentes de la proteína de fusión en la fase de lectura apropiada, usando técnicas conocidas y expresarse mediante los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, parte de un dominio, o todo un dominio, que confiere una función biológica puede intercambiarse entre el zcytor17 de la presente invención con uno o más dominios funcionalmente equivalentes de otro miembro de la familia de citocinas. Dichos dominios incluyen, pero sin limitación, la secuencia señal secretora, el dominio extracelular, el dominio de unión a citocina, el dominio de fibronectina de tipo III, el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular, los sitios Box I y Box II, como se desvela en el presente documento. Sería de esperar que dichas proteínas de fusión tuviesen un perfil funcional biológico que fuese igual o similar al de los polipéptidos de la presente invención u otras proteínas de familias conocidas, dependiendo de la fusión que se construya. Además, dichas proteínas de fusión pueden exhibir otras propiedades como se desvela en el presente documento.

Para intercambiar los dominios equivalentes entre el polipéptido de zcytor17 y los polipéptidos con los que se fusionan pueden usarse técnicas de clonación y de biología molecular convencionales. Generalmente, un segmento

de ADN que codifica un dominio de interés, por ejemplo, un dominio de zcytor17 descrito en el presente documento, está unido operativamente en fase a al menos otro segmento de ADN que codifica un polipéptido adicional (por ejemplo un dominio o una región de otro receptor de citocina, tal como el receptor de gp130, LIF, IL-12, WSX-1, IL-2 u otro receptor de citocina de clase II), e insertado en un vector de expresión apropiado, como se describe en el presente documento. Generalmente las construcciones de ADN se realizan de tal manera que los diversos segmentos de ADN que codifican regiones correspondientes de un polipéptido estén unidos operativamente en fase para construir una sola construcción que codifique toda la proteína de fusión, o una parte funcional de la misma. Por ejemplo, una construcción de ADN codificaría, desde el extremo N al extremo C, una proteína de fusión que comprendiese un polipéptido señal seguido de un dominio de unión a citocina, seguido de un dominio transmembrana, seguido de un dominio de señalización intracelular. Dichas proteínas de fusión pueden expresarse, aislarse y ensayarse, con respecto a su actividad, como se describe en el presente documento. Adicionalmente, dichas proteínas de fusión pueden usarse para expresar y secretar fragmentos del polipéptido de zcytor17, a usar, por ejemplo, para inocular a un animal para generar anticuerpos contra zcytor17 como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una secuencia señal secretora puede estar unida operativamente al dominio de unión a citocina, al dominio transmembrana, al dominio de señalización intracelular o a un subfragmento de los mismos, o a una combinación de los mismos (por ejemplo, polipéptidos unidos operativamente que comprenden el dominio de unión a citocina extracelular fusionado a un dominio transmembrana, o fragmentos del polipéptido de zcytor17 descritos en el presente documento), para secretar un fragmento del polipéptido de zcytor17 que puede purificarse como se describe en el presente documento y que sirve como un antígeno para inocular en un animal para producir anticuerpos contra zcytor17, como se describe en el presente documento.

Los polipéptidos de zcytor17 o fragmentos de los mismos también pueden prepararse mediante síntesis química. Los polipéptidos de zcytor17 pueden ser monómeros o multímeros; pueden estar glucosilados o no glucosilados; pegilados o no pegilados; y pueden incluir o no un resto de aminoácido inicial de metionina.

Los polipéptidos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, también puede sintetizarse mediante síntesis de fase sólida exclusiva, métodos de fase sólida parcial, condensación de fragmentos o síntesis de solución clásica. En la técnica se conocen bien métodos para sintetizar polipéptidos. Véase, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963; Kaiser *et al.*, Anal. Biochem. 34: 595, 1970. Después toda la síntesis del polipéptido deseado sobre un soporte sólido, la resina - péptido se trata con un reactivo que separa el polipéptido de la resina y retira la mayoría de los grupos protectores de la cadena lateral. Dichos métodos están bien establecidos en la técnica.

La actividad de los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención puede medirse usando diversos ensayos que miden la diferenciación y proliferación celular. Dichos ensayos son muy conocidos en la técnica.

Las proteínas de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, son útiles, por ejemplo, en el tratamiento y diagnóstico de trastornos linfoides, inmunitarios, inflamatorios, esplénicos, sanguíneos u óseos, y pueden medirse *in vitro* usando células cultivadas o *in vivo* administrando moléculas de la presente invención al modelo animal apropiado. Por ejemplo, células hospedadoras que expresan un polipéptido receptor soluble zcytor17+ pueden embeberse en un medio con alginato e inyectarse (implantarse) en animales receptores. La microencapsulación de alginato-poli-L-lisina, la encapsulación de membranas selectivas y las cámaras de difusión son medios para atrapar células de mamífero transfectadas o células de mamífero primarias. Estos tipos de "encapsulaciones" no inmunogénicas permiten la difusión de proteínas, y de otras macromoléculas secretadas o liberadas por las células capturadas, en el animal receptor. Lo que es más importante, las cápsulas enmascaran y protegen a las células extrañas, embebidas, de la respuesta inmunitaria del animal receptor. Dichas encapsulaciones pueden prolongar la vida de las células inyectadas desde algunas horas o días (células desnudas) a varias semanas (células embebidas). Las hebras de alginato proporcionan un medio sencillo y rápido para generar células embebidas.

En la técnica se conocen materiales necesarios para generar hebras de alginato. En un procedimiento a modo de ejemplo, se prepara alginato al 3 % en H₂O estéril y se filtra de forma estéril. Justo antes de la preparación de las hebras de alginato, la solución de alginato se filtra de nuevo. Una suspensión celular de aproximadamente al 50 % (que contiene aproximadamente 5×10^5 a aproximadamente 5×10^7 células/ml) se mezcla con la solución de alginato al 3 %. Un ml de la suspensión alginato/célula se extruye en una solución de CaCl₂ filtrada estéril de 100 mM durante un período de tiempo de ~15 min, formando una "hebra". La hebra extruida se transfiere después a una solución de CaCl₂ 50 mM y después a una solución de CaCl₂ 25 mM. Después, la hebra se aclara con agua desionizada antes de recubrirla incubando en una solución al 0,01 % de poli-L-lisina. Finalmente la hebra se aclara con solución de Ringer lactada y se extrae de la solución hacia el interior de un cilindro de jeringa (sin aguja). Después, se acopla una aguja de calibre grande a la jeringa, y la hebra se inyecta por vía intraperitoneal a un receptor en un volumen mínimo de la solución de Ringer lactada.

Una estrategia *in vivo* para el ensayo de proteínas de la presente invención implica sistemas de suministro de virus. Los virus a modo de ejemplos para esta finalidad incluyen adenovirus, herpesvirus, retrovirus, virus de la vacuna y virus adenoasociados (AAV). El adenovirus, un virus de ADN bicatenario, es actualmente el vector de transferencia

de genes mejor estudiado para el suministro de ácido nucleico heterólogo (para una revisión, véase TC Becker *et al*, Meth Cell Biol 43: 161-89, 1994; y Douglas JT y DT Curriel, Science & Medicine 4: 44-53, 1997). El sistema de adenovirus ofrece diversas ventajas: (i) el adenovirus puede incorporar insertos de ADN relativamente grandes; (ii) puede crecer a un título alto, (iii) infectar a una amplia diversidad de tipos de células de mamífero; y (iv) puede usarse con un gran cantidad de diferentes promotores que incluyen promotores ubicuos, específicos de tejidos y regulables. Además, dado que los adenovirus son estables en la corriente sanguínea, estos pueden administrarse por inyección intravenosa.

Usando vectores de adenovirus, en los que partes del genoma del adenovirus están delecionadas, se incorporan insertos en el ADN vírico mediante ligamiento directo o por recombinación homóloga con un plásmido co-transfectado. En un sistema a modo de ejemplo, el gen E1 esencial se ha delecionado del vector vírico, y el virus no se replicará a menos que la célula hospedadora proporcione el gen E1 (la línea celular 293 humana es un ejemplo). Cuando se administra por vía intravenosa a animales intactos, el adenovirus se dirige principalmente al hígado. Si el sistema de suministro adenovírico tiene una deleción del gen E1, el virus no puede replicarse en las células hospedadoras. Sin embargo, el tejido del hospedador (por ejemplo, hígado) expresará y procesará (y, si está presente una secuencia señal secretora, secretará) la proteína heteróloga. Las proteínas secretadas entrarán en la circulación en el hígado altamente vascularizado y podrán determinarse los efectos en el animal infectado.

Además, los vectores de adenovirus que contienen varias deleciones de genes de virus pueden usarse en un intento para reducir o eliminar respuestas inmunitarias contra el vector. Dichos adenovirus tienen deleción E1 y además contienen deleciones E2A o E4 (Lusky, M. *et al.*, J. Virol. 72: 2022-2032, 1998; Raper, S. E. *et al.*, Human Gene Therapy 9: 671-679, 1998). Además, se indica, que la deleción de E2b reduce respuestas inmunitarias (Amalfitano, A. *et al.*, J. Virol. 72: 926-933, 1998). Por otro lado, delecionando todo el genoma del adenovirus, pueden incorporarse insertos muy grandes de ADN heterólogo. La generación de adenovirus denominados "vacíos", en los que todos los genes víricos están delecionados, es particularmente ventajosa para la inserción de insertos grandes de ADN heterólogo. Para una revisión, véase Yeh, P. y Perricaudet, M., FASEB J. 11: 615-623, 1997.

El sistema de adenovirus también puede usarse para la producción de proteínas *in vitro*. Mediante cultivo de células 293 no infectadas con adenovirus en condiciones en las que las células no se dividen rápidamente, las células pueden producir proteínas durante períodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, células BHK se desarrollan hasta la confluencia en fábricas celulares, después se exponen al vector adenovírico que codifica la proteína secretada de interés. Después, las células se desarrollan en condiciones asépticas, lo que permite que las células infectadas sobrevivan durante varias semanas sin división celular significativa. Como alternativa, células 293 infectadas con vector de adenovirus pueden crecer como células adherentes o en cultivo en suspensión a una densidad celular relativamente alta para producir cantidades significativas de proteína (Véase Garnier *et al*, Cytotechnol. 15: 145-55, 1994). Con cualquier protocolo, una proteína heteróloga, expresada, secretada, puede aislarse repetidamente del sobrenadante de cultivo celular, lisado, o fracciones de membrana, dependiendo de la disposición de la proteína expresada en la célula. En el protocolo de producción de células 293 infectadas, también pueden obtenerse proteínas no secretadas de un modo eficaz.

A la vista de la distribución tisular observada para zcytor17, los agonistas (incluyendo el ligando natural/sustrato/cofactor/etc.) y antagonistas tienen un enorme potencial en aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Los compuestos identificados como agonistas de zcytor17 son útiles para estimular el crecimiento de células inmunitarias y hematopoyéticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, receptores solubles zcytor17, y compuestos agonistas, son útiles como componentes de medios de cultivo celular definidos, y pueden usarse en solitario o en combinación con otras citocinas y hormonas para reemplazar el suero que normalmente se usa en el cultivo celular. Por tanto, los agonistas son útiles para promover específicamente el crecimiento y/o desarrollo de linfocitos T, linfocitos D y otras células de linaje linfóide y mielóide en cultivo. Además, el receptor soluble zcytor17, agonista o antagonista, puede usarse *in vitro* en un ensayo para medir la estimulación de formación de colonias de cultivos aislados primarios de médula ósea. Dichos ensayos son muy conocidos en la técnica.

Los antagonistas también son útiles como reactivos de investigación para la caracterización de sitios de interacción entre ligando-receptor. Los inhibidores de la actividad de zcytor17 (antagonistas de zcytor17) incluyen anticuerpos contra zcytor17 y receptores zcytor17 solubles, así como otros agentes peptídicos y no peptídicos (incluyendo ribozimas).

Zcytor17 también puede usarse para identificar moduladores (por ejemplo, antagonistas) de su actividad. A los ensayos desvelados en el presente documento se añaden compuestos de ensayo para identificar compuestos que inhiban la actividad de zcytor17. Además de estos ensayos desvelados en el presente documento, pueden ensayarse muestras para la inhibición de la actividad de zcytor17 en diversos ensayos diseñados para medir la unión, oligomerización de zcytor17, o la estimulación/inhibición de respuestas celulares dependientes de zcytor17. Por ejemplo, líneas de células que expresan zcytor17 pueden transfectarse con una construcción génica indicadora que sea sensible a una ruta celular estimulada por zcytor17. En la técnica se conocen construcciones génicas indicadoras de este tipo y generalmente comprenderán un elemento de respuesta al ADN de zcytor17 unido operativamente a un gen que codifique una proteína detectable en ensayos, tal como luciferasa. Los elementos de respuesta al ADN pueden incluir, pero sin limitación, elementos de respuesta a AMP cíclico (CRE), elementos de

respuesta a hormonas (HRE), elementos de respuesta a insulina (IRE) (Nasrin y col, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5273-7, 1990) y elementos de respuesta a suero (SER) (Shaw y col, Cell 56: 563-72, 1989). Los elementos de respuesta a AMP cíclico se revisan en Roestler y col, J. Biol. Chem. 263 (19):9063-6; 1988 y Habener, Molec. Endocrinol. 4 (8): 1087-94; 1990. Los elementos de respuesta a hormonas se revisan en Beato, Cell 56:335-44; 1989. Los compuestos, soluciones, mezclas o extractos o medios acondicionados, candidatos, de diversos tipos de células se ensayan con respecto a la capacidad para potenciar la actividad del receptor zcytor17, como se pone de manifiesto por un aumento en la estimulación de la expresión génica indicadora de zcytor17. Los ensayos de este tipo detectarán compuestos que estimulan directamente la actividad de la transducción de señal de zcytor17 a través de la unión del receptor o, de otra manera, o de la estimulación de parte de la cascada de señalización. Como tal, se proporciona un método de identificación de agonistas del polipéptido de zcytor17, que comprende proporcionar células sensibles a un polipéptido de zcytor17, o cultivar una primera parte de las células en ausencia de un compuesto de ensayo, cultivar una segunda parte de las células en presencia de un compuesto de ensayo y detectar un aumento en una respuesta celular de la segunda parte de las células en comparación con la primera parte de las células. Además, la tercera célula que contiene la construcción génica indicadora descrita anteriormente, pero que no expresa el receptor zcytor17, puede usarse como una célula de control para evaluar la estimulación no específica, o no mediada por zcytor17, del indicador. Los agonistas, incluyendo el ligando natural, son por lo tanto útiles para estimular o aumentar la función del polipéptido de zcytor17.

Un polipéptido de unión al ligando de zcytor17, tal como el dominio extracelular o el dominio de unión a citocina, desvelado en el presente documento, también puede usarse para la purificación de ligandos. El polipéptido se inmoviliza en un soporte sólido, tal como en perlas de agarosa, agarosa reticulada, vidrio, resinas celulósicas, resinas basadas en sílice, poliestireno, poliacrilamida reticulada, o materiales similares que son estables en las condiciones de uso. En la técnica se conocen métodos para el ligamento de polipéptidos a soportes sólidos, e incluyen química de aminas, activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, y activación con hidracida. El medio resultante generalmente se configurará en forma de una columna, y los fluidos que contienen el ligando se hacen pasar a través de la columna una o más veces para permitir que el ligando se una al polipéptido receptor. Después, el ligando se eluye usando cambios en la concentración salina, agentes caotrópicos (HCl de guanidina) o pH para desestabilizar la unión del ligando con el receptor.

Ventajosamente puede emplearse un sistema de ensayo que usa un receptor de unión a ligando (o un anticuerpo, un miembro de un par complemento/anticomplemento) o un fragmento de unión del mismo, y un instrumento biosensor disponible en el comercio (por ejemplo, BIAcore™, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ; o tecnología SELDI™, Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA). Dicho receptor, anticuerpo, miembro de un par complemento/anticomplemento o fragmento se inmoviliza sobre la superficie de una microplaca receptora. El uso de este instrumento se desvela en Karlsson, J. Immunol. Methods 145:229-240, 1991 y Cunningham y Wells, J. Mol. Biol. 234:554-63, 1993. Un receptor, anticuerpo, miembro o fragmento está unido covalentemente, usando química de aminas o sulfhidrilo, a fibras de dextrano que están unidas a una película de oro dentro de la célula de flujo. Una muestra de ensayo se hace pasar a través de la célula. Si un ligando, epitopo, o un miembro opuesto del par complemento/anticomplemento está presente en la muestra, este se unirá al receptor, anticuerpo o miembro inmovilizado, respectivamente, causando un cambio en el índice refractivo del medio, que se detecta como un cambio en la resonancia de plasmón superficial de la película de oro. Este sistema permite la determinación de velocidades de asociación y disociación, a partir de la cual puede calcularse la afinidad de unión, y la valoración de la estequiometría de unión.

Los polipéptidos receptores de unión a ligando también pueden usarse en de otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica. Dichos sistemas incluyen análisis Scatchard para la determinación de afinidad de unión (véase, Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949) y ensayos calorimétricos (Cunningham y col, Science 253:545-48, 1991; Cunningham y col, Science 245:821-25, 1991).

Los polipéptidos de zcytor17 también pueden usarse para preparar anticuerpos que se unen a epítopos, péptidos o polipéptidos de zcytor17. El polipéptido de zcytor17 o un fragmento del mismo sirve como un antígeno (inmunógeno) para inocular a un animal y suscitar una respuesta inmunitaria. Un experto habitual en la técnica reconocería que los polipéptidos antigénicos, portadores de epitopo, contienen una secuencia de al menos 6, preferentemente de al menos 9 y más preferentemente de al menos de 15 a aproximadamente 30 restos de aminoácidos contiguos de un polipéptido de zcytor17 (por ejemplo, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57 y similar). Se incluyen polipéptidos que comprenden una parte más grande de un polipéptido de zcytor17, es decir, de 30 a 100 restos hasta toda la longitud de la secuencia de aminoácidos. Los antígenos o epítopos inmunogénicos también pueden incluir etiquetas, adyuvantes y transportadores unidos, como se describe en el presente documento. Los antígenos adecuados incluyen el polipéptido de zcytor17 codificado por la SEQ ID NO: 2 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 732 (Val), o un fragmento de 9 a 713, o de 30 o 50 a 713 aminoácidos contiguos de la misma; y SEQ ID NO: 46 del número de aminoácido 20 (Ala) al número de aminoácido 649 (Ile), o un fragmento de 9 a 630, o de 30 o 50 a 630 aminoácidos contiguos de la misma; y SEQ ID NO: 54 del número de aminoácido 33 (Ala) al número de aminoácido 662 (Ile), o un fragmento de 9 a 630, o de 30 o 50 a 630 aminoácidos contiguos de la misma. Los péptidos preferidos para su uso como antígenos son el dominio extracelular, el dominio de unión a citocina, el dominio de fibronectina de tipo 3, el dominio de selección intracelular, los sitios Box I y Box II u otros dominios y

motivos desvelados en el presente documento, o una combinación de los mismos; y péptidos hidrófilos de zcytor17 tales como los predichos por un experto en la técnica a partir de una representación gráfica de hidrofobicidad, determinada, por ejemplo, a partir de un perfil de hidrofobicidad de Hopp/Woods basado en la ventana corredera de seis restos, con los restos G, S y T enterrados y los restos H, Y y W expuestos ignorados. Los péptidos zcytor17 hidrófilos incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: (1) los restos de aminoácidos 43 a 48 de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46 (los restos 56 a 61 de SEQ ID NO: 54); (2) los restos de aminoácidos 157 a 162 de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46 (los restos 170 a 175 de SEQ ID NO: 54); (3) los restos de aminoácidos 158 a 163 de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46 (171 a 176 de SEQ ID NO: 54); (4) los restos de aminoácidos 221 a 226 de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46 (234 a 239 de SEQ ID NO: 54); y (5) los restos de aminoácidos 423 a 431 de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46 (restos 439 a 444 de SEQ ID NO: 54). Además, epítomos hidrófilos predichos a partir de una representación gráfica de Jameson-Wolf, por ejemplo, usando el programa DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI), también son antígenos adecuados. Además, los motivos conservados y las regiones variables entre los motivos conservados de zcytor17 son antígenos adecuados. Los anticuerpos generados a partir de esta respuesta inmunitaria pueden aislarse y purificarse como se describe en el presente documento. Los métodos para preparar y aislar anticuerpos policlonales y monoclonales son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology, Cooligan, y col, (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook y col, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Hurrell, J. G. R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982.

Como resulta evidente para un experto habitual en la técnica, los anticuerpos policlonados pueden generarse inoculando una variedad de animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas con un polipéptido de zcytor17 o un fragmento del mismo. La inmunogenicidad de un polipéptido de zcytor17 puede aumentarse a través del 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 zcytor17 o de una parte del mismo con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una parte de la misma. Si la parte polipeptídica es "similar a un hapteno", dicha parte puede unirse o ligarse ventajosamente a un transportador macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana) (KLH), albumina 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 a antígeno, tales como fragmentos proteolíticos F(ab')₂ y Fab. Los anticuerpos o fragmentos intactos modificados genéticamente, tales como anticuerpos quiméricos, fragmentos F_v, anticuerpos monocatenarios y similares, así como péptidos y polipéptidos de unión a antígeno sintéticos también se incluyen. Los anticuerpos no humanos pueden humanizarse injertando CDR no humanas en regiones marco conservadas y constantes humanas, o incorporando todos los dominios variables no humanos (opcionalmente "revistiéndolos" con una superficie similar a la humana por reemplazando de restos expuestos, siendo el resultado un anticuerpo "con sustituciones en la superficie"). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden conservar restos no humanos en los dominios de la región marco conservada variable humana para potenciar las características de unión apropiadas. A través de la humanización de los anticuerpos, puede aumentarse la semivida biológica, y se reduce el potencial de reacciones inmunitarias adversas después de la administración en seres humanos. Además, los anticuerpos humanos pueden producirse en animales transgénicos, no humanos, que se han modificado por ingeniería genética para que contengan genes de inmunoglobulina humana como se desvela en la publicación WIPO WO 98/24893. Se prefiere que en estos animales, los genes de inmunoglobulina endógenos estén inactivados o eliminados, tal como mediante recombinación homóloga.

Técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos útiles en el presente documento incluyen la exposición *in vitro* de linfocitos contra la proteína o péptido zcytor17, y la selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, a través del uso de una proteína o un péptido zcytor17 inmovilizado o marcado). Los genes que codifican polipéptidos que tienen posibles dominios de unión al polipéptido de zcytor17 pueden obtenerse explorando peptidotecas aleatorias presentadas en fagos (presentación en fagos) o en bacterias, tales como *E. coli*. Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos pueden obtenerse de diversas maneras, tal como a través de mutagénesis al azar y síntesis de polinucleótidos al azar. Estas bibliotecas de presentación de péptidos al azar pueden usarse para explorar péptidos que interaccionen con una diana conocida que puede ser una proteína o un polipéptido, tal como un ligando o un receptor, una macromolécula biológica o sintética, o sustancias orgánicas o inorgánicas. En la materia se conocen técnicas para crear y explorar dichas bibliotecas de presentación de péptidos al azar (Ladner y col, patente de Estados Unidos N.º 5,223,409; Ladner y col, patente de Estados Unidos N.º 4.946.778; Ladner y col, patente de Estados Unidos N.º 5.403.484 y Ladner y col, patente de Estados Unidos N.º 5.571.698) y bibliotecas de presentación de péptidos al azar y kits para explorar dichas bibliotecas se encuentran disponibles en el comercio, por ejemplo, de Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Las bibliotecas de presentación de péptidos al azar pueden explorarse usando las secuencias de zcytor17 desveladas en el presente documento para identificar proteínas que se unen a zcytor17. Estos "péptidos de unión" que interaccionan con polipéptidos de zcytor17 pueden usarse para etiquetar células que expresan el receptor; para

aislar polipéptidos homólogos mediante purificación por afinidad; pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares. Estos péptidos de unión también pueden usarse en métodos analíticos tal como para la exploración de bibliotecas de expresión y neutralización de la actividad. Los péptidos de unión también pueden usarse para ensayos de diagnóstico para determinar niveles en circulación de polipéptidos de zcytor17; para detectar o cuantificar polipéptidos de zcytor17 solubles como marcador de patología o enfermedad subyacente. Estos péptidos de unión también pueden actuar como “antagonistas” de zcytor17 para bloquear la unión de zcytor17 y la transducción de señales *in vitro* e *in vivo*. Estos péptidos de unión contra zcytor17 serían útiles para la inhibición de la acción de un ligando que se une a zcytor17.

Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si: 1) exhiben un nivel umbral de actividad de unión y 2) no reaccionan de manera significativa en cruzado con moléculas polipeptídicas relacionadas. Un nivel umbral de unión se determina si los anticuerpos contra zcytor17 del presente documento se unen a un polipéptido, péptido o epítipo de zcytor17 con una afinidad al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión con respecto al polipéptido de control (no zcytor17). Se prefiere que los anticuerpos exhiban una afinidad de unión (K_a) de $10^6 M^{-1}$ o mayor, preferentemente de $10^7 M^{-1}$ o mayor, más preferentemente de $10^8 M^{-1}$ o mayor y más preferentemente de $10^9 M^{-1}$ o mayor. La actividad de unión de un anticuerpo puede determinarla fácilmente un experto habitual en la técnica, por ejemplo, mediante análisis Scatchard (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

Si se muestra que los anticuerpos contra zcytor17 no reaccionan significativamente en cruzado con moléculas polipeptídicas relacionadas, por ejemplo, mediante el anticuerpo que detecta el polipéptido de zcytor17, pero no con polipéptidos relacionados conocidos usando un análisis de transferencia de Western convencional (Ausubel y col, citado anteriormente). Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos son los desvelados en la técnica anterior, tales como ortólogos y parálogos conocidos y miembros conocidos similares de una familia de proteínas (por ejemplo, receptores de gp130, LIF, WSX-1 y IL12). La exploración también puede realizarse usando polipéptidos mutantes zcytor17 y zcytor17 humanos. Además, los anticuerpos pueden “explorarse” contra polipéptidos relacionados conocidos, para aislar una población que se une específicamente a los polipéptidos de zcytor17. Por ejemplo, los anticuerpos suscitados contra zcytor17 se adsorben a anticuerpos relacionados adheridos a la matriz insoluble; los anticuerpos específicos contra zcytor17 fluirán a través de la matriz en las condiciones de tampón apropiadas. La exploración permite el aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales que no reaccionan en cruzado para conocer polipéptidos estrechamente relacionados (A Laboratory Manual, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology. Cooligan, y col, (eds.), National Institutes of Health, John Wiley y Sons, Inc., 1995). En la técnica se conoce bien la exploración y el aislamiento de anticuerpos específicos. Véase, Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff y col, Adv. en Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin y col, Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984. Los anticuerpos contra zcytor17 que se unen específicamente pueden detectarse mediante diversos métodos de la técnica y desvelados más adelante.

Para detectar anticuerpos que se unen específicamente a las proteínas o a los péptidos de zcytor17 pueden utilizarse varios ensayos conocidos por los expertos en la materia. Se describen ensayos a modo de ejemplos con detalle en Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Como ejemplos representativos de dichos ensayos se incluyen: inmunoelectroforesis simultánea, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo de transferencia de puntos o de transferencia de Western, ensayo de inhibición o competición y ensayo de sándwich. Además, puede explorarse la unión de los anticuerpos con la proteína o el polipéptido de zcytor17 mutante frente al tipo silvestre.

Los anticuerpos contra zcytor17 pueden usarse para etiquetar células que expresan zcytor17, tales como células que expresan de manera natural zcytor17 tal como monocitos y células prostáticas, así como células que se transforman con zcytor17; para el aislamiento de zcytor17 mediante purificación por afinidad; para ensayos de diagnóstico para determinar niveles en circulación de polipéptidos de zcytor17; para detectar o cuantificar zcytor17 soluble como marcador de patologías o enfermedades subyacentes; en métodos analíticos empleando FACS (separación de células activadas por fluorescencia); para la exploración de bibliotecas de expresión; para la generación de anticuerpos anti-idiotípicos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear la actividad de zcytor17 *in vitro* e *in vivo*. Las etiquetas o marcas directas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; las etiquetas o marcas indirectas pueden representar el uso de biotina-avidina u otros pares de complemento/anticomplemento como productos intermedios. Los anticuerpos del presente documento también pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados pueden usarse para aplicaciones *in vivo* de diagnóstico o terapéuticas. Además, los anticuerpos contra zcytor17 o fragmentos de los mismos pueden usarse *in vivo* para detectar zcytor17 desnaturalizado o fragmentos del mismo en ensayos, por ejemplo, transferencias de Western u otros ensayos conocidos en la técnica.

Los anticuerpos contra zcytor17 son útiles para etiquetar células que expresan el receptor y para ensayar niveles de expresión de zcytor17, por purificación de afinidad, en ensayos de diagnóstico para determinar niveles en circulación de polipéptidos receptores solubles, métodos analíticos que emplean clasificación celular activada por fluorescencia. Pueden usarse anticuerpos divalentes como agonistas para imitar el efecto de un ligando de zcytor17.

- Los anticuerpos del presente documento también pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados pueden usarse para aplicaciones *in vivo* de diagnóstico o terapéuticas. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden usarse para
- 5 identificar o tratar tejidos u órganos que expresan una molécula correspondiente anti complementaria (es decir, un receptor zcytor17). Más específicamente, los anticuerpos contra zcytor17, o fragmentos bioactivos o partes de los mismos, pueden acoplarse a moléculas detectables o citotóxicas y suministrarse a mamíferos que tienen células, tejidos u órganos que expresan la molécula zcytor17.
- 10 Las moléculas detectadas adecuadas pueden unirse directa o indirectamente a polipéptidos que se unen a zcytor17 ("polipéptidos de unión", incluyendo péptidos de unión desvelados anteriormente), anticuerpos o fragmentos bioactivos o partes de los mismos. Las moléculas detectables adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Moléculas citotóxicas adecuadas pueden unirse directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo, e
- 15 incluyen toxinas bacterianas o vegetales (por ejemplo, la toxina diftérica, la exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y similares), así como radionúclidos terapéuticos, tales como yodo-131, renio-188 o itrio-90 (unido directamente al polipéptido o anticuerpo, o unido indirectamente mediante un resto quelante, por ejemplo). Los polipéptidos o anticuerpos de unión 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
- 20 con un miembro de un par complementario/anti complementario, en el que el otro miembro está unido al polipéptido de unión o parte de anticuerpo. Para esta finalidad, la biotina/estreptavidina es un ejemplo de un par complementario/anti complementario.
- Las proteínas de fusión polipéptido de unión-toxina o proteínas de fusión anticuerpo-toxina pueden usarse para la
- 25 inhibición o supresión de células o tejidos diana (por ejemplo, tratar células cancerosas o tejidos cancerosos). Como alternativa, si el polipéptido de unión tiene dominios funcionales múltiples (es decir, un dominio de activación o un dominio de unión a ligando, más un dominio de direccionamiento), una proteína de fusión que incluya solamente 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 tejido de interés. En casos en los que la proteína de fusión,
- 30 incluyendo únicamente un solo dominio, incluya una molécula complementaria, la molécula anti complementaria puede conjugarse con una molécula detectable o citotóxica. Por tanto, dichas proteínas de fusión de dominio-molécula complementaria representan un vehículo de direccionamiento genérico para el suministro específico de célula/tejido de conjugados genéricos de molécula detectable anti complementaria/citotóxica.
- 35 Las proteínas de fusión polipéptido de unión a zcytor17-citocina o anticuerpo-citocina pueden usarse para potenciar la destrucción *in vivo* de tejidos diana (por ejemplo, cánceres de sangre, linfoides, de colon y de médula ósea), si el polipéptido de unión a citocina o anticuerpo contra zcytor17 se dirige a la célula hiperproliferativa (véase, en líneas generales, Hornick y col, Blood 89:4437-47, 1997). Estos describen proteínas de fusión que permiten el direccionamiento de una citocina a un sitio de acción deseado, proporcionando de este modo una concentración
- 40 local elevada de citocina. Los anticuerpos contra zcytor17 adecuados se dirigen a una célula o a un tejido no deseable (es decir, a un tumor o a una leucemia), y la citocina fusionada actúa como mediadora en la mejora de la lisis de la célula diana mediante células efectoras. Las citocinas adecuadas para esta finalidad incluyen interleucina 2 y factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), por ejemplo.
- 45 Como alternativa, las proteínas de fusión de polipéptidos o anticuerpos de unión a zcytor17, descritas en el presente documento pueden usarse para potenciar la destrucción *in vivo* de tejidos diana estimulando directamente una ruta apoptótica modulada por zcytor17, dando como resultado la muerte celular de células hiperproliferativas que expresan zcytor17.
- 50 Los conjugados polipéptido o anticuerpo de unión bioactivos descritos en el presente documento pueden suministrarse por vía oral, intravenosa, intraarterial o intraductal, o pueden introducirse por vía local en el sitio de acción propuesto.
- Las citocinas en haz de cuatro hélices que se unen a receptores de citocina, así como a otras proteínas producidas
- 55 por linfocitos activados, desempeñan una función biológica importante en la diferenciación, activación, reclutamiento y homeostasis celular de las células de todo el organismo. La utilidad terapéutica incluye el tratamiento de enfermedades que requieren regulación inmunitaria, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, tales como, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico y diabetes. Los antagonistas o agonistas del receptor zcytor17, incluyendo receptores solubles, anticuerpos contra receptores, y el ligando natural, pueden ser importantes en la regulación de la inflamación, y por lo tanto serían útiles en el tratamiento de artritis
- 60 reumatoide, asma, colitis ulcerosa, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn y septicemia. Pueden tener una función de antagonistas o agonistas de zcytor17, incluyendo receptores solubles, anticuerpos contra receptores y el ligando natural, en la mediación de la tumorigénesis y por lo tanto serían útiles en el tratamiento del cáncer. Los antagonistas o agonistas de zcytor17, incluyendo receptores solubles, anticuerpos contra receptores y el
- 65 ligando natural, pueden ser un posible agente terapéutico en la supresión del sistema inmunitario lo que sería importante para la reducción del rechazo de injerto o en la prevención de la enfermedad de injerto contra huésped.

Como alternativa, los antagonistas o agonistas de zcytor17, incluyendo receptores solubles, anticuerpos contra el receptor zcytor17 y el ligando natural pueden activar el sistema inmunitario lo que sería importante en el refuerzo de la inmunidad contra enfermedades infecciosas, tratamiento de pacientes inmunocomprometidos, tales como
 5 pacientes VIH positivos, o en la mejora de vacunas. En particular, los antagonistas o agonistas de zcytor17, incluyendo receptores solubles y el ligando natural pueden modular, estimular o expandir células NK, o sus progenitores, y proporcionarían un valor terapéutico en el tratamiento de infección vírica, y como un factor antineoplásico. Se piensa que las células NK desempeñan una función importante en la eliminación de células tumorales metastásicas y que los pacientes tanto con metástasis como con tumores sólidos tienen niveles de
 10 actividad de células NK disminuidos (Whiteside et. al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 230:221-244,1998).

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de zcytor17 son útiles en aplicaciones de terapia génica cuando se desea aumentar o inhibir la actividad de zcytor17. Si un mamífero tiene un gen zcytor17 mutado o está ausente, el gen zcytor17 puede introducirse en las células del mamífero. En una realización, se introduce un gen que codifica un polipéptido de zcytor17 *in vivo* en un vector vírico. Dichos vectores incluyen un virus de ADN atenuado o defectuoso,
 15 tal como, pero sin limitación, el virus del herpes simple (HSV), papilomavirus, virus de Epstein Barr (EBV), adenovirus, virus adenoasociado (AAV), y similares. Se prefieren virus defectuosos, que carecen por completo o casi por completo de genes víricos. Un virus defectuoso no es infeccioso después de su introducción en una célula. El uso de vectores víricos defectuosos permite la administración a células en una zona específica, localizada, sin preocuparse de que el vector pueda infectar a otras células. Los ejemplos de vectores particulares incluyen, pero sin limitación, un vector del virus 1 del herpes simple (HSV1) defectuoso (Kaplitt y col, Molec. Cell. Neurosci. 2:320-30,
 20 1991); un vector de adenovirus atenuado, tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet y col, J. Clin. Invest. 90:626-30, 1992; y un vector de virus adenoasociado defectuoso (Samulski y col, J. Virol. 61:3096-101, 1987; Samulski y col, J. Virol. 63:3822-8,1989).

Un gen de zcytor17 puede introducirse en un vector retrovírico, por ejemplo, como se describe en Anderson y col, patente de Estados Unidos N.º 5.399.346; Mann y col, Cell 33:153, 1983; Temin y col, patente de Estados Unidos N.º 4.650.764; Temin y col, patente de Estados Unidos N.º 30 4.980.289; Markowitz y col, J. Virol. 62:1120, 1988; Temin y col, patente de Estados Unidos N.º 5.124.263; publicación de patente internacional N.º WO 95/07358,
 30 publicada el 16 de marzo, 1995 por Dougherty y col; y Kuo y col, Blood 82:845, 1993. Como alternativa, el vector puede introducirse por lipofección *in vivo* usando liposomas. Para preparar liposomas pueden usarse lípidos catiónicos sintéticos para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador (Felgner y col, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7, 1987; Mackey y col, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-31,1988). El uso de lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos *in vivo* tiene determinadas ventajas prácticas. El direccionamiento molecular de liposomas a células específicas representa un área de beneficio. Más particularmente, el direccionamiento de la transfección a células particulares representa un área de beneficio. Por ejemplo, el direccionamiento de la transfección a tipos de células particulares sería particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el páncreas, hígado, riñón y cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente con otras moléculas con el fin del direccionamiento. Los péptidos diana (por ejemplo, hormonas o neurotransmisores), proteínas, tales como anticuerpos, o moléculas no peptídicas, pueden acoplarse químicamente a liposomas.
 40

Es posible retirar las células diana del organismo; para introducir el vector como un plásmido de ADN desnudo; y después reimplantar las células transformadas en el organismo. Los vectores de ADN desnudos para la terapia génica pueden introducirse en las células hospedadoras deseadas mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, precipitación con DEAE dextrano, con fosfato de calcio, uso de una pistola génica o uso de un transportador de vector de ADN. Véase, por ejemplo, Wu y col, J. Biol. Chem. 267:963-7, 1992; Wu y col, J. Biol. Chem. 263:14621-4, 1988.
 45

Puede usarse metodología antisentido para inhibir la transcripción génica de zcytor17, tal como para inhibir la proliferación celular *in vivo*. Se diseñan polinucleótidos que son complementarios a un segmento de un polinucleótido que codifica a zcytor17 (por ejemplo, un polinucleótido como se expone en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 57) para unirse al ARNm que codifica a zcytor17 y para inhibir la traducción de dicho ARNm. Dichos polinucleótidos antisentido se usan para inhibir la expresión de genes que codifican el polipéptido de zcytor17 en cultivo celular o en un sujeto.
 50
 55

Además, como una molécula de superficie celular, los polipéptidos de zcytor17 pueden usarse como una diana para introducir terapia génica en una célula. Esta aplicación sería particularmente apropiada para la introducción de genes terapéuticos en células en las que zcytor17 se expresa normalmente, tal como tejido linfoide, médula ósea, próstata, tiroides, monocitos y PBL, o células cancerosas que expresan el polipéptido de zcytor17. Por ejemplo, la terapia génica vírica, tal como se describe anteriormente, puede dirigirse a tipos de células específicos en los que se expresa un receptor celular, tal como el polipéptido de zcytor17, en lugar del receptor vírico. Los anticuerpos, u otras moléculas que reconocen moléculas de zcytor17 en la superficie de la célula diana, pueden usarse para dirigir al virus a infectar y administrar material terapéutico génico a la célula diana. Véase, Woo, S.L.C, Nature Biotech. 14:1538, 1996; Wickham, T.J. et al, Nature Biotech. 14:1570-1573, 1996; Douglas, J.T y col, Nature Biotech. 14:1574-1578, 1996; Rihova, B., Crit. Rev. Biotechnol. 17:149-169, 1997; y Vile, R.G. y col, Mol. Med. Today 4:84-
 60
 65

92, 1998. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo bioespecífico que contenga un fragmento Fab neutralizante de virus acoplado a un anticuerpo específico de zcytor17 para dirigir el virus a células que expresan el receptor zcytor17 y permitir la entrada eficaz del virus que contiene un elemento genético en las células. Véase, por ejemplo, Wickham, T.J., y col, J. Virol. 71:7663-7669, 1997; and Wickham, T.J., y col, J. Virol. 70:6831-6838, 1996.

5 Adicionalmente, pueden usarse anticuerpos contra zcytor17 y fragmentos de unión para el etiquetado y clasificación de células que expresan específicamente zcytor17, tales como células mononucleares, células linfoides, por ejemplo, células monocíticas no activadas y activadas, tales como células CD3+, CD4+ y CD8+ activadas, linfocitos B CD19+ y otras células, descritas en el presente documento. Dichos métodos de etiquetado y clasificación de
10 células son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Molecular Biology of the Cell", 3ª edición., Albert, B. y col, (Garland Publishing, Londres y Nueva York, 1994). Un experto en la técnica reconocería la importancia de separar tipos de tejidos celulares para estudiar las células, y el uso de anticuerpos para separar tipos de tejidos celulares específicos. Básicamente, los anticuerpos que se unen a la superficie de un tipo de célula están acoplados a diversas matrices tales como colágeno, perlas de polisacárido, o plástico para formar una superficie de afinidad a la que solamente se adherirán las células reconocidas por los anticuerpos. Las células unidas se recuperan después mediante técnicas convencionales. Otros métodos implican la separación de células mediante un separador de células activadas por fluorescencia (FACS). En esta técnica las células se marcan con anticuerpos que están acoplados a un colorante fluorescente. Después, las células marcadas se separan de las células no marcadas en un instrumento FACS. En la separación FACS, las células individuales que viajan en una sola fila pasan a través de un haz láser y se mide la fluorescencia de cada de ellas. Un poco más aguas abajo, con una boquilla vibratoria, se forman pequeñas gotitas, la mayoría de ellas conteniendo o no células. A las gotitas que contienen una sola célula se las proporciona automáticamente una carga positiva o negativa en el momento de la formación, dependiendo de si la célula que contienen es fluorescente, y después se desvían, mediante un campo eléctrico fuerte, a un recipiente apropiado. Dichos instrumentos pueden seleccionar 1 célula en 1000 y separar aproximadamente 5000 células por
20 segundo. Esto produce una población de células uniforme para el cultivo celular.

Un experto en la técnica reconocería que los anticuerpos contra los polipéptidos de zcytor17 de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, son útiles, porque no todos los tipos de tejido expresan el Zcytor17 y porque es importante que los biólogos puedan separar tipos de células específicas para estudios posteriores y/o para la reimplantación terapéutica en el organismo. Esto es particularmente relevante en células tales como células inmunitarias, en las que se expresa zcytor17.
30

Los polinucleótidos de la presente invención pueden encontrar uso en aplicaciones de diagnóstico. Por ejemplo, el gen de zcytor17, como se describe en el presente documento, una sonda que comprende ADN o ARN de zcytor17 o una subsecuencia de los mismos, puede usarse para determinar si el gen de zcytor17 está presente en el cromosoma 5 o si se ha producido una mutación. Zcytor17 se localiza en la región 5q11 del cromosoma 5 (véase, el Ejemplo 4). Las aberraciones cromosómicas detectables en el locus del gen de zcytor17 incluyen, pero sin limitación, aneuploidía, cambios en el número de copias de genes, pérdida de heterogeneidad (LOH, *lost of heterogeneity*), translocaciones, inserciones, deleciones, cambios y reordenaciones en sitios de restricción. Dichas aberraciones pueden detectarse usando polinucleótidos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, empleando técnicas de genética molecular, tales como análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RPLF), métodos de hibridación *in situ* fluorescente, técnicas de PCR empleando análisis de repetición en tándem corta (STR) y otras técnicas de análisis de ligamiento genético conocidas en la materia (Sambrook y col, citado anteriormente; Ausubel et. al. citado anteriormente; Marian. Chest 108:255-65.1995).
45

El conocimiento exacto de la posición de un gen puede ser útil para diversos propósitos, incluyendo: 1) determinar si una secuencia es parte de un cóntigo existente y obtener secuencias genéticas circundantes adicionales en diversas formas, tales como clones de YAC, BAC o DNAC; 2) proporcionar un gen candidato posible para una enfermedad hereditaria que muestra unión en la misma región cromosómica; y 3) organismos modelo comparativos, tales como ratón, que pueden ayudar a determinar qué función podría tener un gen particular.
50

El gen de zcytor17 se localiza en la región 5q11 del cromosoma 5. Diversos genes de función conocida mapean en esta región. Por ejemplo, un receptor de citocina de clase I estrechamente relacionado, gp130, también mapea en el cromosoma 5q11 lo que sugiere que la región 5q11 es una región importante para la expresión de receptores de citocinas. Zcytor17 mapea en la región cromosómica 5q11 (primera región distal del centrómero en el brazo q) y gp130 parece estar aproximadamente a una distancia de aproximadamente 920,7 kb de Zcytor17. Además, el receptor de citocina de clase I estrechamente relacionado, LIFR, mapea justo en el otro lado del centrómero en el brazo p en la región 5p13-p12. El receptor de citocina gp130 está compartido por diversos otros receptores de citocina para formar complejos heterodiméricos, lo que permite la señalización por citocinas tales como IL-6, factor inhibidor de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM) y factor neurotrófico ciliar (CNTF). Además, gp130 puede formar un complejo heterodimérico, trimérico (por ejemplo, con el receptor gp130 + LIP), o multimérico con el polipéptido de zcytor17 para señalizar. Además, como se indica en el presente documento, los receptores de citocina, tales como zcytor17 y gp130, desempeñan funciones importantes en la función celular inmunitaria, proliferación, migración, inflamación y similares. Como tales, los polinucleótidos zcytor17, polipéptidos y anticuerpos contra zcytor17 realizan un uso importante como un diagnóstico para detectar defectos en el gen o en la proteína zcytor17, o defectos en regiones cromosómicas circundantes en la región 5q11 del cromosoma 5.
65

Adicionalmente, diversos genes relacionados con enfermedades, que están asociados con trastornos humanos, se agrupan en la región 5q11. Un experto en la técnica reconocería que un marcador en 5q11, tal como los polinucleótidos zcytor17 de la presente invención, sería útil en la detección de aberraciones cromosómicas asociadas con enfermedades humanas, dado que se sabe que las aberraciones en, y alrededor de 5q11 están ligadas a enfermedades humanas. Por ejemplo, duplicaciones de 5q11-q13.3, trisomía parcial y translocaciones están asociadas con anomalías múltiples incluyendo esquizofrenia, una psicosis común. Además, el Síndrome de Maroteaux-Lamy, o la mucopolisacaridosis de tipo VI (5q11-q13) y el Síndrome de Klippel-Feil (5q11.2), están asociados con translocación en este locus. Además, estas enfermedades están ligadas a reordenaciones cromosómicas grandes, tales como duplicación cromosómica, translocación o pérdida de heterogeneidad en la región 5q11 del cromosoma 5. Usando, por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención junto con métodos conocidos en la técnica descritos en el presente documento, pueden detectarse dichas reordenaciones en, o cerca de 5q11. Adicionalmente, entre otros loci genéticos, los de la malformación de mano hendida/pie hendido de tipo 1 (SHFM1) (5q), enfermedad de Sandhoff (5q13), atrofia espinal muscular asociada con el receptor de glucocorticoide (5q31), dihidrofolato reductasa (DHFR) (5q11.2-q13.2) (5q12.2-q13.3) y deficiencia de la hormona pituitaria (5q), todos ellos se manifiestan de por sí en patologías humanas y también mapean en esta región del genoma humano. Véase, la Online Mendelian Inheritance of Man (OMIM™, National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD) mapeo genético y referencias en su interior para esta región del cromosoma 5 en un servidor WWW disponible al público (http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Omim/getmap?chromosome=5q11_and_surrounding loci). Todos estos sirven como genes candidatos posibles para una enfermedad hereditaria que muestra relación con la misma región cromosómica que la del gen de zcytor17.

De manera similar, defectos en el propio locus de zcytor17, pueden producir patologías humanas hereditarias como se indica en el presente documento. Un experto en la técnica apreciaría que se sabe que los defectos en los receptores de citocina causan patologías en seres humanos. Por ejemplo, mutaciones en receptores de la hormona de crecimiento producen enanismo (Amselem, S y col, New Eng. J. Med. 321: 989-995, 1989), mutaciones en el la cadena gamma del receptor de IL-2 producen inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (Noguchi, M y col, Cell 73: 147-157, 1993), mutaciones en c-Mpl producen trombocitopenia (Ihara, K y col, Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 3132-3136, 1999), e infecciones graves por *Salmonella* y micobacterias dan lugar a pacientes con déficit del receptor de la interleucina 12 (de Jong, R y col, Science 280: 1435-1438, 1998), entre otras. Por lo tanto, de manera similar, los defectos en zcytor17 pueden causar una patología o susceptibilidad a enfermedad o infección. Dado que el gen de zcytor17 se localiza en la región 5q11, pueden usarse sondas polinucleotídicas para detectar la pérdida, trisomía, duplicación o translocación del cromosoma 5q11, asociadas con enfermedades humanas, tales como cánceres de células inmunitarias, cánceres de médula ósea, cáncer de próstata, cánceres tiroideo, paratiroideo u otros cánceres o enfermedades inmunitarias. Además, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, ayudarían en la detección, diagnóstico, prevención y tratamiento asociado con un defecto genético de zcytor17.

Un diagnóstico podría ayudar a los médicos a determinar el tipo de enfermedad y terapia asociada apropiada, o asistencia para un consejo genético. Como tales, los anticuerpos contra zcytor17, los polinucleótidos y polipéptidos de la invención pueden usarse para la detección del polipéptido de zcytor17, ARNm o anticuerpos contra zcytor17, sirviendo de este modo como marcadores y usándose directamente para la detección de enfermedades genéticas o cánceres, como se describe en el presente documento, usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. Adicionalmente, las sondas polinucleotídicas de zcytor17 pueden usarse para detectar anomalías o genotipos asociados con deleciones y translocaciones en el cromosoma 5q11 que se asocian con enfermedades humanas, o translocaciones implicadas con progresión maligna de tumores u otras mutaciones en 5q11, que se espera que estén implicadas en reordenaciones cromosómicas en malignidad; o en otros cánceres, o en aborto espontáneo. De manera similar, las sondas polinucleotídicas de zcytor17 pueden usarse para detectar anomalías o genotipos asociados con trisomía en el cromosoma 5q11 y pérdida de cromosoma asociada con enfermedades humanas o aborto espontáneo. Por tanto, las sondas polinucleotídicas de zcytor17 pueden usarse para detectar anomalías o genotipos asociados con estos defectos.

Como se ha indicado anteriormente, los defectos en el propio gen de zcytor17 pueden producir una patología humana hereditaria. Los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, ayudarían en la detección, diagnóstico, prevención y tratamiento asociado con un defecto genético de zcytor17. Además, las sondas polinucleotídicas de zcytor17 pueden usarse para detectar diferencias alélicas entre individuos enfermos o no enfermos en el locus cromosómico de zcytor17. Como tales, las secuencias de zcytor17 pueden usarse como herramientas de diagnóstico en el perfilado de ADN en análisis forense.

En general, en la técnica se conocen métodos de diagnóstico usados en análisis de ligamiento genético, para detectar una anomalía o aberración genética en un paciente. Las sondas analíticas tendrán generalmente una longitud de al menos 20 nt, aunque pueden usarse sondas algo más cortas (por ejemplo, de 14 a 17 nt). Los cebadores de PCR tienen una longitud de al menos 5 nt, preferentemente de 15 o más, más preferentemente de 20 a 30 nt. Para análisis completo de genes, o de ADN cromosómico, una sonda polinucleotídica de zcytor17 puede comprender un exón completo o más. Un experto en la técnica determina fácilmente exones comparando las secuencias de zcytor17 (por ejemplo, SEQ ID NO: 54) con el ADN genómico humano para zcytor17 (N.º de registro

GenBank AQ002781). En general, en la técnica se conocen métodos de diagnóstico usados en análisis de ligamiento genético, para detectar una anomalía o aberración genética en un paciente. La mayoría de los métodos de diagnóstico comprenden las etapas de (a) obtener una muestra genética de un paciente posiblemente enfermo, de un paciente enfermo o de un posible portador no enfermo de un alelo de enfermedad recesiva; (b) producir un primer producto de reacción incubando la muestra genética con una sonda polinucleotídica de zcytor17, donde el polinucleótido se hibridará con la secuencia de polinucleótidos complementaria, tal como en análisis RFPL o incubando la muestra genética con cebadores en sentido y antisentido en una reacción PCR en condiciones de reacción de PCR apropiadas; (iii) visualizar el primer producto de reacción mediante electroforesis en gel y/u otro método conocido, tal como visualizando el primer producto de reacción con una sonda polinucleotídica de zcytor17 donde el polinucleótido se hibridará con la secuencia de polinucleótidos complementara de la primera reacción; y (iv) comparar el primer producto de reacción visualizado con un segundo producto de reacción de control de una muestra genética de un paciente de tipo silvestre. Una diferencia entre primer producto de reacción y el producto de reacción de control es indicativa de una anomalía genética en el paciente enfermo o posiblemente enfermo, o de la presencia de un fenotipo portador recesivo heterocigoto para un paciente no enfermo, o de la presencia de un defecto genético en un tumor de un paciente enfermo, o de la presencia de una anomalía genética en un feto o en un embrión antes de la implantación. Por ejemplo, una diferencia en el patrón de fragmentos de restricción, en la longitud de los productos de la PCR, en la longitud de secuencias repetitivas en el locus genético de zcytor17, y similares, son indicativas de una anomalía genética, aberración genética, o diferencia alélica en comparación con el control de tipo silvestre normal. Los controles pueden ser de miembros de la familia no afectados, o de individuos no relacionados, dependiendo del ensayo y de la disponibilidad de las muestras. Las muestras genéticas para su uso en la presente divulgación incluyen ADN genómico, ARNm y ADNc aislados de cualquier tejido o de otra muestra biológica de un paciente, tal como, pero sin limitación, sangre, saliva, semen, células embrionarias, fluido amniótico y similar. La sonda o cebador polinucleotídico puede ser ARN o ADN, y comprenderá una parte de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 53, el complemento de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 53 o un ARN equivalente de las mismas. Dichos métodos de muestra de análisis de ligamiento genético con fenotipos de enfermedades humanas son muy conocidos en la técnica. Por referencia a métodos basados en PCR en diagnósticos véase, en líneas generales, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), White (ed.), *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (Humana Press, Inc. 1993), Cotter (ed.), *Molecular Diagnosis of Cancer* (Humana Press, Inc. 1996), Hanausek y Walaszek (eds.), *Tumor Marker Protocols* (Humana Press, Inc. 1998), Lo (ed.), *Clinical Applications of PCR* (Humana Press, Inc. 1998), y Meltzer (ed.), *PCR in Bioanalysis* (Humana Press, Inc. 1998)).

Las mutaciones asociadas con el locus de zcytor17 pueden detectarse usando moléculas de ácido nucleico de la presente invención empleando métodos convencionales para análisis de mutación directa, tales como análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, técnicas de PCR que emplean análisis de repetición en tándem corta, análisis de sistemas de mutación refractarios a la amplificación, detección de polimorfismo de conformación de cadena simple, métodos de escisión de RNasa, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, análisis de emparejamiento erróneo asistidos con fluorescencia y otras técnicas de análisis genético conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), Marian, *Chest* 108:255 (1995), Coleman y Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Human Press, Inc. 1996), Elles (ed.) *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), *Laboratory Protocols for Mutation Detection* (Oxford University Press 1996), Birren y col, (eds.), *Genome Analysis*, Vol. 2: *Detecting Genes* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998), Dracopoli y col, (eds.), *Current Protocols in Human Genetics* (John Wiley & Sons 1998), y Richards y Ward, "Molecular Diagnostic Testing," in *Principles of Molecular Medicine*, págs. 83-88 (Humana Press, Inc. 1998)). Los análisis directos de un gen de zcytor17 para una mutación pueden realizarse usando ADN genómico del sujeto. Los métodos para la amplificación de ADN genómico, obtenido, por ejemplo, de linfocitos de sangre periférica son muy conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Dracopoli y col, (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, en las págs. 7.1.6 a 7.1.7 (John Wiley & Sons 1998)).

También pueden generarse ratones modificados genéticamente para expresar el gen de zcytor17, denominados "ratones transgénicos", y ratones que exhiben una ausencia completa de la función génica de zcytor17, denominados "ratones genosuprimidos (*knockout*)" (Snouwaert y col, *Science* 257:1083, 1992; Lowell y col, *Nature* 366:740-42, 1993; Capecchi, M.R., *Science* 244: 1288-1292, 1989; Palmiter, R.D. y col, *Annu Rev Genet.* 20: 465-499, 1986). Por ejemplo, pueden usarse ratones transgénicos que sobreexpresen zcytor17, de manera ubicua o bajo un promotor específico de tejido o restringido a tejido, para averiguar si la sobreexpresión causa un fenotipo. Por ejemplo, la sobreexpresión de un polipéptido de zcytor17 de tipo silvestre, fragmento polipeptídico o un mutante de los mismos puede alterar procesos celulares normales, dando como resultado un fenotipo que identifica un tejido en el que la expresión de zcytor17 es funcionalmente relevante y puede indicar una diana terapéutica para zcytor17, sus agonistas o antagonistas. Por ejemplo, un ratón transgénico preferido para modificar genéticamente es uno que expresa un fenotipo "negativo dominante", tal como uno que sobreexpresa el polipéptido de zcytor17 que comprende un dominio de unión a citocina extracelular con el dominio transmembrana unido (aproximadamente los aminoácidos 20 (ala) a 543 (Leu) de la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 46; o 33 (ala) a 556 (Leu) de la SEQ ID NO: 54). Otro ratón transgénico preferido es uno que sobreexpresa receptores solubles de zcytor17, tales como los desvelados en el presente documento. Además, dicha sobreexpresión puede dar como resultado un fenotipo que muestra similitud con enfermedades humanas. De manera similar, pueden usarse ratones zcytor17 genosuprimidos para determinar si

zcytor17 se requiere absolutamente *in vivo*. El fenotipo de los ratones genosuprimidos es predictivo de los efectos *in vivo* que puede tener un antagonista de zcytor17, tales como los descritos en el presente documento. El ARNm, ADNc (SEQ ID NO: 56 y/o SEQ ID NO: 92) y ADN genómico de zcytor17 de ratón, se usan para generar ratones genosuprimidos. Estos ratones transgénicos y genosuprimidos pueden emplearse para estudiar el gen de zcytor17 y la proteína codificada por el mismo en un sistema *in vivo*, y pueden usarse como modelos *in vivo* para enfermedades humanas o animales correspondientes (tales como las de poblaciones animales viables en el comercio). Los modelos de ratón descritos en el presente documento son particularmente relevantes como modelos del sistema inmunitario, modelos de inflamación o tumorales para el estudio de la biología y progresión del cáncer. Dichos modelos son útiles en el desarrollo y eficacia de moléculas terapéuticas usadas en enfermedades inmunitarias humanas, inflamación y cánceres. Dado que los aumentos en la expresión de zcytor17, así como la disminución en la expresión de zcytor17 están asociados con monocitos, activación de monocitos y células prostáticas, y pueden asociarse con inflamación y cánceres, tanto los ratones transgénicos como los ratones genosuprimidos sirven como modelos animales útiles para enfermedades humanas. Adicionalmente, en una realización preferida, el ratón transgénico zcytor17 puede servir como un modelo animal para enfermedades específicas, particularmente las asociadas con monocitos. Adicionalmente, la expresión en ratones transgénicos de polinucleótidos antisentido de zcytor17 o ribozimas dirigidas contra zcytor17, descritos en el presente documento, pueden usarse de manera análoga en los ratones transgénicos descritos anteriormente.

Para el uso farmacéutico, los polipéptidos de la presente invención, como se indica en las reivindicaciones, pueden formularse para suministro parenteral, particularmente intravenoso o subcutáneo, de acuerdo con métodos convencionales. La administración intravenosa será por inyección en bolo o infusión durante un periodo típico de una a varias horas. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán un polipéptido receptor soluble zcytor17 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5 % en agua o similar. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tampón, albúmina para impedir la pérdida de proteínas sobre las superficies de los viales, etc. En la técnica se conocen bien métodos de formulación y se desvelan, por ejemplo, en Remington: The Science y Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th ed., 1995. Las dosis terapéuticas generalmente estarán en el intervalo de 0,1 a 100 µg/kg de peso del paciente al día, preferentemente de 0,5-20 mg/kg al día, siendo el médico quien determine la dosis exacta de acuerdo con las normas aceptadas, teniendo en cuenta la naturaleza y la gravedad de la afección que vaya a tratarse, las características de los pacientes, etc. La determinación de la dosis se encuentra dentro del nivel de la experiencia habitual en la técnica. Las proteínas pueden administrarse para el tratamiento agudo, durante una semana o menos, a menudo durante un periodo de uno a tres días o pueden usarse en un tratamiento crónico, durante varios meses o años. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido receptor soluble zcytor17 es una cantidad suficiente para deducir un efecto clínicamente significativo.

Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención encontrarán adicionalmente uso como herramientas educativas como un kit práctico de laboratorio para cursos relacionados con biología molecular y genética, química de proteínas y producción y análisis de anticuerpos. Debido a su secuencia de polinucleótidos y polipeptídica única, las moléculas de zcytor17 pueden usarse como patrones o como "incógnitas" para fines de ensayo. Por ejemplo, los polinucleótidos zcytor17 pueden usarse como una ayuda, tal como, por ejemplo, para enseñar a un estudiante como preparar construcciones de expresión para la expresión de bacterias, virus y/o mamíferos, incluyendo construcciones de fusión, en las que zcytor17 es el gen a expresar; para determinar los sitios de escisión por endonucleasas de restricción de los polinucleótidos; determinar la localización de ARNm y ADN de polinucleótidos zcytor17 en tejidos (es decir, transferencia de Northern y Southern, así como reacción en cadena de la polimerasa); y para identificar polinucleótidos y polipéptidos relacionados mediante hibridación de ácido nucleico.

Los polipéptidos de zcytor17 pueden usarse de un modo educativo como una ayuda para enseñar a preparar anticuerpos; identificar proteínas mediante transferencia de Western; purificar proteínas; determinar el peso de los polipéptidos de zcytor17 expresados como una proporción con respecto a la proteína total expresada; identificar sitios de escisión peptídica; acoplamiento de etiquetas amino y carboxilo terminales; análisis de secuencia de aminoácidos, así como, pero sin limitación, para monitorizar actividades biológicas de la proteína tanto nativa como etiquetada (es decir, unión al receptor, transducción de señales, proliferación y diferenciación) *in vitro* e *in vivo*. Los polipéptidos de zcytor17 también pueden usarse para enseñar destrezas analíticas tales como espectrometría de masas, dicroidismo circular para determinar la conformación, especialmente de las cuatro hélices alfa, cristalografía de rayos-x para determinar la estructura tridimensional con detalle atómico, espectroscopia por resonancia magnética nuclear para revelar la estructura de las proteínas en solución. Por ejemplo, puede proporcionarse un kit que contenga el polipéptido de zcytor17 al estudiante para analizar. Dado que el profesor conocería la secuencia de aminoácidos, el estudiante recibiría la proteína específica como un ensayo para determinar las destrezas o desarrollar las destrezas del estudiante, por lo que el docente sabría si el estudiante ha analizado correctamente o no el polipéptido. Dado que cada polipéptido es exclusivo, la utilidad educativa de zcytor17 sería en sí misma exclusiva.

Adicionalmente, dado que zcytor17 tiene una expresión específica de tejido y es un polipéptido con una estructura de receptor de citocina de clase I y una localización cromosómica distinta, el patrón de expresión y la actividad pueden medirse usando ensayos de proliferación; ensayos con luciferasa y de unión descritos en el presente

documento. Adicionalmente, la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos de zcytor17 en monocitos, tejido de próstata, linfóide y otros tejidos, puede analizarse para formar a estudiantes en el uso de identificación y métodos específicos de tejido y diagnóstico. Además, los polinucleótidos zcytor17 pueden usarse para formar a estudiantes sobre el uso de métodos de detección de cromosomas y de diagnóstico, dado que su locus se conoce.

5 Adicionalmente, los estudiantes pueden formarse y educarse específicamente sobre el cromosoma 1 humano, y más específicamente, sobre el locus 5q11 en el que se localiza el gen de zcytor17. Dichos ensayos son muy conocidos en la técnica, y pueden usarse en un entorno educativo para instruir a los estudiantes acerca de proteínas receptoras de citocina y examinar diferentes propiedades, tales como efectos celulares en células, cinética enzimática, variación de afinidades de unión de anticuerpos, especificidad tisular, y similares, entre zcytor17 y otros polipéptidos receptores de citocina en la técnica.

15 Los anticuerpos que se unen específicamente a zcytor17 pueden usarse como una ayuda formativa para instruir a los estudiantes acerca de cómo preparar columnas de cromatografía de afinidad para purificar zcytor17, para la clonación y secuenciación del polinucleótido que codifica un anticuerpo y, por tanto, como un periodo de práctica para instruir a un estudiante sobre cómo diseñar anticuerpos humanizados. Adicionalmente, los anticuerpos que se unen específicamente a zcytor17 pueden usarse como una ayuda formativa para su uso en la detección de, por ejemplo, células de monocitos activadas, separación de células, o tejido de cáncer de próstata o linfóide, usando métodos histológicos e *in situ* entre otros conocidos en la técnica. El gen, polipéptido o anticuerpo de zcytor17 se envasaría en compañías de reactivos y se comercializaría a universidades y a otras entidades educativas de manera que los estudiantes se formarían en técnicas de biología molecular. Dado que cada gen y cada proteína es exclusivo, cada gen y cada proteína crea desafíos y experiencias de aprendizaje exclusivos para los estudiantes en un periodo de prácticas de laboratorio. Dichos kits educativos que contienen el gen, el polipéptido o el anticuerpo de zcytor17 se consideran dentro del alcance de la presente divulgación.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

30 Identificación y aislamiento de ADNc de zcytor17 humano de longitud completa. Zcytor17 se identificó como un ADNc de longitud completa predicho a partir de ADN genómico humano. La secuencia de polinucleótidos de zcytor17 de longitud completa predicha se muestra en la SEQ ID NO: 1 y el polipéptido correspondiente se muestra en la SEQ ID NO: 2. Para obtener un ADNc de longitud completa de una fuente tisular, se emplearon los extremos 5' y 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends, amplificación rápida de extremos de ADNc). A partir de la secuencia genómica identificada AQ002781 (GenBank) se diseñaron diversos cebadores oligonucleotídicos. Los cebadores se usaron para el cebado interno dentro de la secuencia genómica hasta aislar finalmente un ADNc de longitud completa.

40 A. 5' RACE para zcytor17

Usando una biblioteca de ADNc de HPVS como molde y los oligonucleótidos ZC12,701 (SEQ ID NO: 5) y ZC27,898 (SEQ ID NO: 6) como cebadores, se generó un producto 5' RACE. HPVS es una biblioteca de ADNc de uso interno generada a partir de una línea de célula epitelial de próstata humana (ATCC n.º CRL-2221). La reacción PCR usó como molde aproximadamente 1 µg de ADN plasmídico preparado a partir de la biblioteca de ADNc, 5 µl de tampón PCR 10X (GIBCO/BRL), 5 µl de los dNTP 10 mM (Perkin Elmer), 20 pmol de cada oligonucleótido y 1 µl (5,0 unidades) de Taq polimerasa (GIBCO/BRL) en un volumen de reacción de 50 µl. Esta primera ronda de reacción PCR 5' RACE se ejecutó de la siguiente manera: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos, después a 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 4 °C. Una alícuota del producto de la PCR 5' RACE se retiró y se analizó en un gel de agarosa al 1,0 %. En el gel se observaron bandas múltiples.

El producto PCR 5' RACE restante se precipitó con etanol y se diluyó a 1:50. Para amplificar la secuencia de ADNc molde se ejecutó una segunda ronda de reacción PCR 5' RACE anidada. Esta reacción PCR usó los oligonucleótidos ZC14,063 (SEQ ID NO: 7) y ZC27,899 (SEQ ID NO: 8), que se diseñaron para hibridar con la secuencia interna de ZC12,701 (SEQ ID NO: 5) y ZC27,898 (SEQ ID NO: 6). Esta reacción PCR anidada se ejecutó según la primera ronda de reacción 5' RACE desvelada anteriormente. Los productos de ADN resultantes se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 % y se observó una banda prominente a aproximadamente 900 pb. La banda de ADN se purificó en gel y se secuenció usando métodos convencionales. Los análisis de secuencia revelaron que el producto de ADN incluía parte de la secuencia genómica de ADN AQ002781 (GenBank) y apareció para extender la secuencia de ADNc para zcytor17 en el extremo 5' para incluir un resto de metionina iniciador de la traducción y alguna secuencia no traducida 5'. La secuencia de polinucleótidos del producto 5' RACE se muestra en la SEQ ID NO: 9

65 B. 3' RACE para zcytor17

Usando el producto 5' RACE (SEQ ID NO: 9) obtenido anteriormente se diseñaron cebadores para 3' RACE. Se

generó un producto 3' RACE usando como molde una biblioteca de ADNc de uso interno de próstata humana y los oligonucleótidos ZC28,481 (SEQ ID NO: 10) y ZC6,346 (SEQ ID NO: 11) como cebadores. Esta primera ronda de reacción PCR 3' RACE se ejecutó en las condiciones descritas en el Ejemplo 1A. Una alícuota del producto de la PCR 3' RACE se retiró y se analizó en un gel de agarosa al 1,0 %. En el gel se observaron bandas múltiples.

5 El producto de la PCR 3' RACE restante se precipitó con etanol y se diluyó a 1:40. Para amplificar la secuencia de ADNc molde se ejecutó una segunda ronda de reacción PCR 3' RACE anidada. Esta reacción PCR usó los oligonucleótidos ZC28,480 (SEQ ID NO: 12) y ZC26,405 (SEQ ID NO: 13), que se diseñaron para hibridar con la secuencia interna de ZC28,481 (SEQ ID NO: 10) y ZC6,346 (SEQ ID NO: 11). Esta reacción PCR anidada se
10 ejecutó como se ha desvelado anteriormente. Los productos de ADN resultantes se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 % y se observó una banda prominente a aproximadamente 2100 pb.

15 El ADN restante se precipitó con etanol y se diluyó a 1:40. Para amplificar la secuencia de ADNc molde se ejecutó una tercera ronda de reacción PCR 3' RACE anidada. Esta reacción PCR usó los oligonucleótidos ZC27,895 (SEQ ID NO: 14) y ZC5,020 (SEQ ID NO: 15), que se diseñaron para hibridar con la secuencia interna de ZC28,480 (SEQ ID NO: 12) y ZC26,405 (SEQ ID NO: 13). Esta reacción PCR anidada se ejecutó como se ha desvelado anteriormente. Los productos de la PCR resultantes se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 % y se observó una banda prominente a aproximadamente 2000 pb. La banda de ADN se purificó en gel y se secuenció. Los análisis de secuencia revelaron que el producto de ADN incluía parte del producto 5' RACE (SEQ ID NO: 9) y
20 aparecieron para extender la secuencia de ADNc para zcytor17 en el extremo 3' para incluir un codón de terminación de la traducción y alguna secuencia no traducida 3'. La secuencia de polinucleótidos del producto 3' RACE se muestra en la SEQ ID NO: 16. La secuencia de polinucleótidos de zcytor17 de longitud completa se muestra en la SEQ ID NO: 45 y la secuencia polipeptídica correspondiente se muestra en la SEQ ID NO: 46.

25 C. Una segunda 5' RACE para zcytor17 identificó un zcytor17 alternativo de longitud completa

Se generó un producto 5' RACE usando como molde una biblioteca de ADNc WI-38 y los oligonucleótidos ZC12,701 (SEQ ID NO: 5) y ZC27,899 (SEQ ID NO: 8) como cebadores. WI-28 es una biblioteca de ADNc de uso interno generada a partir de una línea celular pulmonar embrionaria humana (ATCC n.º CRL-75). La reacción PCR usó
30 como molde aproximadamente 1 µg de ADN plasmídico preparado a partir de la biblioteca de ADNc, 5 µl de tampón PCR 10X (GIBCO/BRL), 5 µl de los dNTP 10 mM (Perkin Elmer), 20 pmol de cada oligonucleótido y 1 µl (5,0 unidades) de Taq polimerasa (GIBCO/BRL) en un volumen de reacción de 50 µl. Esta primera ronda de reacción PCR 5' RACE se ejecutó de la siguiente manera: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos, después a 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 4 °C. Una alícuota del producto de la PCR 5' RACE se retiró y se analizó en un gel de agarosa al 1,0 %. En el gel se observaron bandas múltiples.

El ADN restante se precipitó con etanol y se diluyó a 1:50. Para amplificar la secuencia de ADNc molde se ejecutó una segunda ronda de reacción PCR 5' RACE anidada. Esta reacción PCR usó los oligonucleótidos ZC14,063 (SEQ ID NO: 25), y ZC27,900 (SEQ ID NO: 51), que se diseñaron para hibridar con la secuencia interna de ZC12,701 (SEQ ID NO: 5) y ZC27, 899 (SEQ ID NO: 8). Esta reacción PCR anidada se ejecutó según la primera ronda de
40 reacción 5' RACE desvelada anteriormente. Los productos de ADN resultantes se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 % y se observó una banda prominente a aproximadamente 1200 pb. La banda de ADN se purificó en gel y se secuenció. Los análisis de secuencia revelaron que el producto de ADN incluía parte de la secuencia de ADN genómico AQ002781 (GenBank) y aparecieron para extender la secuencia de ADNc para zcytor17 en el extremo 5' para incluir un resto de metionina iniciadora de la traducción y alguna secuencia no traducida 5'. La secuenciación de ADN mostró que el polipéptido generado a partir de la traducción de esta metionina iniciadora alternativa (mostrada en la SEQ ID NO: 53 en el nucleótido 497) genera una segunda forma de longitud completa de zcytor17 que difiere en 13 aminoácidos adicionales en fase el extremo N (MKLSPQPSCVNLG; SEQ ID NO: 52) de la mostrada en la SEQ ID NO: 46. La secuencia de polinucleótidos de la segunda forma de longitud completa de zcytor17 se muestra en la SEQ ID NO: 53 y la secuencia polipeptídica correspondiente se muestra en la SEQ ID NO: 54. La segunda forma de longitud completa de zcytor17 (SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54) es probablemente la forma más comúnmente expresada.

55 **Ejemplo 2**

Identificación y aislamiento de formas truncadas de ADNc de zcytor17 humano A. Aislamiento de un ADNc que codifica una forma variante de zcytor17 truncada en el dominio de fibronectina

Usando un protocolo idéntico al descrito anteriormente para 3' RACE, se generó un producto 3' RACE para una forma soluble truncada de zcytor17 (Ejemplo 1B), excepto que el material de partida fue la biblioteca de ADNc de HPVS. HPVS es una biblioteca de ADNc de uso interno generada a partir de una línea celular epitelial de próstata humana (ATCC n.º CRL-2221). Los productos resultantes de la tercera ronda 3' RACE anidada se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 % y se observó una banda prominente a aproximadamente 700 pb. La banda de ADN se purificó en gel y se secuenció. Los análisis de secuencia revelaron que el producto de ADN incluía parte del producto 5' RACE (SEQ ID NO: 9) y aparecieron para extender la secuencia de ADNc para zcytor17 para
65 incluir un codón de terminación de la traducción cerca del extremo del dominio de unión a citocina. Esto podría

representar una forma soluble expresada del receptor truncada en el dominio de fibronectina. La secuencia de polinucleótidos de la forma soluble de zcytor17 truncada dentro del dominio de fibronectina se muestra en la SEQ ID NO: 15 y la secuencia polipeptídica correspondiente se muestra en la SEQ ID NO: 18.

5 B. Aislamiento de un ADNc que codifica una forma de zcytor17 truncada en el extremo del dominio de unión a citocina

Se generó un producto 3' RACE para una forma truncada de zcytor17 usando como molde la biblioteca de ADNc HPVS y ZC27,895 (SEQ ID NO: 14) y ZC6,346 (SEQ ID NO: 11) como cebadores. Esta primera ronda de reacción PCR 3' RACE se ejecutó de la siguiente manera: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos, después 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 4 °C. Una alícuota de producto PCR 3' RACE se retiró y se analizó en un gel de agarosa al 1,0 %. En el gel se observaron bandas múltiples.

15 El ADN restante se precipitó con etanol y se diluyó a 1:40. Se ejecutó una segunda ronda de reacción PCR 3' RACE anidada para amplificar la secuencia de ADNc molde. Esta reacción PCR usó los oligonucleótidos ZC27,897 (SEQ ID NO: 19) y ZC5,020 (SEQ ID NO: 15), que se diseñaron para hibridar con la secuencia interna de ZC27,895 (SEQ ID NO: 14) y ZC6,346 (SEQ ID NO: 11). Esta reacción PCR anidada se ejecutó según la primera ronda 5' RACE desvelada en el Ejemplo 1A anterior. Los productos de ADN resultantes se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 % y se observó una banda prominente a aproximadamente 1100 pb. La banda de ADN se purificó en gel y se secuenció. Los análisis de secuencia revelaron que el producto de ADN incluía parte de la secuencia de ADN genómica AQ002781 (GenBank) y aparecieron para extender la secuencia de ADNc para zcytor17 en el extremo 3' para incluir un codón de terminación de traducción en el extremo del dominio de unión de citocina.

25 Para confirmar que la secuencia anterior solapaba efectivamente con la secuencia de ADN genómica AQ002781, se realizó una reacción PCR adicional. Se generó un producto PCR usando como molde la biblioteca de ADNc HPVS y los oligonucleótidos ZC28,481 (SEQ ID NO: 10) y ZC28,521 (SEQ ID NO: 20) como cebadores. La reacción PCR se ejecutó de la siguiente manera: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos, después 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 4 °C. Los productos de ADN resultantes se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 % y se observó una banda prominente a aproximadamente 800 pb. La banda de ADN se purificó en gel y se secuenció. Los análisis de secuencia confirmaron que se trataba de una forma truncada de zcytor17. Esto representaría una forma soluble expresada del receptor truncada cerca del extremo del dominio de unión a citocina. La secuencia polinucleotídica de esta forma soluble de zcytor17 se muestra en la SEQ ID NO: 21 y la secuencia polipeptídica correspondiente se muestra en la SEQ ID NO: 22.

35 Se aisló otro producto 3' RACE truncado usando el protocolo descrito anteriormente para el aislamiento de una variante de ADNc truncada en el dominio de fibronectina (Ejemplo 2A). La secuenciación del producto PCR aislado verificó la secuencia de la forma soluble de zcytor17 como se muestra en la SEQ ID NO: 21.

40 **Ejemplo 3**

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

45 Para determinar la distribución tisular de la expresión de zcytor17 humano, se exploraron Transferencias Northern de Tejido Múltiple Humano (transferencia MTN humano I y II de 12 carriles y Transferencia MTN II del Sistema Inmunitario Humano; MTN Endocrino Humano, Transferencia MTN Fetal Humano II, matriz tisular múltiple humana (Clontech) así como en transferencias de uso interno que contenían diversos tejidos. Las transferencias preparadas de uso interno incluían los siguientes ARNm de tejidos y líneas celulares: células SK-Hep-1, células THP1, glándula Adrenal (Clontech); Riñón (Clontech), Hígado (Clontech e Invitrogen); médula Espinal (Clontech), Testículos (Clontech), linfocitos T CD4+ Humanos, linfocitos T CD8+ Humanos, linfocitos T CD19+ Humanos, reacción de linfocitos mixtos humanos (MLR), línea celular THP1 (ATCC n.º TIB-202), línea celular U937, línea celular linfoblástica de ratón P388D1 (ATCC n.º CCL-46) con o sin estimulación con ionomicina; y línea celular pulmonar embrionaria humana WI-38 (ATCC n.º CRL-2221) con o sin estimulación con ionomicina.

55 Se amplificó una sonda derivada de PCR de aproximadamente 500 pb usando, como molde, 5' RACE (Ejemplo 1A) (SEQ ID NO: 9) y los oligonucleótidos ZC28,575 (SEQ ID NO: 23) y ZC27,899 (SEQ ID NO: 24) como cebadores. La amplificación por PCR se realizó de la siguiente manera: 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, y 72 °C durante 1 minuto; seguido de 1 ciclo a 72 °C durante 7 minutos. El producto PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa y el producto PCR de aproximadamente 500 pb se purificó en gel como se describe en el presente documento. La sonda se marcó de radioactividad usando el Kit de Marcaje de cebadores al azar PRIME IT II™ (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna de impulso NUCTRAP™ (Stratagene). Se usó solución EXPRESSHYB™ (Clontech) para la prehibridación y como una solución de hibridación para las transferencias de Northern. La prehibridación se realizó a 68 °C durante 2 horas. La hibridación tuvo lugar durante la noche a 68 °C con aproximadamente 1,5 X 10⁶ cpm/ml de sonda marcada. Las transferencias se lavaron tres veces a temperatura ambiente en 2X SSC, SDS al 0,05 %, seguido de 1 lavado durante 10 minutos en 2X SSC, SDS al 0,1 % a 50 °C. Después de varios días de exposición se observaron

varias bandas débiles. Se observó un transcrito de aproximadamente 9 kb en la tráquea, músculo esquelético y timo; se observó un transcrito de aproximadamente 2 kb en células PBL, HPV, U937 y THP-1; y se observó un transcrito de aproximadamente 1,2 kb en la placenta, médula ósea y tiroides y en células HPV y U937. En todos los tejidos indicados anteriormente, la intensidad de la señal fue débil. Esto apareció que era una pequeña expresión en la mayoría de los tejidos normales, lo que sugiere que la expresión de zcytor17 puede ser dependiente de la activación de las células o de los tejidos en los que se expresa.

Se realizó también análisis Northern usando la línea celular de cáncer humano MTN™ (Clontech). Las condiciones de PCR y exploración son como se ha descrito anteriormente. Una fuerte señal en una línea de cáncer sugiere que la expresión de zcytor17 puede expresarse en células activadas y/o puede indicar una patología cancerosa. Además, usando métodos conocidos en la técnica, las transferencias Northern y análisis PCR de células linfocíticas activadas también pueden mostrar si zcytor17 se expresa en células inmunitarias activadas.

B. Distribución tisular en paneles tisulares usando PCR

Se identificó un panel de ADNc de tejidos humanos para la expresión de zcytor17 usando PCR. El panel se realizó internamente y contenía 94 muestras de ADNc y de ADNc Marathon de diversos tejidos y líneas celulares humanas normales y cancerosas como se muestra en la Tabla 5 más adelante. Los ADNc provenían de bibliotecas de uso interno o de ADNc Marathon de preparaciones de ARN internas, ARN de Clontech o ARN de Invitrogen. Los ADNc Marathon se prepararon usando el kit Marathon-Ready™ (Clontech, Palo Alto, CA) y el CC se ensayó con cebadores de clatrina ZC21195 (SEQ ID NO: 49) y ZC21196 (SEQ ID NO: 50) y después se diluyeron basándose en la intensidad de la banda de clatrina. Para asegurar la calidad de las muestras de los paneles, se ejecutaron tres ensayos para el control de calidad (CC): (1) para evaluar la calidad de ARN usado para las bibliotecas, los ADNc internos se ensayaron para determinar el tamaño promedio del inserto por PCR con oligovectores que eran específicos para las secuencias del vector para una biblioteca de ADNc individual; (2) la estandarización de la concentración del ADNc en las muestras del panel se realizó usando métodos de PCR convencionales para amplificar el ADNc de longitud completa de la alfa tubulina o de G3PDH usando un oligovector 5' ZC14,063 (SEQ ID NO: 25) y un oligocebador 3' específico de alfa tubulina ZC17,574 (SEQ ID NO: 26) o un oligocebador 3' específico de G3PDH ZC17,600 (SEQ ID NO: 27); y (3) una muestra se envió a secuenciación para verificar una posible contaminación por ADN mitocondrial o ribosómico. El panel se configuró en un formato de 96 pocillos que incluyó una muestra de control positivo de ADN genómico humano (Clontech, Palo Alto, CA). Cada pocillo contenía aproximadamente 0,2-100 pg/μl de ADNc. Las reacciones PCR se configuraron usando los oligos ZC26,358 (SEQ ID NO: 28) y ZC26,359 (SEQ ID NO: 29), TaKaRa Ex Taq™ (TAKARA Shuzo Co LTD, Biomedicals Group, Japón) y colorante Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). La amplificación se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo a 94 °C durante 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 66,3 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, seguido de 1 ciclo a 72 °C durante 5 minutos. Aproximadamente 10 μl del producto de reacción de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa estándar usando un gel de agarosa al 4 %. El tamaño del fragmento de ADN predicho corregido se observó en ganglio linfático, próstata, tiroides, HPV (epitelio de próstata), HPVS (epitelio de próstata, seleccionado) tumor de pulmón, reacciones de tumor de útero, junto con la reacción de ADN genómico. Uno de los cebadores puede hibridarse con el genómico o con el receptor soluble de forma corta zcytor17 (SEQ ID NO: 21), lo que sugiere que el patrón de expresión observado puede ser el de esta forma alternativa de zcytor17.

El fragmento de ADN para tejido de próstata (2 muestras), HPV (epitelio de próstata), HPVS (epitelio de próstata, seleccionado) y genómico se escindieron y purificaron usando un kit extracción con gel (Qiagen, Chatsworth, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se confirmaron por secuenciación para mostrar que en realidad eran de zcytor17.

Tabla 5

Tejido/línea celular	n.º de muestras	Tejido/línea celular	n.º de muestras
Glándula adrenal	1	Médula ósea	3
Vejiga	1	Cerebro fetal	3
Médula ósea	1	Islotes	2
Cerebro	1	Próstata	3
Cuello uterino	1	RPMI n.º 1788 (ATCC n.º CCL-156)	2
Colon	1	Testículo	4
Cerebro fetal	1	Tiroides	2
Corazón fetal	1	WI38 (ATCC n.º CCL-75)	2
Riñón fetal	1	ARIP (ATCC n.º CRL-1674 - rata)	1
Hígado fetal	1	HaCat - queratinocitos humanos	1
Pulmón fetal	1	HPV (ATCC n.º CRL-2221)	1
Músculo fetal	1	Glándula adrenal	1
Piel fetal	1	Próstata SM	2

Corazón	2	CD3+ PBMC seleccionadas estimuladas con PMA + iodomicina	1
K562 (ATCC n.º CCL-243)	1	HPVS (ATCC n.º CRL-2221) – seleccionadas	1
Riñón	1	Corazón	1
Hígado	1	Pituitaria	1
Pulmón	1	Placenta	2
Ganglio linfático	1	Glándula salival	1
Melanoma	1	HL60 (ATCC n.º CCL-240)	3
Páncreas	1	Plaquetas	1
Pituitaria	1	HBL-100	1
Placenta	1	renal mesangial	1
Próstata	1	Linfocitos T	1
Recto	1	Neutrófilos	1
Glándula salival	1	MPC	1
Músculo esquelético	1	Hut-102 (ATCC n.º TIB-162)	1
Intestino delgado	1	Endotelial	1
Médula espinal	1	HepG2 (ATCC n.º HB-8065)	1
Bazo	1	Fibroblastos	1
Estómago	1	E. Histo	1
Testículo	2		
Timo	1		
Tiroides	1		
Traquea	1		
Útero	1		
Tumor esofágico	1		
Tumor gástrico	1		
Tumor renal	1		
Tumor hepático	1		
Tumor pulmonar	1		
Tumor de ovario	1		
Tumor rectal	1		
Tumor de útero	1		

B. Análisis de expresión de zcytoR17 mediante PCR y transferencia de Northern

- 5 La anotación de los tipos de células y de las condiciones de crecimiento que afectan a la expresión del receptor es un medio útil de aclarar su función y predecir una fuente de ligando. Para esta finalidad se examinó una amplia variedad de tipos de tejido y células por PCR. Se usó la polimerasa termoestable Advantage II™ (Clontech, La Jolla, CA) con los cebadores oligonucleotídicos ZC29,180 (SEQ ID NO: 73) y ZC29,179 (SEQ ID NO: 74) y 1-10ng de los diversos moldes de ADNc indicados a continuación para 30 ciclos de amplificación de (94 °C, 30 s; 66 °C, 20 s; 68 °C, 1 min. 30 s). Después de esto, el 20 % de cada reacción se procesó sobre geles de agarosa al 0,8 %, 10 TAE/bromuro de etidio y se visualizó con luz UV. Después, las muestras se puntuaron basándose en la intensidad de banda. Véase la siguiente Tabla 6.

Tabla 6

Células y Condiciones	Puntuación 0-5
Hel estimulada con PMA	0
U937	3
MCF-7	0
HuH7	1
Folículo humano	0
HT-29	0
HEPG2	0
HepG2 estimulada con IL6	0
Endotelial dérmica humana	0
Endotelial venosa humana	0
CD4+ humana	0
BEWO	0
CD19+ humana	1
PBMC humanas estimuladas con PHA, PMA, ionomicina, IL2, IL4, TNFα, durante 24 horas	0

PBMC humanas estimuladas con LPS, PWM, IFN γ , TNF α , durante 24 horas	0
PBMC humanas estimuladas con todas las condiciones anteriores durante 48 horas	4
HUVEC p.2	4
RPMI1788	0
TF1	0
Linfocitos T de bazo de mono estimulados con PMA, ionomicina	0
Epitelio de próstata humano HPV transformado	5
Amígdala humana, inflamada	0
HACAT	0
Condrocito humano	1
Sinoviocito humano	1
THP1	5
REH	0

De las señales PCR positivas fuertes, dos procedían de las líneas celulares monocíticas humanas U937 y THP1.

5 Estas dos líneas celulares, junto con una línea epitelial de próstata, se seleccionaron para análisis posterior mediante transferencia de Northern. Intentos previos al visualizar un transcrito por análisis de Northern usando
 10 ARNm de diversos tejidos produjeron señales débiles y difusas en el intervalo de tamaño sorprendentemente largo de 7-10 kb haciendo que estos datos sean difíciles de interpretar. Se preparó un gel desnaturante de formaldehído/MOPS/agarosa al 0,8 % (RNA Methodologies, Farrell, RE Academic Press) y se procesaron 2 μ g de ARNm poliA+ para cada muestra junto con una escalera de ARN (Life Technologies, Bethesda, MD). Después el gel
 15 se transfirió a nailon Hybond (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), se reticuló con UV, y se hibridó en solución ExpressHyb (Clontech, La Jolla, CA) a 68 °C durante una noche usando una sonda para zcytoR17 humano generado por PCR con los oligos ZC28, 575 (SEQ ID NO: 23), y ZC27,899 (SEQ ID NO: 24) y marcada con un kit Megaprime ³²P (Amersham). La transferencia de Northern se lavó posteriormente con 0,2 x SSC + SDS al 0,1 % a 65 °C durante 15 minutos y se expuso a una película durante 7 días con pantallas intensificadoras. Se observó una
 20 banda prominente de 8 kb en los carriles tanto de epitelio de próstata como de U937 mientras que en el carril de THP1 había una banda apenas visible.

Para optimizar el ADNc usado como una sonda de hibridación, cuatro regiones diferentes de la secuencia de zcytoR17 humano de longitud completa, se amplificaron por PCR, se marcaron y se hibridaron como se ha descrito
 25 anteriormente para transferencias de Southern que contenían ADN de la biblioteca de ADNc genómico y amplificado. Las cuatro sondas, denominadas en el presente documento, sondas A-D, se amplificaron usando los siguientes pares de cebadores: (A) ZC28,575 (SEQ ID NO: 23), ZC27,899 (SEQ ID NO: 24); (B) ZC27,895 (SEQ ID NO: 64), ZC28,917 (SEQ ID NO: 73); (C) ZC28,916 (SEQ ID NO: 75), ZC28,918 (SEQ ID NO: 76); y (D) ZC28,916 (SEQ ID NO: 75), ZC29,122 (SEQ ID NO: 65). El ADN genómico humano, junto con las bibliotecas de ADNc amplificado, que
 30 demostraron contener zcytoR17 por PCR, se sometieron a digestión con EcoR1 y Xho1 para liberar insertos y se procesaron por duplicado en geles de TAE/agarosa al 0,8 %, se desnaturaron con NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M, se transfirieron a Hybond, se reticularon con UV y cada uno de ellos se hibridó con una sonda distinta. Se descubrió que la sonda B tenía la señal de unión menos inespecífica y más fuerte. Por tanto, la sonda B se usó para hibridaciones posteriores.

Dado que las células THP1 son un excelente modelo de monocitos en circulación y expresan zcytoR17 a bajos niveles, estas se trataron con diversos compuestos en un esfuerzo para aumentar la expresión de zcytoR17. Las células crecieron a una densidad de 2e5/ml, se lavaron y se resuspendieron en diversos medios estimulantes, crecieron durante cuatro o treinta horas, y se recogieron para preparaciones de ADN. Cada uno de los medios se
 35 complementó con uno de los siguientes fármacos o pares de citocinas: LPS 2 μ g/ml (Sigma Chemicals, StLouis MO), hTNF α 2 ng/ml (R & D Systems, Minneapolis, MN), hGM-CSF 2 ng/ml (R & D Systems, Minneapolis, MN), hIFN γ 50 ng/ml (R & D Systems, Minneapolis, MN), hM-CSF 1 ng/ml (R & D Systems, Minneapolis, MN), hIL6 1 ng/ml (R & D Systems, Minneapolis, MN), hIL1 β 2 ng/ml (R & D Systems, Minneapolis, MN), hIFN γ 50 ng/ml + hIL4 0,5 ng/ml (R & D Systems, Minneapolis, MN), hIFN γ 50 ng/ml + hIL10 1 ng/ml (R & D Systems, Minneapolis, MN), PMA 10 ng/ml (Calbi-Ochem, SanDiego, CA) y un control no tratado. Al final del periodo de cultivo se preparó ARN Total usando un RNAeasy Midi-kit (Qiagen, Valencia, CA). Usando un kit de MPG (CPG, Lincoln Park, NJ) se seleccionó poli A+ ARN del ARN total. Se procesaron 2 μ g de poli A+ ARN de cada condición en geles de formaldehído/MOPS/agarosa, se transfirieron a nailon y se reticularon con UV como se ha descrito anteriormente. Estas transferencias de Northern se hibridaron después, como se ha indicado anteriormente, con la sonda B a 68 °C durante una noche, se lavaron a alta rigurosidad con 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C, se expusieron a una película durante una noche y después se
 45 expusieron a pantallas de fósforo para la cuantificación de señal.

En todos los carriles se observó una banda dominante de ARNm de 8 kb, así como una banda relativamente más débil de 2,8 kb. Se observó un aumento de 20 veces en el ARNm de zcytoR17 en el ARN de las células tratadas con hIFN γ durante 30 horas, este efecto se mutó ligeramente con tratamiento simultáneo con IL4. Se observaron aumentos 3 veces menores en el ARNm en ARN de células tratadas con LPS, TNF α y GM-CSF mientras que

MCSF, IL6 e IL1 β no tuvieron efecto en los niveles de ARNm de zcytor17. Considerados en conjunto, estos datos sugieren un papel para el receptor zcytor17 y su ligando en la biología de macrófagos procedentes de monocitos y por extensión en cualquier número de procesos de enfermedad en los que estas células participan.

5 Ejemplo 4

Mapeo cromosómico basado en PCR del gen de zcytor17

10 Zcytor17 se mapeó en el cromosoma 5 usando el “panel de mapeo de radiación híbrido (RH) GeneBridge 4” disponible en el comercio (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). El panel GeneBridge 4 RH contiene ADN de cada uno de los 93 clones de radiación híbridos, más dos ADN de control (el donante HFL y el receptor A23). Un servidor WWW disponible al público (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) permite el mapeo en relación con el mapa de radiación híbrido del Whitehead Institute/MTI Center for Genome Research's del genoma humano (el mapa de radiación híbrido “WICGR”) que se construyó con el panel GeneBridg 4 RH.

15 Para el mapeo de Zcytor17 con el panel GeneBridge 4 RH, se prepararon reacciones de 20 μ l en una placa de microtitulación de 96 pocillos compatible para PCR (Stratagene, La Jolla, CA) y se usaron en un termociclador “RoboCycler Gradient 96” (Stratagene). Cada una de las 95 reacciones PCR consistió en 2 μ l de tampón de reacción de PCR 10X KlenTaq (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), 1,6 μ l de mezcla de dNTP (2,5 mM de cada uno, PERKIN-ELMER, Foster City, CA), 1 μ l de cebador en sentido, ZC27,895 (SEQ ID NO: 14), 1 μ l de cebador antisentido, ZC27,899 (SEQ ID NO: 24), 2 μ l de “RediLoad” (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL), 0,4 μ l de mezcla de polimerasa KlenTaq Advantage 50X (Clontech Laboratories, Inc.), 25 ng de ADN de un clon híbrido individual o control y agua destilada para un volumen total de 20 μ l. Las reacciones se cubrieron con la misma cantidad de aceite mineral y se sellaron. Las condiciones del ciclo de la PCR fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de 5 minutos de desnaturalización a 94 $^{\circ}$ C, 35 ciclos de desnaturalización durante 45 segundos a 94 $^{\circ}$ C, 45 segundos de hibridación a 54 $^{\circ}$ C y 1 minuto y 15 segundos de extensión a 72 $^{\circ}$ C, seguido de 1 ciclo de extensión final de 7 minutos a 72 $^{\circ}$ C. Las reacciones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 % (EM Science, Gibbstown, NJ) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

30 Los resultados mostraron que Zcytor17 mapea en 6.72 cR_3000 distal del marcador armazón AFM183YB8 en el cromosoma 5 del mapa de radiación híbrido WICGR. El uso de genes/marcadores circundantes ubica a Zcytor17 en la región cromosómica 5q11.

Ejemplo 5

35 Construcción de la quimera MPL-polipéptido de zcytor17: dominio extracelular MPL y TM fusionado al dominio de señalización intracelular de zcytor17

40 El dominio extracelular 5' del receptor de MPL murino se aisló de un plásmido que contenía el receptor de MPL murino (plásmido PHZ1/MPL) por digestión con EcoRI y BamHI generando un fragmento de 1164 pb. La digestión se procesó en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento se aisló usando el kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El resto del dominio extracelular MPL y el dominio transmembrana se generaron usando PCR con los cebadores ZC6,673 (SEQ ID NO: 58) y ZC29,082 (SEQ ID NO: 59). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 15 ciclos a 94 $^{\circ}$ C durante 1 min, 55 $^{\circ}$ C durante 1 min, 72 $^{\circ}$ C durante 2 min; seguido por 72 $^{\circ}$ C durante 7 min; después una inmersión a 4 $^{\circ}$ C. El producto PCR se procesó en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento del receptor de MPL de aproximadamente 400 pb se aisló usando el kit de extracción en gel Qiaquick™ (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

50 El dominio intracelular de zcytor17 humano se aisló de un plásmido que contenía el ADNc de receptor zcytor17 (n.º 23/pCAP) usando PCR con los cebadores ZC29,083 (SEQ ID NO: 60) y ZC29,145 (SEQ ID NO: 61). La secuencia de polinucleótidos corresponde a la secuencia codificante del receptor zcytor17 que se muestra en la SEQ ID NO: 54. Las condiciones de reacción eran como las indicadas anteriormente. El producto de la PCR se procesó en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento de zcytor17 de aproximadamente 320 pb se aisló usando el kit de extracción en gel Qiaquick siguiendo las instrucciones del fabricante.

55 Cada uno de los fragmentos de PCR aislados descritos anteriormente se mezclaron a una proporción volumétrica de 1:1 y se usaron en una reacción PCR usando ZC6673 (SEQ ID NO: 58) y ZC29145 (SEQ ID NO: 61) para crear todo menos la parte 5' MPL de la quimera MPL-zcytor17. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 15 ciclos a 94 $^{\circ}$ C durante 1 min, 55 $^{\circ}$ C durante 1 min, 72 $^{\circ}$ C durante 2 min, seguido por 72 $^{\circ}$ C durante 7 min; después una inmersión a 4 $^{\circ}$ C. Todo el producto de la PCR se procesó en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento de la quimera MPL-zcytor17 de aproximadamente 700 pb se aisló usando el kit de extracción en gel de Qiaquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de la quimera MPL-zcytor17 se sometió a digestión BamHI (BRL) y XbaI (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante. Toda la digestión se procesó en un gel de agarosa al 1 % y la quimera MPL-zcytor17 escindida se aisló usando el kit de extracción en gel Qiaquick™ (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La quimera MPL-zcytor17 escindida resultante más el fragmento 5' MPL EcoRI/BamHI descrito anteriormente se insertaron en un vector de expresión para generar el receptor

químico MPL-zcytor17 completo como se describe más adelante.

El vector de expresión receptor pZP-7 se sometió a digestión con EcoRI (BRL) y Xba1 (BRL) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se purificó en gel como se ha descrito anteriormente. Este fragmento de vector se combinó con la quimera de PCR MPL-zcytor17 escindida con EcoRI y Xba1 aislada anteriormente y el fragmento de 5' MPL EcoRI y BamHI aislado anteriormente en una reacción de ligamiento. El ligamiento se realizó usando Ligasa T4 (Epicentre Technologies), a temperatura ambiente durante 1 hora siguiendo las instrucciones del fabricante. Una muestra del ligamiento se sometió a electroforesis en células de *E. coli* electrocompetentes DH10B ElectroMAX™ (25 µF, 200 ohms, 1,8 V). Los transformantes se sembraron en placas de LB + ampicilina y se exploraron colonias sencillas mediante miniprep (Qiagen) y digestión con EcoRI para verificar la quimera MPL-zcytor17. La digestión con EcoRI de los clones correctos produjo un fragmento de aproximadamente 2 kb. La confirmación de la secuencia de la quimera MPL-zcytor17 se realizó mediante análisis de secuencias. El inserto era de aproximadamente 3,1 kb, y tenía longitud completa.

Ejemplo 6

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

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

BaF3, una línea celular prelinfoide dependiente de interleucina-3 (IL-3) derivada de médula ósea murina (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al*, Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), se mantuvo en medio completa (medio RPMI (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) complementado con suero de ternero fetal termoinactivado al 10 %, 1 ng/ml de IL-3 murina (MIL-3) (I + D, Minneapolis, MN), L-Glutamax-1™ 2 mM (Gibco BRL), piruvato sódico 1 mM (Gibco BRL) y antibióticos PSN (GIBCO BRL). Antes de la electroporación, el ADN plasmídico pZP-7/MPL-zcytor17 (Ejemplo 5) se preparó y purificó usando un kit de Qiagen Maxi Prep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la electroporación, las células BaF3 se lavaron dos veces en medio RPMI y se resuspendieron después en medio RPMI a una densidad celular de 10⁷ células/ml. Un ml de células BaF3 resuspendidas se mezcló con 30 µg del ADN plasmídico pZP-7/MPL-zcytor17 y se transfirió a cámaras de electroporación desechables individuales (Gibco BRL). A temperatura ambiente las células recibieron choques de 5x1ms a 800 voltios, seguido de choques de 5x2ms a 600 voltios suministrado por un aparato de electroporación (Cyto-Pulse). Las células electroporadas se transfirieron a 50 ml de medio completo y se colocaron en una incubadora durante 15-24 horas (37 °C, 5 % CO₂). Después, a las células se añadió antibiótico de selección Geneticin™ (Gibco) (G418 1 mg/ml) en un matraz T-162 para aislar el conjunto resistente a G418. Los conjuntos de las células BaF3 transfectadas, en lo sucesivo en el presente documento denominadas células BaF3/MPL-zcytor17, se ensayaron con respecto a la capacidad de señalización como se describe más adelante.

B. Ensayo de la capacidad de señalización de las células BaF3/MPL-zcytor17 usando un ensayo de proliferación con Alamar Blue

Las células BaF3/MPL-zcytor17 se centrifugaron y se lavaron en medio completo, descrito anteriormente, pero sin mL-3 (en lo sucesivo en el presente denominado "medio sin mL-3"). Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para garantizar la retirada de mL-3. Después, las células se contaron en un hematocitómetro. Las células se sembraron en placas en un formato de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando el medio sin mL-3.

La proliferación de las células BaF3/MPL-zcytor17 se evaluó usando trombopoyetina murina (mTPO) diluida con medio sin mL-3 a concentraciones de 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,1 ng/ml, 1,5 ng/ml. A las células BaF3/MPL-zcytor17 se añadieron 100 µl de mTPO diluida. El volumen de ensayo total es de 200 µl. Los controles negativos se procesaron en paralelo usando solo medio sin mL-3, sin la adición de mTPO. Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C, con CO₂ al 5 % durante 3 días, momento en el cual se añadió Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) a 20 µl/pocillo. El Alamar Blue proporciona una lectura fluorométrica basándose en la actividad metabólica de las células y es por tanto una medición directa de la proliferación celular en comparación con un control negativo. Las placas se volvieron a incubar a 37 °C, con CO₂ al 5 % durante 24 horas. Las placas se leyeron en el lector de placa Fmax™ (Molecular Devices Sunnyvale, CA) usando el programa SoftMax™ Pro, a longitudes de onda de 544 (Excitación) y 590 (Emisión).

Los resultados confirmaron la capacidad de señalización de la parte intracelular del receptor zcytor17, dado que la trombopoyetina indujo la proliferación aproximadamente de 9 a 13 veces sobre el fondo a concentraciones de 50 ng/ml y más altas de mTPO.

Ejemplo 7

Construcción de la quimera Zcytor17-polipéptido mpl: dominio extracelular de Zcytor17 fusionado con el dominio de señalización intracelular y dominio TM de Mpl

Los dominios extracelulares del receptor zcytor17 se aislaron de un plásmido que contenía el receptor zcytor17 usando PCR con cebadores diseñados para amplificar el dominio extracelular o parte del mismo de zcytor17

mostrado en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 21 o región correspondiente de SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 56. Las condiciones de reacción preferidas fueron las siguientes: 95 °C durante 1 min; 35 ciclos a 95 °C durante 1 min, 45 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min; seguido de 72 °C a 10 min; después una inmersión a 10 °C. El producto PCR se procesó en una agarosa de punto de fusión bajo al 1 % (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) y el fragmento del receptor zcytor17 se aisló usando el kit de extracción en gel Qiaquick™ (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los dominios intracelular y transmembrana de MPL se aislaron de un plásmido que contenía el ADNc del receptor de MPL (plásmido PHZ1/MPL) (Ejemplo 5) usando PCR con cebadores que abarcaban el extremo 3' del dominio extracelular de zcytor17 y el extremo 5' de los dominios intracelular y transmembrana de MPL y ZC17,206 (SEQ ID NO: 33). Las condiciones de reacción preferidas se realizaron como se ha indicado anteriormente. El producto PCR se procesó en una agarosa de punto de fusión bajo al 1 % (Boehringer Mannheim) y el fragmento MPL de aproximadamente 450 pb se aisló usando el kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cada uno de los fragmentos aislados descritos anteriormente se mezcló a una proporción volumétrica de 1:1 y se usó en una reacción PCR usando el cebador 5' usado para amplificar el dominio extracelular de zcytor17 y ZC17,206 (SEQ NO: 33) para crear una quimera Zcytor17-mpl. Las condiciones de reacción preferidas fueron las siguientes: 95 °C durante 1 min; 35 ciclos a 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min; seguido de 72 °C a 10 min; después una inmersión a 10 °C. El producto de PCR completo se procesó en una agarosa de punto de fusión bajo al 1 % (Boehringer Mannheim) y se aisló un fragmento de quimera Zcytor17-mpl de aproximadamente 1,2 kb usando el kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de quimera Zcytor17-mpl se sometió a digestión, (por ejemplo, con EcoRI (BRL) y XbaI (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante. La digestión completa se procesó en una agarosa de bajo punto de fusión al 1 % (Boehringer Mannheim) y la quimera Zcytor17-mpl escindida se aisló usando el kit de extracción en gel Qiaquick™ (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La quimera Zcytor17-mpl escindida resultante se insertó en un vector de expresión como se describe más adelante.

El vector de expresión receptor pZP-5Z se sometió a digestión con EcoRI (BRL) y HindIII (BRL) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se purificó en gel como se ha descrito anteriormente. Este fragmento de vector se combinó con la quimera Zcytor17-mpl escindida con EcoRI y XbaI aislada anterior y un fragmento enlazador XbaI/HindIII en una reacción de ligamiento. El ligamiento se ejecutó usando ligasa T4 (BRL), a 15 °C durante una noche. Una muestra del ligamiento se sometió a electroporación en células de *E. coli* electrocompetentes DH10B ElectroMAX™ (25uF, 200 Ω, 2,3 V). Los transformantes se sembraron en placas de LB + ampicilina y se exploraron colonias sencillas por PCR para verificar que la quimera Zcytor17-mpl usando un cebador de dominio extracelular de zcytor17 y ZC 17,206 (SEQ ID NO: 25) usando las condiciones PCR descritas anteriormente. La confirmación de la secuencia de la quimera Zcytor17-mpl se realizó mediante análisis de secuencia.

Ejemplo 8

Construcción del vector de expresión que expresa zcytor17 de longitud completa: pZp7pX/zcytor17 A. Clonación del ADNc de zcytor17 de longitud completa para la expresión:

Para obtener un ADNc de longitud completa, los productos PCR 5' y 3' se aislaron y unieron usando un sitio PstI interno. Los cebadores de la PCR se diseñaron usando la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 53 y para la clonación incluyen los sitios de restricción BamHI y XhoI.

Se generó un producto PCR 5' usando como molde una biblioteca de ADNc WI-38 y los oligonucleótidos ZC 29,359 (SEQ ID NO: 62) y ZC 27,899 (SEQ ID NO: 63) como cebadores. WI-38 es una biblioteca de ADNc de uso interno generada a partir de una línea celular de pulmón embrionario humano (ATCC CRL-2221). Esta reacción PCR 5' se ejecutó de la siguiente manera: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos, y después a 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 10 °C. La reacción PCR usó aproximadamente 3 µg de plásmido preparado a partir de la biblioteca de ADNc, 20 pmoles de cada oligonucleótido y cinco unidades de ADN polimerasa PWO (Roche). Aproximadamente el 90 % del producto PCR 5' se precipitó en etanol, se sometió a digestión con BamHI y PstI y se purificó en gel sobre gel de agarosa al 1,0 %. La banda de aproximadamente 600 pb se escindió y se usó para el ligamiento con el vector de clonación pUC18 que se sometió a digestión con BamHI y PstI. Los transformantes resultantes se secuenciaron para confirmar la secuencia de ADNc de zcytor17. Para uno de estos transformantes, el ADN plasmídico se preparó y se sometió a digestión con BamHI y PstI. La banda resultante de aproximadamente 600 pb se purificó en gel y se usó para un ligamiento a continuación para formar un ADNc de longitud completa.

Se generó un producto PCR 3' usando como molde una biblioteca de ADNc de uso interno de testículo humano y los oligonucleótidos ZC 27,895 (SEC ID NO: 64) y ZC 29,122 (SEC ID N°: 65) como cebadores. Esta reacción PCR 3' se ejecutó de la siguiente manera: 30 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 65 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 2 minutos, después 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 10 °C. Toda la reacción PCR 3' se purificó en gel sobre un gel de agarosa al 1,0 % y la banda principal de 1500 pb se escindió. Esta banda se clonó en el vector PCR Blunt II

TOPO usando el kit Zeroblunt TOPO (Invitrogen). Los transformantes resultantes se secuenciaron para confirmar la secuencia de ADNc de zcytor17. Para uno de estos transformantes, se preparó ADN plasmídico y se sometió a digestión con PstI y XhoI. La banda resultante de aproximadamente 1500 pb se purificó en gel. Se realizó un ligamiento en tres partes con el fragmento BamHI a PstI 5' anterior, el fragmento PstI a XhoI 3' y el vector de expresión pZp7pX digerido con BamHI y XhoI. Esto generó un plásmido pZp7pX que contenía un ADNc de longitud completa para zcytor17 (SEQ ID NO: 53), denominado pZp7p/zcytor17. El ADNc de zcytor17 de longitud completa en pZp7p/zcytor17 tiene una mutación silenciosa que cambia la T por G en la posición 1888 de SEQ ID NO: 53 (que codifica un resto de glicina en el resto 464 de SEQ ID NO: 54). Como esta mutación es silenciosa, el ADNc de zcytor17 en pZp7p/zcytor17 codifica el polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 54. El plásmido pZp7pX es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de CMV, el intrón A, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes y un terminador de la hormona de crecimiento humano. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión del marcador de selección de mamífero que tiene un promotor SV40, un potenciador y un origen de replicación, un gen de resistencia a puomicina y el terminador de SV40.

Ejemplo 9

Construcción de células para evaluar la proliferación basada en zcytor17 en un ensayo BAF3 usando Alamar Blue A. Construcción de células BaF3 que expresan el receptor Zcytor17-MPL

Se construyeron células BaF3 que expresaban el receptor Zcytor17-MPL, según el Ejemplo 6A, usando 30 µg del vector de expresión zcytor17, descrito en el Ejemplo 7. Las células BaF3 que expresan el plásmido del receptor pZP-5Z/zcytor17 se denominaron BaF3/Zcytor17-MPL. Estas células se usaron para explorar una actividad de zcytor17, como se describe más adelante en los Ejemplos 10 y 18.

B. Construcción de células BaF3 que expresan el receptor zcytor17

Se construyeron células BaF3 que expresaban el receptor zcytor17 de longitud completa, según el ejemplo 6A, usando 30 µg del vector de expresión de zcytor17, descrito en el Ejemplo 8. Las células BaF3 que expresan el plásmido receptor pZp7p/zcytor17 se denominaron BaF3/zcytor17. Estas células se usaron para explorar una actividad de zcytor17 como se describe más adelante en los Ejemplos 10 y 18.

Ejemplo 10

Exploración de la actividad de zcytor17 usando células BaF3/zcytor17-MPL y células Baf3/zcytor17 usando un ensayo de proliferación con Alamar Blue

Células de quimera Baf3/zcytor17-MPL y células Baf3/zcytor17 (Ejemplo 9) se centrifugaron y se lavaron independientemente en medio sin mL-3 (Ejemplo 6). Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces para garantizar la eliminación de mL-3. Después, las células se contaron en un hematocitómetro. Las células se sembraron en placas en un formato de 96 pocillos a 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl por pocillo usando el medio sin mL-3.

Para examinar e identificar una fuente para el ligando de zcytor17, se exploraron aproximadamente 124 medios acondicionados y muestras de una variedad de líneas celulares y tejidos. Se añadieron 100 µl de cada una de las muestras de los medios acondicionados a las células de quimera BaF3/MPL-zcytor17 así como a las células Baf3/zcytor17. El volumen de ensayo total era de 200 µl. Todas las citocinas conocidas también se exploraron a una concentración de aproximadamente 100 pg/ml - 250 ng/ml en ambas líneas celulares. Los controles negativos se procesaron en paralelo usando solo medio sin mL-3. Como control positivo se usó IL-3 de ratón a una concentración de 250 pg/ml. Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C, con CO₂ al 5 % durante 3 días, tiempo en el cual se añadió Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) a 20 µl/pocillo. El Alamar Blue proporciona una lectura fluorométrica basándose en el número de células vivas, y es por tanto una medición directa de proliferación celular en comparación con un control negativo. Las placas se incubaron de nuevo a 37 °C, con CO₂ al 5 % durante 24 horas. Las placas se leyeron en el lector de placa Fmax™ (Molecular Devices Sunnyvale, CA) usando el programa SoftMax™ Pro, a longitudes de onda de 544 (Excitación) y 590 (Emisión).

Los resultados que muestran proliferación de cualquiera de la línea celular de quimera Baf3/zcytor17-mpl o de la línea celular Baf3/zcytor17 en respuesta a las muestras de medios acondicionados o a los ligandos conocidos identifican una fuente para el ligando y sugieren que el receptor de zcytor17 puede señalizarse como un homodímero, o heterodimerizar o multimerizar con un receptor presente en las células BaF3. Si no hay señal, el complejo de señalización-receptor real puede heterodimerizar o multimerizar con otra subunidad receptora no presente en células BaF3. Véase el ejemplo 18 y el Ejemplo 19 más adelante.

Ejemplo 11

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

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

10 Se preparó un vector de expresión para la expresión del dominio extracelular, soluble del polipéptido de zcytor17, pZp9zcytor17CEE, en el que la construcción se diseñó para expresar un polipéptido de zcytor17 que comprendía la metionina iniciadora predicha y truncada adyacente al dominio transmembrana predicho, y con una etiqueta GLU-GLU C terminal (SEQ ID NO: 34).

15 Se generó un producto de PCR de aproximadamente 1500 pb usando, como cebadores de PCR, ZC29,451 (SEQ ID NO: 66) y ZC29,124 (SEQ ID NO: 67) para añadir sitios de restricción EcoRI y BamHI. Como molde, se usó una biblioteca de ADNc de uso interno HPVS humana y la amplificación por PCR se realizó de la siguiente manera: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1,5 minutos, y después 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 10 °C. La reacción PCR se precipitó en etanol y se sometió a digestión con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. El producto de la PCR digerido se purificó en gel, en un gel de agarosa al 1,0 % y la banda de aproximadamente 1500 pb se escindió. Después, esta banda se reamplificó usando cebadores idénticos con el siguiente ciclo: 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 3 minutos, y después a 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 10 °C. La reacción PCR se precipitó con etanol y se sometió a digestión con enzimas de restricción EcoRI y BamHI. El producto de la PCR digerido se purificó en gel, en un gel de agarosa al 1,0 % y la banda de aproximadamente 1500 pb se escindió. El ADN escindido se subclonó en el plásmido CEEpZp9 que se había sido cortado con EcoRI y BamHI, para generar el plásmido con un receptor soluble etiquetado con GLU-GLU en el extremo C para zcytor17, zcytor17CEEpZp9. El dominio extracelular en el ADNc de zcytor17CEE en zcytor17CEEpZp9 tiene una mutación silenciosa que cambia la T a la C en la posición 1705 de SEQ ID NO: 53 (que codifica un resto de Pro en el resto 403 de SEQ ID NO: 54). Como esta mutación es silenciosa, el ADNc de zcytor17 en zcytor17CEEpZp9 codifica el polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 54.

20 Adicionalmente, debido a la construcción usada, se insertó un par de restos Gly-Ser en el extremo C terminal del dominio extracelular soluble de zcytor17 y antes de la etiqueta Glu-Glu C terminal (SEQ ID NO: 34). Como tal, la etiqueta en el extremo C del dominio extracelular de zcytor17, era una etiqueta Glu-Glu modificada, como se muestra en (SEQ ID NO: 91). El plásmido CEEpZp9 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de metalotioneína-1 de ratón, sitios de restricción múltiples para la inserción de secuencias codificantes, y un terminador de la hormona de crecimiento humano. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión del marcador de selección de mamífero que tiene un promotor de SV40, un potenciador y un origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador SV40. Usando técnicas de biología molecular convencionales, zcytor17CEEpZp9 se sometió a electroporación en células competentes DH10B (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se sembraron en placas LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante una noche. Las colonias se exploraron por análisis de restricción, o PCR de ADN preparado a partir de colonias individuales. La secuencia inserto de clones positivos se verificó mediante análisis de secuencia. Se realizó una preparación de plásmido a gran escala usando un kit QIAGEN® Maxi prep (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 Para preparar los receptores solubles de zcytor17 se usó el mismo proceso con una etiqueta de his en el C terminal compuesta de 6 restos de His en una fila; y una etiqueta FLAG® en C terminal (SEQ ID NO: 35), zcytor17CFLAG. Para construir estas construcciones, el vector anteriormente mencionado tenía bien la etiqueta HIS o la etiqueta FLAG® en lugar de la etiqueta glu-glu (SEQ ID NO: 34).

50 B. Construcción de un vector de expresión del receptor zcytor17 humano soluble de mamífero: zcytor17-Fc4

Se preparó un vector de expresión, pEZE-2 hzcytor17/Fc4, para expresar una versión soluble etiquetada con Fc4 en el extremo C de hzcytor17 (zcytor17-Fc4 humano) en células CHO PF. Las células CHO PF son una línea celular CHO interna adaptada para el crecimiento en medio sin proteínas (medio PF 325 ExCell; JRH Biosciences). La línea celular CHO interna procedía originalmente de células DG44 CHO (G. Urlaub, J. Mitchell, E. Kas, L. A. Chasin, V. L. Funanage, T. T. Myoda y J. L. Hamlin, "The Effect Of Gamma Rays at the Dihydrofolate Reductase Locus: Deletions and Inversions", Somatic Cell and Molec. Genet., 12: 555-566 (1986)). Un fragmento de ADNc de zcytor17 que incluía la secuencia de polinucleótidos del dominio extracelular del receptor zcytor17 se fusionó en fase con la secuencia de polinucleótidos de Fc4 (SEQ NO ID: 36) para generar una fusión zcytor17-Fc4 (SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69). El vector pEZE-2 es un vector de expresión de mamífero que contiene la secuencia de polinucleótidos Fc4 y un sitio de clonación que permite la construcción rápida de fusiones Fc4 en C terminal usando técnicas de biología molecular convencionales.

65 Se generó un fragmento de 1566 pares de bases por PCR, que contenía el dominio extracelular de zcytor17 humano y los dos primeros aminoácidos de Fc4 (Glu y Pro) con sitios FseI y BglII codificados en los extremos 5' y 3', respectivamente. Este fragmento de PCR se generó usando los cebadores ZC29,157 (SEQ ID NO: 70) y ZC29,150

(SEQ ID NO: 71) por amplificación a partir de un plásmido que contenía el dominio extracelular de zcytor17 humano (pZp9zcytor17CEE) (Ejemplo 11A). Las condiciones de reacción de la PCR eran las siguientes: 25 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 1 minuto, y 72 °C durante 2 minutos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos; seguido de una inmersión a 4 °C. El fragmento se sometió a digestión con las endonucleasas de restricción FseI y BglII y posteriormente se purificó mediante electroforesis en gel al 1 % y la purificación de bandas se realizó usando el kit de extracción en gel QiaQuick (Qiagen). El ADN purificado resultante se ligó durante 5 horas a temperatura ambiente en un vector pEZE-2 previamente digerido con FseI y BglII que contenía Fc4 en posición 3' de los sitios FseI y BglII.

Dos µl de la mezcla de ligamiento se sometieron a electroporación en 37 µl de células de *E. coli* electrocompetentes DH10B (Gibco) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se diluyeron 400 µl de medio LB y se sembraron en placas con LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina. Los clones se analizaron mediante digestión con enzimas de restricción y los clones positivos se enviaron para secuenciación de ADN para confirmar la secuencia de la construcción de fusión. 1 µl de un clon positivo se transformó en 37 µl de células *E. coli* electrocompetentes DH10B y se sembraron en estrias en una placa con LB/amp. Se escogió una sola colonia de esta placa sembrada en estrias para iniciar un cultivo a 250 ml de LB/amp que después se cultivó durante una noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. Este cultivo se usó para generar 750 µg de ADN purificado usando un kit Maxi plasmid de Qiagen (Qiagen).

Ejemplo 12

Transfección y expresión de polipéptidos del receptor soluble Zcytor17

Células BHK 570 (ATCC n.º CRL-10314), DG-44 CHO, u otras células de mamífero, se sembraron en placas a aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células/pocillo (placas de 6 pocillos) en 800 µl de medio asérico (SF, *serum free*) apropiado (por ejemplo, DMEM, Gibco/BRL Alta Glucosa) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Las células se transfectaron con plásmidos de expresión que contenían zcytor17CEE, zcytor17CFLG, zcytor17CHIS o zcytor17-Fc4 (Ejemplo 11), usando Lipofectin™ (Gibco BRL), en medio asérico (SF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Clones sencillos que expresaban los receptores solubles se aislaron, se exploraron y crecieron en medios de cultivo celular y se purificaron usando técnicas convencionales.

A. Expresión del receptor zcytor17CEE humano soluble en mamíferos

Células BHK 570 (ATCC n.º: CRL-10314) se sembraron en matraces de cultivo tisular T-75 y se dejaron crecer a aproximadamente una confluencia de 50 a 70 % a 37 °C, con CO₂ al 5 % en medio DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL Alta Glucosa, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), suero bovino fetal al 5 %, L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenea, KS), piruvato sódico 1 mM (Gibco BRL)). Después, las células se transfectaron con el plásmido que contenía zcytor17CEE (Ejemplo 11A) usando Lipofectamine™ (Gibco BRL), en formulación de medio asérico (SF) (DMEM, 10 mg/ml de transferrina, 5 mg/ml de insulina, 2 mg/ml de fetuina, L-glutamina al 1 % y piruvato sódico al 1 %). Diez µg del ADN plasmídico pZp9zcytor17CEE (Ejemplo 11A) se diluyeron en un tubo de 15 ml hasta un volumen final total de 500 µl con medio SF. Se mezclaron 50 µl de Lipofectamine con 450 µl de medio SF. La mezcla de Lipofectamine se añadió a la mezcla de ADN y se dejó incubar durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Cuatro ml de medio SF se añadieron a la mezcla de ADN:Lipofectamine. Las células se aclararon una vez con 5 ml de medio SF, se aspiraron, y se añadió la mezcla de ADN:Lipofectamine. Las células se incubaron a 37 °C durante cinco horas y después se añadieron 5 ml de medio DMEM/FBS al 10 %. El matraz se incubó a 37 °C durante una noche y después las células se dividieron en los medios de selección (medios DMEM/FBS a partir de lo anterior con la adición de metotrexato 1 µM o Metotrexato 10 µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) en placas de 150 mm a 1:2., 1:10 y 1:50. Aproximadamente 10 días después de la transfección, una placa de 150 mm de colonias resistentes a metotrexato 1 µM se sometieron a digestión con tripsina, las células se agruparon, y una mitad de las células se volvieron a sembrar en placas en metotrexato 10 µM; para amplificar adicionalmente la expresión de la proteína zcytor17CEE. Una muestra de medio acondicionado de este grupo de células amplificadas se ensayó para los niveles de expresión usando análisis SDS-PAGE y análisis de Western.

B. Expresión del receptor zcytor17-Fc4 humano soluble en mamíferos

Veinte µg de ADN plasmídico pEZE-2hzcytor17Fc4 (Ejemplo 11B) se linealizaron mediante digestión con enzimas de restricción con FspI, una enzima de restricción que corta una vez dentro del vector pEZE-2 y no altera genes necesarios para la expresión. Se añadieron 200 µg de ADN de esperma de salmón cortado como ADN transportador y después el ADN se precipitó por la adición de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M, pH 5,2 y 2,2 volúmenes de etanol seguido de una incubación en hielo de 15 minutos y microcentrifugación a 4 °C. El sedimento de ADN resultante se lavó en etanol al 70 % y se secó al aire antes de resuspenderse en medio de crecimiento sin selección CHO PF 100 µl (21 g/l PF CHO Ex Cell 325/L-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco)/Complemento 1x HT (Gibco). Al ADN se añadieron cinco millones de células PF CHO de pase 43 en 600 µl de medio de crecimiento no selección PF CHO y después se sometieron a electroporación en un sistema de electroporación Gene Pulser II (BioRad) usando una capacitancia de 1070 µF y 380 voltios usando una cubeta de electroporación Gene Pulser (BioRad) de 0,4 cm de hueco. Las células electroporadas se dejaron recuperar durante 48 horas en medio de cultivo no selección antes de la selección en medio HT (21 g/l PF CHO Ex Cell 325/L-

glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco). Las células se seleccionaron durante 5 días en medio HT antes pasarse a 5×10^5 ml en selección MTX 50 nm. Las células seleccionadas a 50 nm MTX se sembraron a 6×10^5 ml en un matraz agitador para generar medio acondicionado. El medio acondicionado de 72 horas resultante se analizó mediante exploración con transferencias de Western con un anticuerpo generado contra la Ig humana.
5 Las células produjeron la proteína hzcytor17/Fc4 a aproximadamente 1 mg/l.

C. Expresión en mamíferos a gran escala del receptor zcytor17-Fc4 humano soluble

10 Doscientos µg de ADN plasmídico pEZE-2hzcytor17Fc4 (Ejemplo 11B) se linealizaron mediante digestión con enzimas de restricción con FspI, una enzima de restricción que corta una vez dentro del vector pEZE-2 y no altera genes necesarios para la expresión. Se añadieron 200 µg de ADN genómico CHO (preparado internamente) como ADN transportador y después el ADN se precipitó mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol seguido de microcentrifugación a temperatura ambiente. Se prepararon y transformaron cinco copias de sedimentos de ADN. El sedimento de ADN resultante se lavó en etanol al 70 % y se secó al aire antes de resuspenderse en medio de crecimiento no selección PF CHO 100 µl (21 g/l PF CHO Ex Cell
15 325/L-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco)/Complemento 1x HT (Gibco). Se añadieron diez millones de células CHO PF al ADN en 600 µl de medio de crecimiento no selección PF CHO y después se sometieron a electroporación en un sistema de Electroporación Gene Pulser II (BioRad) usando una capacitancia de 950 µF y 300 voltios usando una cubeta de electroporación Gene Pulser (BioRad) de 0,4 cm de hueco. Las células electroporadas se agruparon y se pusieron directamente en medio de selección HT (21 g/l PF CHO Ex Cell 325/L-glutamina 200 mM (Gibco)/piruvato sódico 100 mM (Gibco). Las células se seleccionaron durante 14 días en medio HT antes de pasarse a 4×10^5 /ml en selección MTX 50 nm. Las células se amplificaron a 200 nM MTX y después a 1 µM MTX. Los grupos de -HT, 50 nM y 1 µM se sembraron a 1×10^6 c/ml durante 48 horas, y los medios acondicionados resultantes se analizaron explorando transferencias de Western con un anticuerpo generado contra la Ig humana.
20
25

C. Expresión transitoria en mamíferos y purificación del receptor zcytor17-Fc4 humano soluble

30 El ADN plasmídico pEZE-2hzcytor17Fc4 (Ejemplo 11B) se introdujo un 40 placas maxi de células BHK usando Lipofectamine (Gibco BRL) como se describe en el presente documento y en las instrucciones del fabricante. Se dejó que las células se recuperasen durante una noche, y después se aclararon y se realimentaron con medio asérico (SL7V4, preparado internamente). Después de 72 horas, los medios se recogieron y se filtraron y las células se realimentaron con medio asérico. Después de 72 horas, los medios se recogieron de nuevo y se filtraron.
35 Los medios acondicionados aséricos (lotes de 2 x 1,5 l) de células BHK transfectadas de manera transitoria se bombearon sobre una columna de agarosa-proteína A de 1,5 ml en Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M. La columna se lavó bien con este tampón y después la proteína unida se eluyó con 1 ml de glicina 0,2 M, pH 2,5, NaCl 0,5 M. La proteína eluida se recogió en 0,1 ml de Tris 2 M, pH 8,5.
40 Se recogieron alícuotas para electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y el zcytor17-Fc en bruto se dializó durante una noche frente a PBS. El receptor soluble se filtró de manera estéril y se colocó en alícuotas a -80 °C.

Ejemplo 13

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

A. Construcción del vector de expresión pCZR225 que expresa el polipéptido de fusión huzcytor17/MBP-6H

A través de recombinación homóloga se construyó un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codificaba un receptor soluble zcytor17 fusionado en el extremo C con proteína de unión a maltosa (MBP, *maltose binding protein*). El polipéptido de fusión contenía una parte de la MBP de aproximadamente 388 aminoácidos en el extremo N, fusionada con cualquiera de los receptores solubles zcytor17 descritos en el presente documento. Un fragmento de ADNc de zcytor17 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 21) se aisló usando PCR como se describe en el presente documento. En la producción del fragmento zcytor17 se usaron dos cebadores en una reacción PCR convencional: (1) uno que contenía aproximadamente 40 pb de la secuencia flanqueante del vector y aproximadamente 25 pb correspondientes al extremo amino de zcytor17 y (2) otro que contenía aproximadamente 40 pb del extremo 3' correspondiente a la secuencia del vector flanqueante y aproximadamente 25 pb que correspondía al extremo carboxilo del zcytor17. Dos µl de la reacción PCR de 100 µl se procesaron en un gel de agarosa al 1,0 % con tampón 1 x TBE para análisis y se observó el fragmento aproximadamente esperado. La reacción PCR restante se combinó con el segundo tubo PCR y se precipitó con 400 µl de etanol absoluto. El ADN precipitado se usó para la recombinación en el vector receptor de corte SmaI pTAP170 para producir la construcción que codificaba la fusión MBP-zcytor17, como se describe más adelante.
50
55
60

El plásmido pTAP170 procedía de los plásmidos pRS316 y pMAL-c2. El plásmido pRS316 era un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae* (Hieter P. y Sikorski, R., Genetics 122: 19-27, 1989). pMAL-C2 (NEB) era un plásmido de expresión de *E. coli*. Este lleva el promotor tac que dirige *MalE* (gen que codifica la proteína de unión a maltosa, MBP) seguido por una etiqueta de Histidina, un sitio de escisión de trombina, un sitio de clonación y el terminador de
65

rmB. El vector pTAP98 se construyó usando recombinación homóloga en levadura. 100 ng del plásmido pMAL-c2 cortado con EcoR1 se recombinaron con 1 µg de pRS316 cortado con Pvu1, enlazador 1 µg y 1 µg de pRS316 cortado con Sca1/EcoR1 se combinaron en una reacción de PCR. Los productos PCR se concentraron mediante precipitación con etanol al 100 %.

Células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) se combinaron con aproximadamente 10 µl de una mezcla que contenía aproximadamente 1 µg del producto PCR del receptor *zcytor17* anterior, y 100 ng del vector pTAP98 digerido con SmaI y se sometió a electroporación usando métodos convencionales y se sembraron en placas URA-D y se incubaron a 30 °C.

Después de aproximadamente 48 horas, se escogieron transformantes Ura + de levadura de una sola placa, se aisló el ADN y se transformaron células de *E. coli* electrocompetentes (por ejemplo, MC1061, Casadaban *et al.* J. Mol. Biol. 138, 179-207) y se sembraron en placas MM/CA+AMP 100 mg/l (Pryor y Leiting, Protein Expression and Purification 10: 309-319, 1997) usando procedimientos convencionales. Las células se cultivaron en MM/CA con ampicilina 100 µg/ml durante dos horas, agitando a 37 °C. 1 ml del cultivo se indujo con IPTG 1 mM. 2-4 horas después los 250 µl de cada cultivo se mezclaron con perlas de vidrio lavadas con ácido 250 µl y tampón Thorner 250 µl con βME al 5 % y colorante (urea 8 M, Tris 100 mM pH 7,0, glicerol al 10 %, EDTA 2 mM, SDS al 5 %). Las muestras se agitaron vorticialmente durante un minuto y se calentaron a 65 °C durante 10 minutos. Se cargaron 20 µl por carril en un gel PAGE del 4 % al 12 % (Novex). Los geles se procesaron en tampón 1XMES. Los clones positivos se denominaron pCZR225 y se sometieron posteriormente a análisis de secuencia.

Un microlitro de ADN de secuenciación se usó para transformar la cepa BL21. Las células se electroimpulsaron a 2,0 kV, 25 µF y 400 ohms. Después de la electroporación, 0,6 ml de MM/CA con ampicilina 100 mg/l. Las células se cultivaron en MM/CA y se indujeron con IPTG como se ha descrito anteriormente. Los clones positivos se usaron hasta crecer para la purificación de la proteína de fusión *huzcytor17/MBP-6H* usando técnicas convencionales.

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

A menos que se indique lo contrario, todas las operaciones se realizaron a 4 °C. El siguiente procedimiento se usó para purificar el polipéptido receptor soluble *huzcytor17/MBP-6H*. Células de *E. coli* que contenían la construcción pCZR225 y que expresaban el receptor soluble *huzcytor17/MBP-6H* (Ejemplo 13A) se cultivaron en SuperBroth II (Caseína 12 g/l, extracto de levadura 24 g/l, difosfato potásico 11,4 g/l, fosfato monopotásico 1,7 g/l; Becton Dickenson, Cockeysville, MD), y se congelaron en glicerol al 0,5 %. Se usaron veinte gramos de las células congeladas en SuperBroth II + glicerol para purificar la proteína. Las células congeladas se descongelaron y diluyeron a 1:10 en una solución con inhibidor de proteasa (tampón de extracción) antes de realizar la lisis de las células y liberar la proteína del receptor soluble *huzcytor17/MBP-6H*. Las células diluidas contenían concentraciones finales de Tris 20 mM (JT Baker, Philipsburg, NJ) cloruro de sodio 100 mM (NaCl, Mallinkrodt, Paris, KY), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,5 mM (PMSF, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Leupeptina 2 µg/ml (Fluka, Suiza) y Aprotinina 2 µg/ml (Sigma). Se usó un sistema de fraccionamiento de células con una Prensa Francesa (Constant Systems Ltd., Warwick, Reino Unido) con una temperatura de -7 a -10 °C y 30 K PSI (*Pounds-per-square-inch*) para realizar la lisis de las células. El fraccionamiento de las células diluidas se verificó con lecturas A_{600} antes y después de aplicar la prensa francesa. Las células lisadas se centrifugaron a 18.000 G durante 45 minutos para retirar los desechos celulares fraccionados, y el sobrenadante se usó para purificar la proteína.

Una columna de 25 ml de resina Amylose (New England Biolabs, Beverly, MA) (preparada como se describe más adelante) se vertió en una columna de vidrio de 2,5 cm D x 10 cm A de Bio-Rad. La columna se llenó y se equilibró por gravedad con 10 volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrio Amylose (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0). El sobrenadante se cargó en lotes en la resina Amylose y se mecío durante una noche. La resina se vertió de nuevo en la columna y se lavó con 10 VC de tampón de equilibrio Amylose por gravedad. La columna se lavó para 10 VC con tampón de equilibrio Amylose, después se eluyó con ~ 2 VC de tampón de equilibrio Amylose + maltosa 10 mM por gravedad (Fluka Biochemical, Suiza) por gravedad. Se recogieron fracciones de 5 ml durante toda la cromatografía y la absorbancia se leyó a 280 y 320 nM. La columna de Amylose se regeneró con 1 VC de H₂O destilada, 5 VC de SDS al 0,1 % (p/v) (Sigma), 5 VC de H₂O destilada y después 5 VC de tampón de equilibrio Amylose.

Las fracciones de interés se agruparon y se dializaron en un Slide-A-Lyzer (Pierce) con 4 x 4 l PBS pH 7,4 (Sigma) para retirar los contaminantes de bajo peso molecular, intercambiar el tampón y desalinizar. Después de los cambios de PBS, el material recogido representó el polipéptido *huzcytor17/MBP-6H* purificado. El polipéptido *huzcytor17/MBP-6H* purificado se analizó mediante tinción de Coomassie SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western con el anticuerpo anti conejo conjugado con HRP (Rockland, Gilbertsville, PA). La concentración del polipéptido *huzcytor17/MBP-6H* fue de 1,92 mg/ml determinada por análisis BCA.

El polipéptido *huzcytor17/MBP-6H* purificado se preparó para la inyección en conejos y se envió al R & R Research and Development (Stanwood, WA) para la producción de anticuerpos. Los conejos se inyectaron para producir suero anti anti-*huzcytor17/MBP-6H* (Ejemplo 15, más adelante).

Ejemplo 14Anticuerpos policlonales del receptor soluble zcytor17

5 Se prepararon anticuerpos policlonales inmunizando 2 conejos blancos de Nueva Zelanda hembra con el polipéptido huzcytor17/MBP-6H purificado (Ejemplo 13). Cada uno de los conejos recibió una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 200 µg de proteína purificada en adyuvante completo de Freund (Pierce, Rockford, IL) seguida de inyecciones IP de refuerzo de 100 µg de proteína purificada en Adyuvante Incompleto de Freund cada tres semanas. De siete a diez días después de la administración de la tercera inyección de refuerzo, se extrajo la sangre de los animales y se recogió el suero. Después los conejos recibieron un refuerzo y cada tres semanas se extraía su sangre.

15 Los anticuerpos policlonales específicos de zcytor17 se purificaron por afinidad del suero de conejo usando una columna de proteína CNBr-SEPHAROSE 4B (Farmacia LKB) que se preparó usando aproximadamente 10 mg del polipéptido huzcytor17/MBP-6H purificado por gramo de CNBr-SEPHAROSE, seguido de diálisis 20X en PBS durante una noche. Los anticuerpos específicos de zcytor17 se caracterizaron mediante una comprobación del título por ELISA usando 1 µg/ml del antígeno de proteína apropiado como una diana de anticuerpo. El límite de detección más bajo (LLD, *lower limited of detection*) de los anticuerpos de conejo contra zcytor17, purificados por afinidad, se determinó usando métodos convencionales.

Ejemplo 15Anticuerpos monoclonales del receptor zcytor17

25 Se prepararon anticuerpos monoclonales del receptor soluble zcytor17 inmunizando ratones BalbC hembra con las proteínas zcytor17 solubles purificadas recombinantes descritas en el presente documento. Cada uno de los ratones recibió una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 20 µg de proteína purificada en Adyuvante Completo de Freund (Pierce, Rockford, IL) seguida de inyecciones IP de refuerzo cada dos semanas de proteína purificada 10 µg en Adyuvante Incompleto de Freund. De siete a diez días después de la administración de la tercera inyección de refuerzo, se extrajo sangre de los animales, se recogió el suero, y se evaluó el título de los anticuerpos.

30 Se recogieron los esplenocitos de los ratones que mostraron un título elevado y se fusionaron con células de mieloma SP2/0 murino usando PEG 1500 (Boehringer Mannheim, UK) usando una proporción de fusión 4:1 de esplenocitos con respecto a células de mieloma (Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Press). Después de 10 días de crecimiento post-fusión, los hibridomas productores de anticuerpos específicos se identificaron por ELISA usando la proteína del receptor soluble zcytor17 recombinante purificada (Ejemplo 6C) como una diana de anticuerpo y mediante FACS usando células Baf3 que expresaban la secuencia de zcytor17 (Ejemplo 8) como una diana de anticuerpo. Los hibridomas resultantes positivos por ambos métodos se clonaron tres veces mediante dilución limitante.

Ejemplo 16Evaluación de la heterodimerización del receptor zcytor17 usando el ensayo ORIGEN

45 El receptor zcytor17 soluble zcytor17CFLAG (Ejemplo 11), o gp130 (Hibi, M. *et al.*, Cell 63: 1149-1157, 1990) se marcó con biotina por reacción con un exceso molar de cinco veces de sulfo-NHS-LC- biotina (Pierce, Inc., Rockford, IL) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El receptor zcytor17 soluble y otra subunidad receptora soluble, por ejemplo, gp130, LIF, IL-12, WSX-1, IL-7Rα (RIL-7Rα) o receptor γ de IL-2 (RIL-2Rγ) (R & D Systems, Minneapolis, MN) soluble o el receptor zalfa11 soluble (IL-21R; del mismo solicitante que la solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 09/404.641) se marcaron con un exceso molar de cinco veces de Ru-BPY-NHS (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las formas marcadas con biotina y con Ru BPY-NHS del receptor zcytor17 soluble pueden denominarse respectivamente receptor Bio-zcytor17 y Ru-zcytor17; las formas marcadas con biotina y con Ru-BPY-NHS de la otra subunidad del receptor soluble pueden denominarse de manera similar. Los ensayos pueden realizarse usando medios acondicionados de células que expresan un ligando que se une a receptores heterodiméricos de zcytor17, o usando ligandos purificados. Los ligandos purificados son aquellos que pueden unirse a receptores de citocina heterodiméricos de clase 1 tales como, gp130, LIF, IL-12, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, zalfa11 (IL-21) (Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 09/522.217, del mismo propietario), TSLP (Levine, SD *et al.*, citado anteriormente; Isaksen, DE *et al.*, citado anteriormente; Ray, RJ *et al.*, citado anteriormente; Friend, SL *et al.*, citado anteriormente).

60 Para la caracterización de la unión del receptor inicial se ensayó un panel de citocinas o medio acondicionado para determinar si podía mediar la homodimerización del receptor zcytor17 y si podía mediar la heterodimerización del receptor zcytor17 con las subunidades receptoras solubles descritas anteriormente. Para hacer esto, 50 µl de medio acondicionado o TBS-B que contenía citocina purificada, se combinaron con 50 µl de TBS-B (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, BSA 1 mg/ml, pH 7,2) que contenía, por ejemplo, 400 ng/ml del receptor Ru-zcytor17 y Bio-zcytor17, o 400 ng/ml de receptor Ru-zcytor17 y, por ejemplo, Bio-gp130, o 400 ng/ml, por ejemplo, de Ru-IL2Rγ y Bio-zcytor17. Después de la incubación durante una hora a temperatura ambiente, se añadieron 30 µg de estreptavidina cubiertos

con perlas magnéticas de 2,8 mm (Dynal, Inc., Oslo, Noruega) y la reacción se incubó una hora más a temperatura ambiente. Después se añadió tampón de ensayo ORIGEN 200 µl (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) y se midió el grado de asociación del receptor usando un analizador M8 ORIGEN (Igen, Inc.).

5 Ejemplo 17

Construcción para generar un heterodímero del receptor zcytor17

Se construyó un vector que expresaba un heterodímero de zcytor17 humano secretado. En esta construcción, el dominio de unión a citocina extracelular de zcytor17 se fusionó con la cadena pesada de IgG gamma 1 (IgGγ1) (SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38), mientras que la parte extracelular de la subunidad receptora de citocina heteromérica (por ejemplo, un componente del receptor de gp130, LIF, IL-12, WSX-1 IL-2 (IL-2Rα, IL-2Rβ, IL-2Rγ), un componente del receptor de la familia de receptores de IL-4/IL-13 (IL-4Rα, IL-13Rα, IL-13Rα'), subunidades receptoras de interleucina (por ejemplo, IL-15Rα, IL-7Rα, IL-9Rα); o receptor zalfa11 (IL-21R)) se fusionaron con una cadena ligera kappa humana (cadena ligera κ humana) (SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40).

A. Construcción de vectores de fusión de cadena ligera κ humana e IgG gamma 1

La cadena pesada de IgGγ1 (SEQ ID NO: 37) se clonó en el vector de expresión de mamífero Zem229R (depósito ATCC n.º 69447) de tal manera que cualquier dominio extracelular del receptor de citocina deseado que tenga un sitio 5' EcoRI y 3' NheI pueda clonarse dando como resultado una fusión IgGγ1 C terminal-dominio extracelular N terminal. El fragmento IgGγ1 usado en esta construcción se realizó usando PCR para aislar la secuencia de IgGγ1 de una biblioteca de ADNc de Hígado Fetal humano de Clontech como molde. Los productos de la PCR se purificaron usando métodos descritos en el presente documento y se sometieron a digestión con MluI y EcoRI (Boehringer-Mannheim), precipitado en etanol y ligado con oligos ZC11,440 (SEQ ID NO: 41) y ZC11,441 (SEQ ID NO: 42), que comprende un enlazador MluI/EcoRI, en Zem229R previamente digerido con EcoRI usando técnicas de biología molecular convencionales desveladas en el presente documento.

La cadena ligera κ humana (SEQ ID NO: 39) se clonó en el vector de expresión de mamífero Zem228R (depósito ATCC n.º 69446) de tal manera que cualquier dominio extracelular del receptor de citocina deseado que tenga un sitio EcoRI 5' y un sitio KpnI 3' pueda clonarse dando como resultado una fusión de cadena ligera κ humana C terminal-dominio extracelular de citocina N terminal. Como un sitio KpnI se localiza dentro de la secuencia de la cadena ligera κ humana (escindida por la enzima KpnI después del nucleótido 62 en la SEQ ID NO: 39), se diseñó un cebador especial para clonar el extremo 3' del dominio extracelular deseado de un receptor de citocina en este sitio KpnI: el cebador se diseñó de tal manera que el producto PCR resultante contuviese el dominio extracelular del receptor de citocina deseado con un segmento de la cadena ligera κ humana hasta el sitio KpnI (SEQ ID NO: 39). Este cebador comprende preferentemente una parte de al menos 10 nucleótidos en el extremo 3' del dominio extracelular del receptor de citocina deseado fusionada en fase en 5' a la SEQ ID NO: 39. El fragmento de cadena ligera κ humana usado en esta construcción se realizó usando PCR para aislar la secuencia de la cadena ligera κ humana de la misma biblioteca de ADNc de Hígado Fetal humano de Clontech usada anteriormente. Los productos de la PCR se purificaron usando métodos descritos en el presente documento y se sometieron a digestión con MluI y EcoRI (Boehringer-Mannheim), se precipitaron con etanol y se ligaron con el enlazador MluI/EcoRI descrito anteriormente, en el vector Zem228R previamente digerido con EcoRI usando técnicas de biología molecular convencionales desveladas en el presente documento.

B. Inserción del receptor zcytor17 o dominios extracelulares de la subunidad heterodimérica en construcciones de vector de fusión

Usando los vectores de construcción anteriores, se realizó una construcción que tenía zcytor17 fusionado con IgGγ1. Esta construcción se realizó mediante PCR del dominio extracelular o dominio de unión a citocina del receptor zcytor17 descrito en el presente documento a partir de una biblioteca de ADNc de próstata (Clontech) o una biblioteca de ADNc de linfocitos activados usando métodos convencionales (por ejemplo, Ejemplo 7), y oligos que proporcionan sitios de restricción EcoRI y NheI. El producto PCR resultante se sometió a digestión con EcoRI y NheI, se purificó en gel como se describe en el presente documento y se ligó con Zem229R/IgGγ1 previamente digerido con EcoRI y NheI y purificado en bandas descrito anteriormente. El vector resultante se secuenció para confirmar que la fusión zcytor17/IgG gamma 1 (zcytor17/Ch1 IgG) era correcta.

También se construyó una construcción distinta que tenía un dominio extracelular de la subunidad del receptor de citocina heterodimérico fusionado a la cadena ligera κ como se ha indicado anteriormente. La construcción de cadena ligera κ humana/receptor citocina se realizó como se ha indicado anteriormente por PCR a partir de, por ejemplo, una biblioteca de ADNc de linfocitos (Clontech) usando métodos convencionales y oligos que proporcionan sitios de restricción para EcoRI y KpnI. El producto PCR resultante se sometió a digestión con EcoRI y KpnI y después este producto se ligó en un vector Zem228R/cadena ligera κ humana digerido previamente digerido con EcoRI y KpnI y purificado en bandas, como se ha descrito anteriormente. El vector resultante se secuenció para confirmar que la fusión subunidad del receptor de citocina/cadena ligera κ humana, era correcta.

D. Coexpresión de zcytor17 y el dominio extracelular de la subunidad de receptor de citocina heterodimérico

- Aproximadamente 15 µg de cada uno de los vectores anteriores, se cotransfectaron en células de mamífero, por ejemplo, células BHK-570 (ATCC n.º CRL-10314) usando reactivo LipofectaminePlus™ (GibcoBRL), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron durante 10 días en DMEM + FBS al 5 % (GibcoBRL) que contenía 1 µM de metotrexato (MTX) (Sigma, St. Louis, MO) y 0,5 mg/ml de G418 (GibcoBRL) durante 10 días. El conjunto resultante de transfectantes se seleccionó de nuevo en 10 µM de MTX y 0,5 mg/ml de G418 durante 10 días.
- El conjunto resultante de células doblemente seleccionadas se usó para generar proteína. Se usaron tres fábricas (Nunc, Dinamarca) de este conjunto para generar 10 l de medio acondicionado asérico. Este medio acondicionado se pasó sobre una columna de proteína A de 1 m y se eluyó en fracciones de aproximadamente 10,750 microlitros. Las fracciones que tenían la concentración de proteína más alta se agruparon y dializaron (límite de PM molecular 10 kD) frente a PBS. Finalmente el material dializado se sometió a análisis de aminoácidos (AAA) usando métodos habituales.

Ejemplo 18Determinación de subunidades receptoras que heterodimerizan o multimerizan con el receptor zcytor17

- Usando métodos convencionales descritos en el presente documento, se transfectaron las células de quimera BaF3/MPL-zcytor17 (Ejemplo 6) con una subunidad receptora de citocina heterodimérica adicional que sirve como una línea celular de bioensayo para medir la respuesta de la transducción de señales de los complejos del receptor zcytor17 heterodimérico con respecto al indicador luciferasa en presencia de TPO (Ejemplo 6). La transfección de la línea celular BaF3/MPL-zcytor17 con y una fusión del receptor de citocina de clase I – MPL adicional que señala en presencia del ligando TPO, determina que subunidad receptora de citocina heterodimérica se requiere para la señalización del receptor zcytor17. El uso de fusiones MPL-receptor para esta finalidad palia la necesidad de la presencia de un ligando natural para el receptor zcytor17.
- Se realizaron fusiones de receptor de citocina de clase I-MPL como se indica en el Ejemplo 5 usando el dominio extracelular y los dominios transmembrana del receptor MPL y el dominio de señalización intracelular del receptor de citocina de clase I deseado. La línea celular del bioensayo BaF3/MPL-zcytor17 cotransfectada con un receptor de citocina de clase I-MPL individual se fusiona como en el Ejemplo 6 para formar una línea celular receptora de citocina de clase I - BaF3/MPL-zcytor17/MPL. Los complejos receptores incluyen, pero sin limitación, el receptor zcytor17 en combinación con una fusión de receptor de citocina-MPL que comprende un componente gp130, LIF, IL-12 o WSX-1, o uno o más de los componentes del receptor IL-2 (IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ), receptor zcytor17 con uno o más de los componentes receptores de la familia de receptores DE IL-4/IL-13 (IL-4R α , IL-13R α , IL-13R α'), así como otros receptores de interleucina (por ejemplo, IL-15R α , IL-7R α , IL-9R α , IL-21R (receptor zalfa11)). Cada línea celular del complejo receptor independiente se ensayó después en presencia de TPO (ejemplo 6) y la proliferación se midió usando métodos rutinarios (por ejemplo, el ensayo con Alamar Blue como se describe en el Ejemplo 6). La línea celular de bioensayo BaF3/MPL-zcytor17 sirve como un control para la actividad de fondo, y por tanto se usa como una línea inicial para comparar la señalización por las diversas combinaciones de complejo de receptores. Además, también puede usarse el ensayo mediante ensayo con indicador de luciferasa (activación de transcripción de un gen indicador) como una forma para medir la señalización independientemente de la inducción de la proliferación. Además, puede construirse una línea celular del receptor de citocina de clase I BaF3/MPL para controlar los efectos de homodimerización del receptor de citocina de clase I-MPL para los receptores de citocina de clase I que se sabe que señalizan después de la homodimerización. Se espera que TPO en presencia del complejo receptor correcto, aumente la proliferación de la línea celular del receptor de citocina de clase I BaF3/MPL-zcytor17/MPL aproximadamente 5 veces sobre el fondo o más en presencia de TPO.

Ejemplo 19Reconstitución de receptor zcytor17 *in vitro*

- Para identificar componentes implicados en el complejo de señalización de zcytor17, se realizaron estudios de reconstitución de receptores formados de la siguiente manera. Por ejemplo, células BHK 570 (ATCC n.º CRL-10314) transfectadas, usando métodos convencionales descritos en el presente documento, con un plásmido vector de expresión de mamífero indicador de luciferasa, sirven como una línea celular de bioensayo para medir respuestas de transducción de señales a partir de un complejo receptor de zcytor17 transfectado con respecto al indicador de luciferasa en presencia del ligando de zcytor17. Las células BHK podrían usarse en el caso en el que las células BHK no expresen endógenamente el receptor zcytor17. También pueden usarse otras líneas de células. Un vector de expresión de mamífero indicador de luciferasa a modo de ejemplo es el plásmido KZ134 que se construye con oligonucleótidos complementarios ZC12,749 (SEQ ID NO: 43) y ZC12,748 (SEQ ID NO: 44) que contienen elementos de unión al factor de transcripción STAT de 4 genes. Un elemento inducible Sis c-fos modificado (m67SIE o HSIE) (Sadowski, H. *et al*, Science 261: 1739-1744, 1993), el p21 SIE1 del gen p21 WAF1 (Chin, Y. *et al*, Science 272: 719-722, 1996), el elemento de respuesta de la glándula mamaria del gen de la β caseína (Schmitt-Ney, M. *et*

al, Mol Cell Biol 11: 3745-3755, 1991), y un elemento inducible STAT del gen Fcg RI, (Seidel, H. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995). Estos oligonucleótidos contienen terminaciones compatibles con Asp718-XhoI y se ligaron, usando métodos convencionales, en un vector indicador de luciferasa de luciérnaga receptor con un promotor c-Fos (Poulsen, L.K. *et al.*, J. Biol. Chem. 273: 6229-6232, 1998) digerido con las mismas enzimas y que contenía un marcador de selección de neomicina. El plásmido KZ134 se usó para transfectar de manera estable células BHK o BaF3, usando métodos de transfección y selección convencionales, para preparar una línea celular BHK/KZ134 o BaF3/KZ134 respectivamente.

La línea celular de bioensayo se transfectó solo con el receptor zcytor17, o se cotransfectó con el receptor zcytor17 junto con uno de una diversidad de otras subunidades receptoras conocidas. Los complejos receptores incluyen, pero sin limitación, solo el receptor zcytor17, diversas combinaciones del receptor zcytor17 con subunidades receptoras gp130, LIF, IL-12 o WSX-1 o uno o más de los componentes del receptores de IL-2 (IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ), receptor zcytor17 con uno o más de los componentes de receptores de la familia de receptores de IL-4/IL-13 (IL-4R α , IL-13R α , IL-13R α'), así como otros receptores de interleucina (por ejemplo, IL-15R α , IL-7R α , IL-9R α , IL-21R (zalfa11)). Cada línea celular del complejo receptor independiente se ensaya después en presencia de medio acondicionado con citocinas o citocinas purificadas y la actividad luciferasa se mide usando métodos rutinarios. La línea celular de bioensayo no transfectada sirve como un control para la actividad luciferasa de fondo, y por tanto se usa como una línea inicial para comparar la señalización por las diversas combinaciones de complejo de receptores. El medio acondicionado o las citocinas que se unen al receptor zcytor17 en presencia del complejo receptor correcto, se espera que proporcione una lectura de luciferasa de aproximadamente 5 veces sobre el fondo o mayor.

Como alternativa, puede realizarse un ensayo similar en el que las líneas celulares BaF3/zcytor17-mpl y BaF3/zcytor17 (Ejemplo 10) se cotransfectan como se ha descrito anteriormente y se mide la proliferación celular.

25 Ejemplo 20

Construcción de células BaF3 que expresan zcytor17 de longitud completa

BaF3, una línea celular prelinfoide dependiente de interleucina-3 (IL-3) derivada de médula ósea murina (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al.*, Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), se mantuvo en medio completo (medio RPMI (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) complementado con suero de ternero fetal termoinactivado al 10 %, IL-3 murina 2 ng/ml (mIL 3) (I + D, Minneapolis, MN), L-glutamina 2 mM (Gibco-BRL) y piruvato sódico 1 mM (Gibco-BRL).

Para la electroporación, las células BaF3 se lavaron dos veces en PBS, pH 7,2 (Gibco-BRL) y después se resuspendieron en PBS y a una densidad celular de 10^7 células/ml. Un ml de células BaF3 resuspendidas se mezcló con 30 μ g del ADN plasmídico pZP7PX/zcytor17 y se transfectó en cámaras de electroporación desechables independientes (Gibco-BRL). Después las células recibieron choques de 2 series (800 1Fad/300 V.; 1180 1Fad/300V.) suministrados por un aparato de electroporación (CELL-PORATOR™; Gibco-BRL). Las células electroporadas se transfectaron después a 20 ml de medio completo y se colocaron en una incubadora durante 48 horas (37 °C, CO₂ al 5 %). Después las células se centrifugaron y se resuspendieron en 20 ml de medio completo que contenía puomicina Selection 2 μ g/ml (Clontech) en un matraz T75 para aislar el grupo resistente a puomicina. Las líneas clonales de las células BaF3 transfectadas, en lo sucesivo en el presente documento denominadas células BaF3/zcytor17, se aislaron como se describe más adelante.

En un hemocitómetro se contaron células BaF3/zcytor17 y se sembraron a 1 célula/pocillo, 0,5 células/pocillo, 0,1 células/pocillo y 0,01 células/pocillo, en un volumen de 100 μ l/pocillo en medio completo que contenía puomicina 2 μ g/ml. 15 clones se incrementaron en matraces T75 y 5 clones se ensayaron para la producción de ARN. Las células se lavaron una vez con PBS y se contaron con un hemocitómetro. 5×10^6 células se centrifugaron y el medio se retiró. Las células BaF3 no transfectadas también se contaron y se sedimentaron. Cuatro de los sedimentos se congelaron a -80 °C durante una noche. El ARN se aisló usando el kit de aislamiento S.N.A.P.™ de ARN Total (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y la producción de ARN total se determinó mediante un espectrofotómetro. La cantidad de ARN de zcytor17 se determinó después por RT-PCR usando el kit de RT-PCR (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante, usando los cebadores específicos de zcytor17-ZC29,180 (SEQ ID NO: 72) y ZC29,122 (SEQ ID NO: 65). Un clon que produjo una fuerte banda de ARN de zcytor17 se seleccionó para su uso en ensayos de proliferación de BaF3 con Alamar Blue (Ejemplo 6) para ensayar posibles ligandos.

60 Ejemplo 21

Clonación de zcytoR17 de ratón de una biblioteca de ADNc de testículo de ratón

Se exploró una biblioteca de ADNc de testículo de ratón para un clon de longitud completa de zcytoR17 de ratón. La biblioteca se sembró en placas a 65.500 ufc/placa en 24 placas LB + Amp. Se prepararon elevadores de filtro usando Hybond N (Amersham-Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) sobre un total de aproximadamente 1,6 millones de colonias. Los filtros se marcaron con una aguja caliente para la orientación y después se

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

5 Al día siguiente, los filtros se prelavaron a 65 °C en tampón de prelavado que consistía en 0,25 x SSC, SDS al 0,25 % y EDTA 1 mM. Los residuos celulares se retiraron manualmente usando Kimwipes® (Kimberly-Clark) y la solución se cambió 3 veces durante un período de 1 hora. Los filtros se secaron al aire y se conservaron a temperatura ambiente hasta necesitarse. Después los filtros se prehibridaron durante aproximadamente 3 horas a 63 °C en 20 ml de solución de hibridación ExpressHyb™ (Clontech, Palo Alto, CA).

15 La sonda B (Ejemplo 3C) se generó por PCR a partir de un molde de zcytoR17 humano usando los cebadores oligonucleotídicos ZC27,895 (SEQ ID NO: 64) y ZC28,917 (SEQ ID NO: 73) y se marcó radiactivamente con ³²P usando un kit disponible en el comercio (Megaprime DNA Labeling System; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna Stratagene™ de impluso (columna NucTrap®; Stratagene, La Jolla, CA). La sonda se desnaturalizó a 100 °C durante 15 min y se añadió a la solución ExpressHyb™. Los filtros se hibridaron en una solución de hibridación de 15 ml que contenía 1,6 x 10⁵ cpm/ml de sonda a 63 °C durante una noche. Los filtros se lavaron a 55 °C en 2X SSC, SDS al 0,1 % y EDTA 1 mM y se expusieron a una película de rayos X a -80 °C durante 4 días y medio. Se escogieron trece positivos de las placas como tapones y se colocaron en LB + amp 1 ml en tubos de 1,7 ml. Los tubos se pusieron a 4 °C durante una noche. Estos 13 positivos se sometieron a dos rondas de purificación adicionales. Las placas terciarias se cultivaron a 37 °C después de que los elevadores de filtro se tomaran y se escogieron colonias sencillas y se enviaron para secuenciación. Se determinó que tres de estos contenía la secuencia del ortólogo de ratón de zcytoR17.

25 Además, se generó un producto PCR usando ADNc CTLL-2 como molde y los oligonucleótidos ZC38,239 (SEQ ID NO: 88) y ZC38,245 (SEQ ID NO: 89) como cebadores. CTLL-2 es una línea celular de linfocitos T citotóxicos de ratón (ATCC n.º TIB-214). Esta reacción PCR se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo a 95 °C durante 1 minuto, 30 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 68 °C durante 3 minutos, después a 68 °C durante 10 minutos; inmersión a 4°C. La reacción PCR usó aproximadamente 0,5 ng de ADNc, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 µl de mezcla de polimerasa Advantage II (Clontech). Aproximadamente el 6 % del producto de PCR se usó como un molde en una nueva reacción PCR como se ha indicado anteriormente, excepto con los oligonucleótidos ZC38,239 (SEQ ID NO: 88) y ZC38,238 (SEQ ID NO: 90). Esta reacción PCR se realizó de la siguiente manera: 30 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 65 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 1 minuto, después 72 °C durante 7 minutos; inmersión a 10°C. La mayor parte de la reacción PCR se cargó en un gel de agarosa al 1,0 % y se escindió la banda predominante a aproximadamente 360 pb, el fragmento de ADN se eluyó y se realizó la secuenciación de ADN.

40 La secuencia del polinucleótido zcytor17 de ratón se muestra en la SEQ ID NO: 56 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la SEQ ID NO: 57. Además, una forma soluble truncada del polinucleótido zcytor17 de ratón se muestra en la SEQ ID NO: 92 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la SEQ ID NO: 93.

Ejemplo 22

45 Distribución tisular de zcytor17 humano en paneles tisulares usando PCR

Se exploró un panel de ADNc de tejidos murinos para la expresión de zcytor17 de ratón usando PCR. El panel se realizó internamente y contenía 94 muestras de ADNc y de ADNc marathon de diversos tejidos y líneas celulares de murinos normales y cancerosos, como se muestra en la Tabla 7 más adelante. Los ADNc procedían de ADN marathon o de bibliotecas de uso interno, de preparaciones de ARN de uso interno, ARN de Clontech o ARN Invitrogen. Los ADNc marathon de ratón se fabricaron usando el kit marathon-Ready™ (Clontech, Palo Alto, CA) y CC ensayado con cebadores de receptores de transferrina de ratón, ZC10,651 (SEQ ID NO: 79) y ZC10,565 (SEQ ID NO: 80) y después se eluyeron en función de la intensidad de la banda de transferrina. Para asegurar la calidad de las muestras de la biblioteca amplificada en el panel, se realizaron tres ensayos de control de calidad (CC): (1) para evaluar la calidad del ARN usado para las bibliotecas, los ADNc internos se ensayaron con respecto al tamaño medio del inserto por PCR con oligovectores que eran específicos para las secuencias del vector de una biblioteca de ADNc individual; (2) la estandarización de la concentración del ADNc en las muestras del panel se realizó usando métodos de PCR convencionales para amplificar el ADNc de la alfa tubulina o de G3PDH de longitud completa usando un oligovector 5': ZC14,063 (SEQ ID NO: 7) y un oligocebador específico de 3' alfa tubulina ZC17,574 (SEQ ID NO: 26) o un oligocebador específico de 3' G3PDH ZC17,600 (SEQ ID NO: 27); y (3) una muestra se envió a secuenciación para comprobar una posible contaminación por ADN ribosómico o mitocondrial. El panel se configuró en un formato de 96 pocillos que incluía una muestra de control positiva de ADN genómico de ratón (Clontech, Palo Alto, CA). Cada pocillo contenía aproximadamente 0,2-100 pg/µl de ADNc. La PCR se configuró usando los oligos ZC38,065 (SEQ ID NO: 77) y ZC38,068 (SEQ ID NO: 78), TaKaRa Ex Taq™ (TAKARA Shuzo Co LTD, Biomedicals Group, Japón) y colorante Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). La amplificación se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo a 94 °C durante 5 minutos; 5 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 30

segundos; 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, seguido de 1 ciclo a 72 °C durante 5 minutos. Aproximadamente 10 µl del producto de reacción de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa convencional usando un gel de agarosa al 4 %. El tamaño del fragmento de ADN predicho correcto se observó en el cerebro, en células CD90+, células dendríticas, embrionarias, MEWt n.º 2, línea celular de próstata Tuvak, glándula salival, piel y testículo.

El fragmento de ADN de piel y testículo se separó y purificó usando un kit de extracción en gel (Qiagen, Chatsworth, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se confirmaron por secuenciación para demostrar que eran realmente de zcytor17 de ratón.

Tabla 7

Tejido/línea celular	n.º de muestras	Tejido/línea celular	n.º de muestras
229	1		
7F2	1		
Adipocitos-Amplificado	1		
aTC1.9	1		
Cerebro	4		
CCC4	1		
CD90+ Amplificado	1		
OC10B	1		
Células dendríticas	1		
Células embrionarias	1		
Corazón	2		
Riñón	3		
Hígado	2		
Pulmón	2		
MEWt n.º 2	1		
P388D1	1		
Páncreas	1		
Placenta	2		
Línea Celular de Próstata Jakotay	1		
Línea Celular de Próstata Nelix	1		
Línea Celular de Próstata Paris	1		
Línea Celular de Próstata Torres	1		
Línea Celular de Próstata Tuvak	1		
Glándula Salival	2		
Músculo Esquelético	1		
Piel	2		
Intestino Delgado	1		
Músculo Liso	2		
Bazo	2		
Estómago	1		
Testículo	3		
Timo	1		

Ejemplo 23

15 Expresión de zcytor17 en diversos tejidos usando PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR)
 A. Cebadores y sondas para RT-PCR cuantitativa

La RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando el Sistema de Detección ABI PRISM 7700 Sequence (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) se había descrito anteriormente (Véase, Heid, C.A. *et al*, Genome Research 6: 986-994, 1996; Gibson, U.E.M. *et al*, Genome Research 6: 995-1001, 1996; Sundaresan, S. *et al*, Endocrinology 139: 4756-4764, 1998. Este método incorpora el uso de una sonda específica de genes que contiene colorantes fluorescentes tanto indicadores como inactivadores. Cuando la sonda está intacta la emisión de colorante indicador no se presenta debido a la estrecha proximidad del colorante inactivador. Durante la extensión por PCR usando cebadores directos e inversos específicos de genes adicionales, la sonda se escinde por actividad nucleasa 5' de la

Taq polimerasa que libera el colorante indicador de la sonda dando como resultado un aumento de la emisión de fluorescencia.

5 Los cebadores y las sondas usados para análisis RT-PCR cuantitativa en tiempo real de la expresión de Zcytor17 se diseñaron usando el programa informático de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Se diseñaron cebadores para Zcytor17 humano que abarcaban una unión intrón-exón para eliminar la amplificación de ADN genómico. El cebador directo, ZC37,877 (SEQ ID NO: 81) y el cebador inverso, ZC37,876 (SEQ ID NO: 82) se usaron en la reacción PCR (más adelante) a una concentración de aproximadamente 300 nM para sintetizar un producto de 73 pb. La sonda TaqMan® de Zcytor17 correspondiente, denominada ZG37,776 (SEC ID NO: 83) se sintetizó y marcó en PE Applied Biosystems. La sonda ZG37,776 se marcó en el extremo 5' con un colorante fluorescente indicador (6-carboxifluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un colorante fluorescente inactivador (6-carboxi-tetrametil-rodamina) (TAMRA) (PE Applied Biosystems).

15 Como un control para ensayar la integridad y calidad de las muestras de ARN ensayadas, todas las muestras de ARN (más adelante) se exploraron para el ARNr usando un conjunto de cebadores y sondas ordenados de PE Applied Biosystems (cat n.º 4304483). El kit contiene el cebador directo del ARNr (SEQ ID NO: 84), el cebador inverso de ARNr (SEQ ID NO: 85) y la sonda TaqMan® de ARNr (SEQ ID NO: 86) La sonda de ARNr se marcó en el extremo 5' con un colorante fluorescente indicador VIC (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con el colorante fluorescente inactivador TAMRA (PE Applied Biosystems). Los resultados del ARNr también sirven como un control endógeno y permiten la normalización de la expresión de ARNm de Zcytor17 resultante observada en las muestras de ensayo.

25 Se extrajo sangre de diversos donantes anónimos y se aisló PBMC. Diversos subconjuntos de células inmunitarias (CD3+, CD4+, CD8+, CD14+, CD19+, CD45RA, CD45RO y CD56+) todas se aislaron después usando microperlas y el sistema de separación de células magnéticas de Miltenyi Biotec. El ARN se preparó de todas las poblaciones de CD45RA, CD45RO y CD56+ en su estado en reposo usando el kit RNeasy Midiprep™ (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las poblaciones de CD3+, CD4+ y CD8+ se activaron usando anticuerpo anti-CD3 unido a placa 200 ng/ml y anticuerpo anti-CD28 soluble 5 ug/ml y las células se recogieron para aislamiento de ARN a 0,4 y 16 horas. Las muestras de CD19+ se aislaron de garganta humana y se activaron con ionomicina 0,5 ug/ml y con PMA 10 ng/ml. Después, las células se recogieron a las 0,4 horas y 24 horas y se aisló el ARN. Se activaron monocitos CD14+ humanos con cualquiera de 0,1 µg/ml de LPS o 1,0 µg/ml LPS durante 20 horas. Las células en reposo y activadas se recogieron después y se aisló el ARN. Además, el ARN se aisló de líneas celulares de monocito humano en reposo y activadas (10,0 ug/ml LPS) HL-60, THP-1 (ATCC n.º TIB-202) y U937. Se usó ARN de THP-1 como control porque se mostró que expresaba Zcytor17 por Transferencia Northern (Ejemplo 3).

B. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

40 Los niveles relativos de ARNm de Zcytor17 se determinaron analizando muestras de ARN total usando el método de RT-PCR de una etapa (PE Applied Biosystems). El ARN total de células THP-1 que expresaban Zcytor17 se aisló por métodos convencionales y se usó para generar una curva estándar usada para la cuantificación. La curva consistía en diluciones en serie con factor 10 que variaban de 0,25 a 0,00025 ng/µl para la exploración de ARNr y de 250 a 0,25 ng/µl para la exploración de Zcytor17, analizándose cada punto de curva patrón por triplicado. Las muestras de ARN total de las células humanas también se analizaron por triplicado para determinar los niveles de transcripto de Zcytor17 humano y de ARNr como un control endógeno. En un volumen total de 25 µl, cada muestra de ARN se sometió a una reacción de RT-PCR de una etapa que contenía: aproximadamente 50 ng de ARN total en tampón A (KCl 50 mM, Tris-HCL 10 mM); el colorante patrón interno, carboxi-x-rodamina (ROX)); cebadores apropiados (aproximadamente 50 nM de cebadores de ARNr (SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85) para las muestras de ARNr, y aproximadamente 300 nM de cebadores ZC37,877 (SEQ ID NO: 81) y ZC22,276 (SEQ ID NO: 87) para muestras de Zcytor17); la sonda apropiada (aproximadamente 50nM de sonda TaqMan® de ARNr (SEQ ID NO: 86) para muestras de ARNr, aproximadamente 100 nM de sonda ZG37,776 (SEC ID NO: 83) para muestras de Zcytor17); MgCl₂ 5,5 mM; 300 µM de cada uno de d-CTP, d-ATP, y d-GTP y 600 µM de d-UTP; transcriptasa inversa MuLV (0,25 U/µl); ADN polimerasa AmpliTaq Gold™ (0,025 U/µl) (PE Applied Biosystems); e inhibidor de RNasa (0,4 U/µl) (PE Applied Biosystems). Las condiciones del termociclado de la PCR fueron las siguientes: una etapa inicial de transcripción inversa (RT, *Reverse Transcription*) de un ciclo a 48 °C durante 30 minutos; seguido de una etapa de activación AmpliTaq Gold™ (PE Applied Biosystems) de un ciclo a 95 °C durante 10 minutos; seguido de 40 ciclos de amplificación a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto.

60 Los niveles relativos de ARN de Zcytor17 se determinaron usando el método de curva patrón como describe el fabricante, PE Biosystems (User Bulletin n.º 2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, 11 de diciembre de 1997). Se usaron mediciones de ARNr para normalizar los niveles de Zcytor17. Se realizaron tres experimentos ensayando lo mencionado anteriormente. Los datos mostrados en las Tablas 8 y 9 a continuación se expresan como una proporción de ARNm de Zcytor17 con respecto a ARNr.

65

Tabla 8

Muestra	Reposo	Estimulación de 4 h	Estimulación de 16 h	Estimulación de 24 h
CD19+ PBMC	0,06			
CD19+ amígdala	0,003	0,02		0,002
CD3+	0	0,72	0,51	
CD45RA	0			
CD45RO	0			
CD56+ NK	0			

Tabla 9

Muestra	Reposo	Estimulación de 4 h	Estimulación de 16 h
Linfocitos T CD4+	0,003	0,55	0,41
Linfocitos T CD8+	0,00	0,37	0,13

5 Aunque hubo alguna expresión de mensaje de Zcytor17 en los linfocitos B CD19+ en reposo de la sangre periférica, los linfocitos B CD19+ tanto en reposo como activados aislados de amígdala humana mostraron solo expresión mínima. Los linfocitos T de memoria en reposo, (CD45RO), linfocitos T vírgenes (CD45RA) y linfocitos NK (CD56+) dieron negativo en el ensayo para el mensaje de Zcytor17. Sin embargo, en los linfocitos T CD3+, el mensaje de Zcytor17 experimentó una regulación positiva drástica a una proporción de aproximadamente 0,72 después de 4 horas de activación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. La proporción cayó después a 0,51 al cabo de 16 horas postactivación. Antes de la activación, no se detectó ARNm de Zcytor17 en linfocitos T CD3+ en reposo.

10 Los resultados revelaron que Zcytor17 no estaba presente a niveles apreciables en subconjuntos de linfocitos T CD4+ o CD8+. Después de una activación de 4 horas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 parecía haber una regulación positiva sustancial de mensaje de Zcytor17 producido en subconjuntos tanto de linfocitos CD4+ como en CD8+. Al cabo de 16 horas postactivación, el ARNm de Zcytor17 disminuyó a 0,41 en linfocitos T CD4+ y a 0,13 en linfocitos T CD8+.

20 Hubo una expresión extremadamente alta de mensaje de Zcytor17 en las líneas celulares monocíticas tanto en reposo como activadas THP-1 y U937. La línea celular U937 activada tuvo el nivel de expresión más alto. La línea celular HL-60, una línea celular monocítica prediferenciada, mostró una disminución en la expresión del ARNm de Zcytor17 después de la activación. Estos resultados confirman los resultados de expresión obtenidos por transferencia northern (Ejemplo 2). Hubo muy poca expresión de mensaje de Zcytor17 en monocitos CD14+ primarios, tanto en reposo como activados, con 0,1 ug/ml y 1,0 ug/ml de LPS.

25 A partir de lo anterior, se apreciará que, aunque en el presente documento y con la finalidad de ilustrar, se han descrito realizaciones específicas de la invención, es posible hacer diversas modificaciones.

30 Por consiguiente, la invención solo está limitada por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics, Inc.

35 <120> RECEPTOR ZCYTOR17 DE CITOCINA

<130> 00-42PC

<150> US 60/214.282

40 <151> 26-06-2000

<150> US 60/214.955

<151> 29-06-2000

45 <150> US 60/267.963

<151> 02-08-2001

<160> 93

50 <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1

<211> 2402

ES 2 593 002 T3

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (171)...(2366)

<400> 1

```

ggcacgaggt gtgtgtgcag tatgaaaatt gagacaggaa ggcagagtgt cagcttggtc      60
cacctcagct gggaatgtgc atcaggcaac tcaagttttt caccacggca tgtgtctgtg      120
aatgtccgca aaacattctc tctccccagc cttcatgtgt taacctgggg atg atg      176
                                     Met Met
                                     1
  
```

```

tgg acc tgg gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc agc ctg      224
Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu
      5              10              15
  
```

10 gca gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat 272

ES 2 593 002 T3

Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr	
20 25 30	
agg aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat	320
Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr	
35 40 45 50	
acc cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat	368
Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp	
55 60 65	
aat tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tcg tgc tct	416
Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser	
70 75 80	
ttt ttc ctt cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg	464
Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val	
85 90 95	
gaa gct gaa aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg	512
Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp	
100 105 110	
aga tta gag aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg	560
Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val	
115 120 125 130	
aaa cca gtt ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag	608
Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys	
135 140 145	
cct gag ttg gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc	656
Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe	
150 155 160	
agg aca gtc aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac	704
Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn	
165 170 175	
cgt aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt	752
Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe	
180 185 190	

ES 2 593 002 T3

tcc tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag caa gat	1328
Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp	
375 380 385	
aaa tta aaa cct ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca atg ttg	1376
Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu	
390 395 400	
cat gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc aaa gaa	1424
His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu	
405 410 415	
ggc gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac att ggc gtg	1472
Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val	
420 425 430	
aag acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt gag aga aag	1520
Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys	
435 440 445 450	
ggt atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa	1568
Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys	
455 460 465	
gga ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac ggc ctg gag	1616
Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu	
470 475 480	
tcc ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc agc acc	1664
Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr	
485 490 495	
agt gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca ttg tca	1712
Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser	
500 505 510	
ttc agt gtc ttt gag att atc ctc ata act tct ctg att ggt gga ggc	1760
Phe Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly	
515 520 525 530	
ctt ctt att ctc att atc ctg aca gtg gca tat ggt ctc aaa aaa ccc	1808

ES 2 593 002 T3

Leu	Leu	Ile	Leu	Ile	Ile	Leu	Thr	Val	Ala	Tyr	Gly	Leu	Lys	Lys	Pro	
				535					540						545	
aac	aaa	ttg	act	cat	ctg	tgt	tgg	ccc	acc	gtt	ccc	aac	cct	gct	gaa	1856
Asn	Lys	Leu	Thr	His	Leu	Cys	Trp	Pro	Thr	Val	Pro	Asn	Pro	Ala	Glu	
			550					555						560		
agt	agt	ata	gcc	aca	tgg	cat	gga	gat	gat	ttc	aag	gat	aag	cta	aac	1904
Ser	Ser	Ile	Ala	Thr	Trp	His	Gly	Asp	Asp	Phe	Lys	Asp	Lys	Leu	Asn	
		565					570							575		
ctg	aag	gag	tct	gat	gac	tct	gtg	aac	aca	gaa	gac	agg	atc	tta	aaa	1952
Leu	Lys	Glu	Ser	Asp	Asp	Ser	Val	Asn	Thr	Glu	Asp	Arg	Ile	Leu	Lys	
	580					585						590				
cca	tgt	tcc	acc	ccc	agt	gac	aag	ttg	gtg	att	gac	aag	ttg	gtg	gtg	2000
Pro	Cys	Ser	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Leu	Val	Ile	Asp	Lys	Leu	Val	Val	
595					600					605					610	
aac	ttt	ggg	aat	gtt	ctg	caa	gaa	att	ttc	aca	gat	gaa	gcc	aga	acg	2048
Asn	Phe	Gly	Asn	Val	Leu	Gln	Glu	Ile	Phe	Thr	Asp	Glu	Ala	Arg	Thr	
				615					620						625	
ggt	cag	gaa	aac	aat	tta	gga	ggg	gaa	aag	aat	ggg	tat	gtg	acc	tgc	2096
Gly	Gln	Glu	Asn	Asn	Leu	Gly	Gly	Glu	Lys	Asn	Gly	Tyr	Val	Thr	Cys	
			630					635							640	
ccc	ttc	agg	cct	gat	tgt	ccc	ctg	ggg	aaa	agt	ttt	gag	gag	ctc	cca	2144
Pro	Phe	Arg	Pro	Asp	Cys	Pro	Leu	Gly	Lys	Ser	Phe	Glu	Glu	Leu	Pro	
		645					650								655	
gtt	tca	cct	gag	att	ccg	ccc	aga	aaa	tcc	caa	tac	cta	cgt	tcg	agg	2192
Val	Ser	Pro	Glu	Ile	Pro	Pro	Arg	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Arg	Ser	Arg	
		660					665								670	
atg	cca	gag	ggg	acc	cgc	cca	gaa	gcc	aaa	gag	cag	ctt	ctc	ttt	tct	2240
Met	Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	Pro	Glu	Ala	Lys	Glu	Gln	Leu	Leu	Phe	Ser	
675					680					685					690	
ggt	caa	agt	tta	gta	cca	gat	cat	ctg	tgt	gag	gaa	gga	gcc	cca	aat	2288
Gly	Gln	Ser	Leu	Val	Pro	Asp	His	Leu	Cys	Glu	Glu	Gly	Ala	Pro	Asn	
				695					700						705	

ES 2 593 002 T3

cca tat ttg aaa aat tca gtg aca gcc agg gaa ttt ctt gtg tct gaa 2336
 Pro Tyr Leu Lys Asn Ser Val Thr Ala Arg Glu Phe Leu Val Ser Glu
 710 715 720

aaa ctt cca gag cac acc aag gga gaa gtc taaatgagac catagcatga 2386
 Lys Leu Pro Glu His Thr Lys Gly Glu Val
 725 730

gaccctcggg gcctca 2402

<210> 2
 <211> 732
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

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

10

ES 2 593 002 T3

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

ES 2 593 002 T3

Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro
 545 550 555 560
 Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys
 565 570 575
 Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile
 580 585 590
 Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu
 595 600 605
 Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala
 610 615 620
 Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Thr Cys Pro Phe Arg Pro Asp Cys Pro Leu Gly Lys Ser Phe Glu Glu
 645 650 655
 Leu Pro Val Ser Pro Glu Ile Pro Pro Arg Lys Ser Gln Tyr Leu Arg
 660 665 670
 Ser Arg Met Pro Glu Gly Thr Arg Pro Glu Ala Lys Glu Gln Leu Leu
 675 680 685
 Phe Ser Gly Gln Ser Leu Val Pro Asp His Leu Cys Glu Glu Gly Ala
 690 695 700
 Pro Asn Pro Tyr Leu Lys Asn Ser Val Thr Ala Arg Glu Phe Leu Val
 705 710 715 720
 Ser Glu Lys Leu Pro Glu His Thr Lys Gly Glu Val
 725 730

5 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Motivo peptídico WSXWS
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(5)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

15 <400> 3
 Trp Ser Xaa Trp Ser
 1 5

20 <210> 4
 <211> 2196
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de polinucleótidos degenerada de SEQ ID NO: 2
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(2196)
 <223> n = A, T, C o G

ES 2 593 002 T3

<400> 4

atgatgtgga	cntgggcnyt	ntggatgytn	ccnwsnytn	gyaarttyws	nytnngcngcn	60
ytncncgna	arccngaraa	yathwsntgy	gtntaytayt	aymgnaaraa	yytnacntgy	120
acntggwsnc	cnggnaarga	racnwsntay	acncartaya	cngtnaarmg	nacntaygcn	180
ttyggngara	arcaygayaa	ytgyacnacd	aaywsnwsna	cnwsngaraa	ymgngcnwsn	240
tgywsnttyt	tyytnccnmg	nathacnath	ccngayaayt	ayacnathga	rgtnngargcn	300
garaayggng	ayggngtnt	haarwsncay	atgacntayt	ggmgnytna	raayathgcn	360
aaracngarc	cncnnaarat	htymngntn	aarccngtny	tnggnathaa	rmgnatgath	420
carathgart	ggathaarcc	ngarytngcn	cngtnwsnw	sngayytnaa	rtayacnytn	480
mgnttymgna	cngtnaayws	nacnwsntgg	atggargtna	ayttygnaa	raaymgnaar	540
gayaaraayc	aracntayaa	yytnacnggn	ytncarcnt	tyacngarta	ygnathgcn	600
ytmgntgyg	cngtnaarga	rwsnaartty	tggwsngayt	ggwsncarga	raaratgggn	660
atgacngarg	argargcnc	ntgyggnytn	garytntggm	gngtntnaa	rccngcngar	720
gcngayggnm	gnmgncngt	nmgnytnyt	tggaraarg	cnmgngngc	nccngtntyt	780
garaaracny	tngntayaa	yathgtgtay	tayccngarw	snaayacnaa	yytnacngar	840
acnathgaya	cnacnaayca	rcarytngar	ytncayytng	gngngarws	nttytgggt	900
wsnatgathw	sntayaayws	nytnngnaar	wsnccngtn	cnacnytnmg	nathccngcn	960
athcargara	arwsnttyca	rtgyathgar	gtnatgcarg	cntgygtngc	ngargaycar	1020
ytngtngtna	artggcarws	nwsngcnytn	gaygtnaaya	cntggatgat	hgartggtty	1080
ccngaygtng	aywsngarcc	nacnacnytn	wsntgggarw	sngtnwsnca	rgcnacnaay	1140
tggacnathc	arcargayaa	rytnaarccn	ttytggtyt	ayaayathws	ngtntayccn	1200
atgytncayg	ayaargtng	ngarccntay	wsnathcarg	cntaygnaa	rgargngtn	1260
ccnwsngarg	gnccngarac	naargtngar	aayathggng	tnaaracngt	nacnathacn	1320
tggaaargara	thccnaarws	ngarmgnaar	ggnathatht	gyaaytayac	nathttytay	1380
cargcngarg	gnggnaargg	nttywsnaar	acngtnaayw	snwsnathyt	ncartaygg	1440
ytngarwsny	tnaarmgnaa	racnwsntay	athgtncarg	tnatggcnws	nacnwsngcn	1500
ggnggnacna	ayggnacnws	nathaaytty	aaracnytnw	snttywsngt	nttygarath	1560
athytnatha	cnwsnytnat	hggngnggn	ytntnythy	tnathathyt	nacngtngcn	1620
tayggnytna	araarccnaa	yaarytnacn	caytntgyt	ggccnacngt	nccnaayccn	1680
gcngarwsnw	snathgcnac	ntggcaygg	gaygayttya	argayaaryt	naayytnaar	1740
garwsngayg	aywsngtnaa	yacngargay	mgnathytna	arccntgyws	nacnccnwsn	1800
gayaarytng	tnathgayaa	rytngtngtn	aayttyggna	aygtntnca	rgarathtty	1860
acngaygarg	cnmgncngg	ncargaraay	aaytngngg	gngaraaraa	yggntaygtn	1920
acntgyccnt	tymgncngga	ytgyccnytn	ggnaarwsnt	tygargaryt	nccngtnwsn	1980
ccngarathc	cncnmgnaa	rwsncartay	ytmgngwsnm	gnatgccnga	rggnacnmgn	2040
ccngargcna	argarcaryt	nytnnttywsn	ggncarwsny	tngtnccnga	ycayytntgy	2100
gargarggng	cncnnaaycc	ntayytnaar	aaywsngtna	cngcnmgnga	rttyytngtn	2160
wsngaraary	tnccngarca	yacnaarggn	gargtn			2196

5 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC12701

<400> 5

ES 2 593 002 T3

tcagaggtaa ctcccgttgc 20

5 <210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC27898

<400> 6
ttagcgcaga gcagccatac acc 23

15 <210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC14063

<400> 7
caccagacat aatagctgac agact 25

25 <210> 8
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC27899

<400> 8
ccagaacttt gactccttga ccg 23

35 <210> 9
<211> 765
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 9

tgtgtgtgca gtatgaaaat tgagacagga aggcagagtg tcagcttggt ccacctcagc 60
 tgggaatgtg catcaggcaa ctcaagtttt tcaccacggc atgtgtctgt gaatgtccgc 120
 aaaacattct ctctccccag ccttcattgtg ttaacctggg gatgatgtgg acctgggcac 180
 tgtggatgct cccctcactc tgcaaattca gcctggcagc tctgccagct aagcctgaga 240
 acatttctg tgtctactac tataggaaaa atttaacctg cacttggagt ccaggaaagg 300
 aaaccagtta taccagctac acagttaaga gaacttacgc ttttggagaa aaacatgata 360
 attgtacaac caatagttct acaagtgaaa atcgtgcttc gtgctctttt ttccttccaa 420
 gaataacgat cccagataat tataccattg aggtggaagc tgaaaatgga gatggtgtaa 480
 ttaaattctca tatgacatac tggagattag agaacatagc gaaaactgaa ccacctgaga 540
 ttttccgtgt gaaaccagtt ttgggcattca aacgaatgat tcaaattgaa tggataaagc 600
 ctgagttggc gcctgtttca tctgatttaa aatacacact tcgattcagg acagtcaaca 660
 gtaccagctg gatggaagtc aacttcgcta agaaccgtaa ggataaaaac caaacgtaca 720
 acctcacggg gctgcagcct ttacagaat atgtcatagc tctgc 765

45 <210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28481

5 <400> 10
 gaatggataa agcctgagtt ggcg 24

10 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC6346

20 <400> 11
 ggccccttgc tccataccac 20

<210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28480

30 <400> 12
 cgattcagga cagtcaacag tacc 24

<210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC26405

40 <400> 13
 tatagaagga cacctagtca gaca 24

<210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC27895

50 <400> 14
 gaagtcaact tcgctaagaa ccg 23

55 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC5020

<400> 15
 cactggagtg gcaactcca g 21

65 <210> 16
 <211> 1853
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 593 002 T3

<400> 16

```

agtcaacttc gctaagaacc gtaaggataa aaaccaaacg tacaacctca cggggctgca      60
gccttttaca gaatatgtca tagctctgcg atgtgcggtc aaggagtcaa agttctggag     120
tgactggagc caagaaaaaa tgggaatgac tgaggaagaa gctccatgtg gcctggaact     180
gtggggagtc ctgaaaccag ctgaggcgga tggagaaggg ccagtgcggt tgttatggaa     240
gaaggcaaga ggagccccag tcctagagaa aacacttggc tacaacatat ggtactatcc     300
agaaagcaac actaacctca cagaaacaat gaacactact aaccagcagc ttgaactgca     360
tctgggaggc gagagctttt ggggtgtctat gatttcttat aattctcttg ggaagtctcc     420
agtggccacc ctgaggattc cagctattca agaaaaatca tttcagtgca ttgaggtcat     480
gcaggcctgc gttgctgagg accagctagt ggtgaagtgg caaagctctg ctctagacgt     540
gaacacttgg atgattgaat ggtttccgga tgtggactca gagcccacca ccctttcctg     600
ggaatctgtg tctcaggcca cgaactggac gatccagcaa gataaattaa aacctttctg     660
gtgctataac atctctgtgt atccaatggt gcatgacaaa gttggcgagc catattccat     720
ccaggcttat gccaaagaag gcgttccatc agaaggctct gagaccaagg tggagaacat     780
tggcgtgaag acggtcacga tcacatggag agagattccc aagagtgaga gaaagggat     840
catctgcaac tacaccatct tttaccaagc tgaagggtga aaaggattct ccaagacagt     900
caattccagc atcttgcagt acggcctgga gtccctgaaa cgaaagacct cttacattgt     960
tcaggtcatg gccagcacca gtgctggggg aaccaacggg accagcataa atttcaagac    1020
attgtcattc agtgtctttg agattatcct cataacttct ctgattggtg gaggccttct    1080
tattctcatt atcctgacag tggcatatgg tctcaaaaaa cccaacaaat tgactcatct    1140
gtgttggecc accgttccca accctgctga gagtagtata gccacacggc atggagatga    1200
tttcaaggat aagctaaacc tgaaggagtc tgatgactct gtgaacacag aagacaggat    1260
cttaaaacca tgttccaccc ccagtgacaa gttggtgatt gacaagttgg tgggtgaactt    1320
tgggaatggt ctgcaagaaa ttttcacaga tgaagccaga acgggtcagg aaaacaattt    1380
aggaggggaa aagaatggga ctagaattct gtcttctgac ccaacttcaa tataagtgtg    1440
gactaaaatg cgagaaaggt gtctgtggtt ctatgcaaat tagaaaggac atgcagagtt    1500
ttccaactag gaagactgaa tctgtggccc caagagaacc atctctgaag actgggtatg    1560
tggcttttcc cacacatgga ccacctacgg atgtaatctg taatgcatgt gcatgagaag    1620
tctgttatta agtagagtgt gaaaacatgg ttatggtaat aggaacagct tttaaaatgc    1680
ttttgcattt gggcctttca tacaataaag ccataatacc attttcatgt aatgctatac    1740

ttctatacta ttttcatgta atactatact tctatactat tttcatgtaa tactatactt    1800
ctatactatt ttcatgtaat actatacttc tatattaaag ttttaccac  tca                1853

```

5 <210> 17
 <211> 1299
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (162)...(1133)

15 <400> 17

ES 2 593 002 T3

tgtgtgtgca gtatgaaaat tgagacagga aggcagagtg tcagcttggt ccacctcagc	60
tgggaatgtg catcaggcaa ctcaagtttt tcaccacggc atgtgtctgt gaatgtccgc	120
aaaacattct ctctcccag ccttcatgtg ttaacctggg g atg atg tgg acc tgg	176
	Met Met Trp Thr Trp
	1 5
gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gct ctg	224
Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Ala Leu	
	10 15 20
cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg aaa aat	272
Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn	
	25 30 35
tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc cag tac	320
Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr Gln Tyr	
	40 45 50
aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat aat tgt aca	368
Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn Cys Thr	
	55 60 65
acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tgg tgc tct ttt ttc ctt	416
Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe Phe Leu	
	70 75 80 85
cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg gaa gct gaa	464
Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu Ala Glu	
	90 95 100

ES 2 593 002 T3

aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg aga tta gag	512
Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg Leu Glu	
105 110 115	
aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg aaa cca gtt	560
Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys Pro Val	
120 125 130	
ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag cct gag ttg	608
Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro Glu Leu	
135 140 145	
gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc agg aca gtc	656
Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg Thr Val	
150 155 160 165	
aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac cgt aag gat	704
Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg Lys Asp	
170 175 180	
aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt aca gaa tat	752
Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr Glu Tyr	
185 190 195	
gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc tgg agt gac	800
Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp Ser Asp	
200 205 210	
tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa gct cca tgt ggc	848
Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro Cys Gly	
215 220 225	
ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag gcg gat gga aga agg	896
Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly Arg Arg	
230 235 240 245	
cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga gga gcc cca gtc cta gag	944
Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val Leu Glu	
250 255 260	
aaa aca ctt ggc tac aac ata tgg tac tat cca gaa agc aac act aac	992
Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn Thr Asn	
265 270 275	

ES 2 593 002 T3

```

ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag cag ctt gaa ctg cat ctg      1040
Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu His Leu
      280                285                290

gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att tct tat aat tct ctt ggg      1088
Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser Leu Gly
      295                300                305

aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca gct att caa gaa aaa      1133
Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu Lys
      310                315                320

tagaaacttt acagatgcta gtcccagaca taaaagaaaa taatgttctg gatgtgcacg      1193
atggctcacg cctgtaatcc cagcactttg aggccaagac gggtagatcg ctgagttcag      1253
gagttcaaga caagtccagg caacatagtg aaaccttggt tctaca                      1299

```

5
<210> 18
<211> 324
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 18

```

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

```

10

ES 2 593 002 T3

Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala
 165 170 175
 Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln
 180 185 190
 Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser
 195 200 205
 Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu
 210 215 220
 Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu
 225 230 235 240
 Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly
 245 250 255
 Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro
 260 265 270
 Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln
 275 280 285
 Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala
 305 310 315 320
 Ile Gln Glu Lys

- 5 <210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC27897
- 15 <400> 19
 caagctactt ctctgggtga tgg 23
- 20 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28521
- 30 <400> 20
 gagtagtagc tccaggattc ac 22
- 35 <210> 21
 <211> 1476
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
- <220>
 <221> CDS
 <222> (162)...(878)
- <400> 21

ES 2 593 002 T3

tggtgtgca gtatgaaaat tgagacagga aggcagagtg tcagcttggt ccacctcagc	60
tgggaatgtg catcaggcaa ctcaagtttt tcaccacggc atgtgtctgt gaatgtccgc	120
aaaacattct ctctcccag ccttcattgtg ttaacctggg g atg atg tgg acc tgg	176
	Met Met Trp Thr Trp
	1 5
gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gct ctg	224
Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Ala Leu	
	10 15 20
cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg aaa aat	272
Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn	
	25 30 35
tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc cag tac	320
Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr Gln Tyr	
	40 45 50
aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat aat tgt aca	368
Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn Cys Thr	
	55 60 65
acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tog tgc tct ttt ttc ctt	416
Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe Phe Leu	
	70 75 80 85
cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg gaa gct gaa	464
Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu Ala Glu	
	90 95 100
aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg aga tta gag	512

ES 2 593 002 T3

Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg Leu Glu	
105	110 115
aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg aaa cca gtt	560
Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys Pro Val	
120	125 130
ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag cct gag ttg	608
Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro Glu Leu	
135	140 145
gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc agg aca gtc	656
Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg Thr Val	
150	155 160 165
aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac cgt aag gat	704
Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg Lys Asp	
170	175 180
aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt aca gaa tat	752
Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr Glu Tyr	
185	190 195
gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc tgg agt gac	800
Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp Ser Asp	
200	205 210
tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa ggc aag cta ctc	848
Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Gly Lys Leu Leu	
215	220 225
cct gcg att ccc gtc ctg tct gct ctg gtg tagggctgct ttgggctaga	898
Pro Ala Ile Pro Val Leu Ser Ala Leu Val	
230	235
cttgggtgggg tttgtcacca cctgggttggg aatcatggaa tctcatgacc ccaggggccc	958
cctgtaccat cgagagtgag cctgcacaac tttgtgcccc aaaggcaaag gatcacattt	1018
taatactcat gaggttctta tactatacat gaaagggat catatcattt gttttgtttt	1078
gtttttgtttt tgagatggag tcttactctg tcaccagga tggagtgcag tgatgtgatc	1138
tgggctcact gccaccacca cctcccagat tcaagcaatt cttgtgcctc agcctcccaa	1198
gtagctggga ttacaggggc ccacgacat gcccggttga tttttgtatt tttagtagag	1258
aaggatatac accatgttgg ctaggctagt cttgaactcc tgacctcagg taatctgcc	1318
accttgacct cccaaagtgt tgggattaca ggcgtgagcc actgtgcccc gccagtatca	1378
tatcatctga aggtatcctg tgataaatta aagatacata ttgtgaatcc tggagctact	1438
actcaaaaaa taataaagg tgtaactaat acaattta	1476

ES 2 593 002 T3

5 <210> 22
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22

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

10 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28575
 20 <400> 23
 ccaggaaagg aaaccagtta tacc 24
 <210> 24

ES 2 593 002 T3

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC27899

<400> 24
 ccagaacttt gactccttga ccg 23

10

<210> 25
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC14063

<400> 25
 caccagacat aatagctgac agact 25

20

<210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC17574

<400> 26
 ggtrttgctc agcatgcaca c 21

30

<210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC17600

40

<400> 27
 catgtaggcc atgaggtcca ccac 24

45

<210> 28
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC26358

<400> 28
 aaaaccaaac gtacaacctc acggg 25

55

<210> 29
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC26359

<400> 29
 gagcagccat acaccagagc agaca 25

65

<210> 30

ES 2 593 002 T3

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC17212
 <400> 30
 ggggaattcg aagccatgcc ctctgggcc ctc 33
 10 <210> 31
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC17313
 <400>31
 20 caccctgcga agccttagca gcagtaggcc 30
 <210> 32
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC17205
 30 <400> 32
 cccgccccat ccccgtaggac cacctgggtg 30
 <210> 33
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC17206
 40 <400> 33
 gggtagac cttcagggt gctgccaata 30
 <210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Péptido etiqueta Glu-Glu
 50 <400> 34
 Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5
 55 <210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Secuencia Artificial*
 60 <220>
 <223> Secuencia del péptido etiqueta FLAG

ES 2 593 002 T3

<400> 35

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

5 <210> 36
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 36

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

15 <210> 37
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(990)
 <400> 37

ES 2 593 002 T3

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

ES 2 593 002 T3

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
165	170
175	
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg	576
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
180	185
190	
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac	624
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
195	200
205	
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg	672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
210	215
220	
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag	720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	
225	230
235	240
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa gcc ttc tat	768
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
245	250
255	
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac	816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
260	265
270	
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc	864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
275	280
285	
ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac	912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
290	295
300	
gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg	960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
305	310
315	320
cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa	990
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
325	330

<210> 38
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 38

5

ES 2 593 002 T3

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

ES 2 593 002 T3

<211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(321)

10 <400> 39

act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 48
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

ttg aaa tct ggt acc gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 96
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg 144
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc 192
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa 240
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc 288
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 321

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *
 100 105

15 <210> 40
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

ES 2 593 002 T3

<400> 44

tcgagacgcg tggccaagga ttgaattcct agaaatctac agttcctttt ctgggaaata 60
 cgcggggtgta attccgggaa ggggagggat ttacgggaag 100

5

<210> 45
 <211> 2529
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (162)...(2108)

15

<400> 45

tgtgtgtgca gtatgaaaat tgagacagga aggcagagtg tcagcttggt ccacctcagc 60
 tgggaatgtg catcaggcaa ctcaagtttt tcaccacggc atgtgtctgt gaatgtccgc 120
 aaaacattct ctctcccag ccttcatgtg ttaacctggg g atg atg tgg acc tgg 176
 Met Met Trp Thr Trp
 1 5

ES 2 593 002 T3

gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gct ctg 224
Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Ala Leu
10 15 20

cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg aaa aat 272
Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn
25 30 35

tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc cag tac 320
Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr Gln Tyr
40 45 50

aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat aat tgt aca 368
Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn Cys Thr
55 60 65

acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tgc tgc tct ttt ttc ctt 416
Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe Phe Leu
70 75 80 85

cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg gaa gct gaa 464
Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu Ala Glu
90 95 100

aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg aga tta gag 512
Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg Leu Glu
105 110 115

aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg aaa cca gtt 560
Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys Pro Val
120 125 130

ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag cct gag ttg 608
Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro Glu Leu
135 140 145

gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc agg aca gtc 656
Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg Thr Val
150 155 160 165

aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac cgt aag gat 704
Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg Lys Asp
170 175 180

ES 2 593 002 T3

aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt aca gaa tat	752
Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr Glu Tyr	
185 190 195	
gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc tgg agt gac	800
Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp Ser Asp	
200 205 210	
tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa gct cca tgt ggc	848
Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro Cys Gly	
215 220 225	
ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag gcg gat gga aga agg	896
Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly Arg Arg	
230 235 240 245	
cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga gga gcc cca gtc cta gag	944
Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val Leu Glu	
250 255 260	
aaa aca ctt ggc tac aac ata tgg tac tat cca gaa agc aac act aac	992
Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn Thr Asn	
265 270 275	
ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag cag ctt gaa ctg cat ctg	1040
Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu His Leu	
280 285 290	
gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att tct tat aat tct ctt ggg	1088
Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser Leu Gly	
295 300 305	
aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca gct att caa gaa aaa tca	1136
Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu Lys Ser	
310 315 320 325	
ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc gtt gct gag gac cag cta	1184
Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp Gln Leu	
330 335 340	
gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac gtg aac act tgg atg att	1232

ES 2 593 002 T3

Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp Met Ile	
345	350
355	
gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc acc acc ctt tcc tgg gaa	1280
Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser Trp Glu	
360	365
370	
tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag caa gat aaa tta aaa	1328
Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys Leu Lys	
375	380
385	
cct ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca atg ttg cat gac aaa	1376
Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His Asp Lys	
390	395
400	405
gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc aaa gaa ggc gtt cca	1424
Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly Val Pro	
410	415
420	
tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac att ggc gtg aag acg gtc	1472
Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys Thr Val	
425	430
435	
acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt gag aga aag ggt atc atc	1520
Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly Ile Ile	
440	445
450	
tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gga ttc tcc	1568
Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly Phe Ser	
455	460
465	
aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac ggc ctg gag tcc ctg aaa	1616
Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser Leu Lys	
470	475
480	485
cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc agc acc agt gct ggg	1664
Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser Ala Gly	
490	495
500	
gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca ttg tca ttc agt gtc	1712
Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe Ser Val	
505	510
515	

ES 2 593 002 T3

ttt gag att atc ctc ata act tct ctg att ggt gga ggc ctt ctt att	1760
Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly Leu Leu Ile	
520 525 530	
ctc att atc ctg aca gtg gca tat ggt ctc aaa aaa ccc aac aaa ttg	1808
Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro Asn Lys Leu	
535 540 545	
act cat ctg tgt tgg ccc acc gtt ccc aac cct gct gaa agt agt ata	1856
Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser Ser Ile	
550 555 560 565	
gcc aca tgg cat gga gat gat ttc aag gat aag cta aac ctg aag gag	1904
Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys Leu Asn Leu Lys Glu	
570 575 580	
tct gat gac tct gtg aac aca gaa gac agg atc tta aaa cca tgt tcc	1952
Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile Leu Lys Pro Cys Ser	
585 590 595	
acc ccc agt gac aag ttg gtg att gac aag ttg gtg gtg aac ttt ggg	2000
Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Gly	
600 605 610	
aat gtt ctg caa gaa att ttc aca gat gaa gcc aga acg ggt cag gaa	2048
Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala Arg Thr Gly Gln Glu	
615 620 625	
aac aat tta gga ggg gaa aag aat ggg act aga att ctg tct tcc tgc	2096
Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr Arg Ile Leu Ser Ser Cys	
630 635 640 645	
cca act tca ata taagtgtgga ctaaaatgcg agaaagggtgt cctgtggtct	2148
Pro Thr Ser Ile	
atgcaaatta gaaaggacat gcagagtttt ccaactagga agactgaatc tgtggcccca	2208
agagaaccat ctctgaagac tgggtatgtg gtcttttcca cacatggacc acctacggat	2268
gcaatctgta atgcatgtgc atgagaagtc tgttattaag tagagtgtga aacatgggtt	2328
atggtaatag gaacagcttt taaaatgctt ttgtatttgg gcctttcata caaaaaagcc	2388
ataataccat tttcatgtaa tgctatactt ctatactatt ttcattgtaat actatacttc	2448
tatactatitt tcatgtaata ctatacttct atactatitt catgtaatac tatacttcta	2508
tattaaagtt ttaccactc a	2529

<210> 46
 <211> 649
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 46

ES 2 593 002 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
 50 55 60
 His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser
 65 70 75 80
 Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile
 85 90 95
 Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr
 100 105 110
 Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe
 115 120 125
 Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp
 130 135 140
 Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu
 145 150 155 160
 Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala
 165 170 175
 Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln
 180 185 190
 Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser
 195 200 205
 Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu
 210 215 220
 Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu
 225 230 235 240
 Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly
 245 250 255
 Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro
 260 265 270
 Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln
 275 280 285

Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala
 305 310 315 320
 Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val
 325 330 335
 Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val
 340 345 350
 Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr
 355 360 365
 Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln
 370 375 380
 Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro
 385 390 395 400
 Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala
 405 410 415
 Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile
 420 425 430
 Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu
 435 440 445
 Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly
 450 455 460
 Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly
 465 470 475 480
 Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala
 485 490 495
 Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr
 500 505 510
 Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly
 515 520 525
 Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys
 530 535 540
 Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro
 545 550 555 560
 Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys
 565 570 575
 Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile
 580 585 590
 Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu
 595 600 605
 Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala
 610 615 620

ES 2 593 002 T3

ytngarwsny tnaarmgnaa racnwsntay athgtncarg tnatggcnws nacnwsngcn 1500
 ggnggnacna aygnnacnws nathaaytty aaracnytnw snTTYwsngt nttygarath 1560
 athytnatha cnwsnytnat hggngggngn ytnytnathy tnathathyt nacngtngcn 1620
 tayggnytna araarccnaa yaarytnacn cayytnngyt gccnacngt nccnaayccn 1680
 gongarwsnw snathgcnac ntggcayggn gaygayttya argayaaryt naayytnaar 1740
 garwsngayg aywsngtnaa yacngargay mgnathytna arccntgyws nacnccnwsn 1800
 gayaarytng tnathgayaa rytngtngtn aayttyggna aygtnytnc rgarathtty 1860
 acngaygarg cnmgnacngg ncargaraay aaytngngg gngaraaraa yggnacnmgn 1920
 athytnwsnw sntgyccnac nwsnath 1947

5 <210> 48
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 48

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

10 <210> 49
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC21195
 20 <400> 49
 gaggagacca taacccccga cag 23
 25 <210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC21196
 <400> 50
 catagctccc accacacgat ttt 23
 35 <210> 51
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC27900
 <400> 51
 gccccgtgag gttgtacgtt tgg 23
 45 <210> 52
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 593 002 T3

<400> 52

Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly
 1 5 10

5 <210> 53
 <211> 2903
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (497)...(2482)

15 <400> 53

tgaaaagaca	tgtgtgtgca	gtatgaaaat	tgagacagga	aggcagagtg	tcagcttgtt	60
ccacctcagc	tgggaatgtg	catcaggcaa	ctcaagtttt	tcaccacggc	atgtgtctgt	120
gaatgtccgc	aaaacattag	tttactctt	gtcgccaggt	tggagtacaa	tggcacgac	180
ttggctcact	gcaacctctg	cctcccgggt	tcaagcgatt	ctcctgcctc	agcctcccga	240
gtagctggga	ttacagttaa	caataatgca	atccatttcc	cagcataagt	gggtaagtgc	300
cactttgact	tgggctgggc	ttaaaagcac	aagaaaagct	cgcagacaat	cagagtggaa	360
acactcccac	atcttagtgt	ggataaatta	aagtccagat	tgttcttct	gtcctgactt	420
gtgctgtggg	aggtggagtt	gcctttgatg	caaatccttt	gagccagcag	aacatctgtg	480
gaacatcccc	tgatac atg	aag ctc tct	ccc cag cct	tca tgt gtt	aac ctg	532
	Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu					
	1 5 10					
ggg atg atg	tgg acc tgg	gca ctg tgg	atg ctc cct	tca ctc tgc	aaa	580

ES 2 593 002 T3

Gly	Met	Met	Trp	Thr	Trp	Ala	Leu	Trp	Met	Leu	Pro	Ser	Leu	Cys	Lys		
		15					20					25					
ttc	agc	ctg	gca	gct	ctg	cca	gct	aag	cct	gag	aac	att	tcc	tgt	gtc		628
Phe	Ser	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Cys	Val		
		30				35				40							
tac	tac	tat	agg	aaa	aat	tta	acc	tgc	act	tgg	agt	cca	gga	aag	gaa		676
Tyr	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Asn	Leu	Thr	Cys	Thr	Trp	Ser	Pro	Gly	Lys	Glu		
		45			50					55					60		
acc	agt	tat	acc	cag	tac	aca	gtt	aag	aga	act	tac	gct	ttt	gga	gaa		724
Thr	Ser	Tyr	Thr	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Arg	Thr	Tyr	Ala	Phe	Gly	Glu		
				65				70						75			
aaa	cat	gat	aat	tgt	aca	acc	aat	agt	tct	aca	agt	gaa	aat	cgt	gct		772
Lys	His	Asp	Asn	Cys	Thr	Thr	Asn	Ser	Ser	Thr	Ser	Glu	Asn	Arg	Ala		
			80					85					90				
tcg	tgc	tct	ttt	ttc	ctt	cca	aga	ata	acg	atc	cca	gat	aat	tat	acc		820
Ser	Cys	Ser	Phe	Phe	Leu	Pro	Arg	Ile	Thr	Ile	Pro	Asp	Asn	Tyr	Thr		
			95				100					105					
att	gag	gtg	gaa	gct	gaa	aat	gga	gat	ggt	gta	att	aaa	tct	cat	atg		868
Ile	Glu	Val	Glu	Ala	Glu	Asn	Gly	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Ser	His	Met		
		110				115					120						
aca	tac	tgg	aga	tta	gag	aac	ata	gcg	aaa	act	gaa	cca	cct	aag	att		916
Thr	Tyr	Trp	Arg	Leu	Glu	Asn	Ile	Ala	Lys	Thr	Glu	Pro	Pro	Lys	Ile		
					125		130				135				140		
ttc	cgt	gtg	aaa	cca	gtt	ttg	ggc	atc	aaa	cga	atg	att	caa	att	gaa		964
Phe	Arg	Val	Lys	Pro	Val	Leu	Gly	Ile	Lys	Arg	Met	Ile	Gln	Ile	Glu		
				145					150						155		
tgg	ata	aag	cct	gag	ttg	gcg	cct	gtt	tca	tct	gat	tta	aaa	tac	aca		1012
Trp	Ile	Lys	Pro	Glu	Leu	Ala	Pro	Val	Ser	Ser	Asp	Leu	Lys	Tyr	Thr		
			160					165							170		
ctt	cga	ttc	agg	aca	gtc	aac	agt	acc	agc	tgg	atg	gaa	gtc	aac	ttc		1060
Leu	Arg	Phe	Arg	Thr	Val	Asn	Ser	Thr	Ser	Trp	Met	Glu	Val	Asn	Phe		
		175					180								185		

ES 2 593 002 T3

gct aag aac cgt aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg Ala Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu 190 195 200	1108
cag cct ttt aca gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag Gln Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu 205 210 215 220	1156
tca aag ttc tgg agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag Ser Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu 225 230 235	1204
gaa gaa gct cca tgt ggc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct Glu Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala 240 245 250	1252
gag gcg gat gga aga agg cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga Glu Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg 255 260 265	1300
gga gcc cca gtc cta gag aaa aca ctt ggc tac aac ata tgg tac tat Gly Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr 270 275 280	1348
cca gaa agc aac act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag Pro Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln 285 290 295 300	1396
cag ctt gaa ctg cat ctg gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att Gln Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile 305 310 315	1444
tct tat aat tct ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca Ser Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro 320 325 330	1492
gct att caa gaa aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc Ala Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys 335 340 345	1540
gtt gct gag gac cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac Val Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp 350 355 360	1588

ES 2 593 002 T3

gtg aac act tgg atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc Val Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro 365 370 375 380	1636
acc acc ctt tcc tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc Thr Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile 385 390 395	1684
cag caa gat aaa tta aaa cct ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat Gln Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr 400 405 410	1732
cca atg ttg cat gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat Pro Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr 415 420 425	1780
gcc aaa gaa ggc gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac Ala Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn 430 435 440	1828
att ggc gtg aag acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt Ile Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser 445 450 455 460	1876
gag aga aag ggt atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa Glu Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu 465 470 475	1924
ggt gga aaa gga ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac Gly Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr 480 485 490	1972
ggc ctg gag tcc ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg Gly Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met 495 500 505	2020
gcc agc acc agt gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag Ala Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys 510 515 520	2068
aca ttg tca ttc agt gtc ttt gag att atc ctc ata act tct ctg att	2116

ES 2 593 002 T3

```

Thr Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile
525                               530                               535                               540

ggg gga ggc ctt ctt att ctc att atc ctg aca gtg gca tat ggt ctc      2164
Gly Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu
                               545                               550                               555

aaa aaa ccc aac aaa ttg act cat ctg tgt tgg ccc acc gtt ccc aac      2212
Lys Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn
                               560                               565                               570

cct gct gaa agt agt ata gcc aca tgg cat gga gat gat ttc aag gat      2260
Pro Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp
                               575                               580                               585

aag cta aac ctg aag gag tct gat gac tct gtg aac aca gaa gac agg      2308
Lys Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg
                               590                               595                               600

atc tta aaa cca tgt tcc acc ccc agt gac aag ttg gtg att gac aag      2356
Ile Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys
605                               610                               615                               620

ttg gtg gtg aac ttt ggg aat gtt ctg caa gaa att ttc aca gat gaa      2404
Leu Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu
                               625                               630                               635

gcc aga acg ggt cag gaa aac aat tta gga ggg gaa aag aat ggg act      2452
Ala Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr
                               640                               645                               650

aga att ctg tct tcc tgc cca act tca ata taagtgtgga ctaaaatgcg      2502
Arg Ile Leu Ser Ser Cys Pro Thr Ser Ile
                               655                               660

agaaaggtgt cctgtggtct atgcaaatta gaaaggacat gcagagtttt ccaactagga      2562
agactgaatc tgtggcccca agagaacat ctctgaagac tgggtatgtg gtcttttcca      2622
cacatggacc acctacggat gcaatctgta atgcatgtgc atgagaagtc tgttattaag      2682
tagagtgtga aaacatggtt atgtaatag gaacagcttt taaaatgctt ttgtatttgg      2742
gcctttcata caaaaaagcc ataataccat tttcatgtaa tgctatactt ctatactatt      2802
ttcatgtaat actatacttc tatactattt tcatgtaata ctatacttct atactatfff      2862
catgtaatac tatacttcta taitaaagtt ttaccactc a                               2903

```

<210> 54
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 54

5

ES 2 593 002 T3

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

ES 2 593 002 T3

Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu
 290 295 300
 His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu
 325 330 335
 Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp
 340 345 350
 Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp
 355 360 365
 Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser
 370 375 380
 Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys
 385 390 395 400
 Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His
 405 410 415
 Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly
 420 425 430
 Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys
 435 440 445
 Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly
 450 455 460
 Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly
 465 470 475 480
 Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser
 485 490 495
 Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser
 500 505 510
 Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe
 515 520 525
 Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly Leu
 530 535 540
 Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro Asn
 545 550 555 560
 Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser
 565 570 575
 Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys Leu Asn Leu
 580 585 590
 Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile Leu Lys Pro
 595 600 605
 Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu Val Val Asn
 610 615 620

ES 2 593 002 T3

aargtngara ayathggngt naaracngtn acnathacnt ggaargarat hccnaarwsn 1380
 garmgnaarg gnathathtg yaaytayacn athtttytayc argcngargg nggnaarggn 1440
 ttywsnaara cngtnaayws nwsnathytn cartayggny tngarwsnyt naarmgnaar 1500
 acnwsntaya thgtncargt natggcnwsn acnwsngcng gnggnacnaa yggnacnwsn 1560
 athaayttya aracnytnws nttysngtn ttygaratha thytnathac nwsnytnath 1620
 ggngggngny trytnathyt nathathytn acngtngcnt ayggnytnaa raarccnaay 1680
 aarytnacnc ayytntgytg gccnacngtn ccnaayccng cngarwsnws nathgcnacn 1740
 tggcayggng aygayttyaa ngayaarytn aayytnaarg arwsngayga ywsngtnaay 1800
 acngargaym gnathytnaa rccntgywsn acnccnwsng ayaarytngt nathgayaar 1860
 ytngtngtna aytyggnaa ygtnytnear garathttya cngaygargc nmgnacnggn 1920
 cargaraaya ayytnggngg ngaraaraay ggnacnmgna thytnwsnws ntgyccnacn 1980
 wsnath 1986

<210> 56
 <211> 2748
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

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

10

<400> 56

gatggggccc tgaatgttga tctgacagaa ttccagacca acctggtggt tattgtcctt 60
 ttcatctggt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaaggtgct gctgtccggg 120
 ctctcagaga aggcagtgct ggagcgcttc ctggcccggg tctcctccta ctgttcttgg 180
 tagcccagcc ttctcggggg ggaaggagaa gctgcccagg tgagctctga ggaagc atg 239
 Met
 1

ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac 287
 Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His
 5 10 15

gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg 335
 Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu
 20 25 30

tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act 383
 Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr
 35 40 45

aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act 431

ES 2 593 002 T3

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	ggt	gaa	gta	caa	gct	caa	aat	gga	gat	ggt	aaa	ggt	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	

ES 2 593 002 T3

aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtg act atg gag gaa gtt cca cat	959
Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro His	
230 235 240	
gtc ctg gac ctg tgg aga att ctg gaa cca gca gac atg aac gga gac	1007
Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly Asp	
245 250 255	
agg aag gtg cga ttg ctg tgg aag aag gca aga gga gcc ccc gtc ttg	1055
Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val Leu	
260 265 270	
gag aaa aca ttt ggc tac cac ata cag tac ttt gca gag aac agc act	1103
Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser Thr	
275 280 285	
aac ctc aca gag ata aac aac atc acc acc cag cag tat gaa ctg ctt	1151
Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu Leu	
290 295 300 305	
ctg atg agc cag gca cac tct gtg tcc gtg act tct ttt aat tct ctt	1199
Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser Leu	
310 315 320	
ggc aag tcc caa gag acc atc ctg agg atc cca gat gtc cat gag aag	1247
Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu Lys	
325 330 335	
acc ttc cag tac att aag agc atg cag gcc tac ata gcc gag ccc ctg	1295
Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro Leu	
340 345 350	
ttg gtg gtg aac tgg caa agc tcc att cct gcg gtg gac act tgg ata	1343
Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp Ile	
355 360 365	
gtg gag tgg ctc cca gaa gct gcc atg tcg aag ttc cct gcc ctt tcc	1391
Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu Ser	
370 375 380 385	
tgg gaa tct gtg tct cag gtc acg aac tgg acc atc gag caa gat aaa	1439
Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp Lys	
390 395 400	

ES 2 593 002 T3

cta aaa cct ttc aca tgc tat aat ata tca gtg tat cca gtg ttg gga Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu Gly 405 410 415	1487
cac cga gtt gga gag ccg tat tca atc caa gct tat gcc aaa gaa gga His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly 420 425 430	1535
act cca tta aaa ggt cct gag acc agg gtg gag aac atc ggt ctg agg Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu Arg 435 440 445	1583
aca gcc acg atc aca tgg aag gag att cct aag agt gct agg aat gga Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn Gly 450 455 460 465	1631
ttt atc aac aat tac act gta ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gaa Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Glu 470 475 480	1679
ctc tcc aag act gtt aac tct cat gcc ctg cag tgt gac ctg gag tct Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu Ser 485 490 495	1727
ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg 500 505 510	1775
gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile 515 520 525	1823
agt gtg ttt gaa att gtc ctt cta aca tct cta gtt gga gga ggc ctt Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu 530 535 540 545	1871
ctt cta ctt agc atc aaa aca gtg act ttt ggc ctc aga aag cca aac Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro Asn 550 555 560	1919
cgg ttg act ccc ctg tgt tgt cct gat gtt ccc aac cct gct gaa agt	1967

ES 2 593 002 T3

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
ctccttcacg	cagagaccag	gactagagcg	gattcctcat	ggtttgccag	gctcctcagt											2382
ccttgctcgg	gctcaggatc	ttcaacaatg	ccctttctgg	gacactccat	catccactta											2442
tatttatatt	ttgcaacatt	gtggattgaa	cccagggact	tgtttatgcg	cgcaacttca											2502
gtaactgtgg	cagagactta	ggaatggaga	tctgaccctt	tcgagaaggt	ttctggacat											2562
ccgtccctgt	gtgagcctca	gacagcattg	tctttacttt	gaatcagett	ccaagttaat											2622
aaaagaaaaa	cagagaggtg	gcataacagc	tctgcttcc	tgacctgctt	gagttccagt											2682
tctgacttcc	tttggatg	aacagcaatg	tggaagtgt	aagctgaata	aacccttcc											2742
tcccca																2748

<210> 57
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 57

5

ES 2 593 002 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

ES 2 593 002 T3

Lys Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro
 340 345 350
 Leu Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp
 355 360 365
 Ile Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu
 370 375 380
 Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp
 385 390 395 400
 Lys Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu
 405 410 415
 Gly His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu
 420 425 430
 Gly Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu
 435 440 445
 Arg Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn
 450 455 460
 Gly Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys
 465 470 475 480
 Glu Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu
 485 490 495
 Ser Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr
 500 505 510
 Arg Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser
 515 520 525
 Ile Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Gly
 530 535 540
 Leu Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro
 545 550 555 560
 Asn Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu
 565 570 575
 Ser Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met
 580 585 590
 Lys Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro
 595 600 605
 Cys Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu
 610 615 620
 Asn Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala
 625 630 635 640
 Ser Ile Leu Gly Gly Glu Ala Asn Glu Tyr Ile Leu Ser Gln Glu Pro
 645 650 655
 Ser Cys Pro Gly His Cys
 660

<210> 58
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC6673
 5
 <400> 58
 gcgcaagggtg ccgttcacag c 21
 <210> 59
 10 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29082
 <400> 59
 caattgttg ggttttta gcagcagtag gcccg 36
 20 <210> 60
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29083
 <400> 60
 30 ctgggcctac tgctgctaaa aaaaccaac aaattg 36
 <210> 61
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29145
 <400> 61
 40 gcgtctagag ggttatattg aagttgggca ggaaga 36
 <210> 62
 <211> 33
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29359
 50 <400> 62
 gcgggatcca tgaagctctc tccccagcct tca 33
 <210> 63
 <211> 23
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC27899
 60 <400> 63
 ccagaacttt gactccttga ccg 23
 <210> 64
 65 <211> 23
 <212> ADN

ES 2 593 002 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC27895

5 <400> 64
gaagtcaact tcgctaagaa ccg 23

10 <210> 65
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC29122

<400> 65
ccgctcgagt tatattgaag ttggcagga agac 34

20 <210> 66
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC29451

<400> 66
ccggaattcc cctgatacat gaagctctct ccc 33

30 <210> 67
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC29124

40 <400> 67
cgcgatccc tcaagacac tgaatgacaa tgt 33

45 <210> 68
<211> 2295
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polinucleótido que codifica la fusión zcytor17-Fc4 humano

50 <221> CDS
<222> (1)...(2295)

<400> 68

atg aag ctc tct ccc cag cct tca tgt gtt aac ctg ggg atg atg tgg 48
Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp
1 5 10 15

acc tgg gca ctg tgg atg ctc cct tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca 96
Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala
20 25 30

55

ES 2 593 002 T3

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

ES 2 593 002 T3

Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr	
195	200
205	
gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc tgg	672
Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp	
210	215
220	
agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa gct cca	720
Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro	
225	230
235	240
tgt ggc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag gcg gat gga	768
Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly	
245	250
255	
aga agg cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga gga gcc cca gtc	816
Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val	
260	265
270	
cta gag aaa aca ctt ggc tac aac ata tgg tac tat cca gaa agc aac	864
Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn	
275	280
285	
act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag cag ctt gaa ctg	912
Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu	
290	295
300	
cat ctg gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att tct tat aat tct	960
His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser	
305	310
315	320
ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca gct att caa gaa	1008
Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu	
325	330
335	
aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc gtt gct gag gac	1056
Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp	
340	345
350	
cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac gtg aac act tgg	1104
Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp	
355	360
365	

ES 2 593 002 T3

atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc acc acc ctt tcc	1152
Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser	
370 375 380	
tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag caa gat aaa	1200
Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys	
385 390 395 400	
tta aaa ccc ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca atg ttg cat	1248
Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His	
405 410 415	
gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc aaa gaa ggc	1296
Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly	
420 425 430	
gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac att ggc gtg aag	1344
Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys	
435 440 445	
acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt gag aga aag ggt	1392
Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly	
450 455 460	
atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gga	1440
Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly	
465 470 475 480	
ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac ggc ctg gag tcc	1488
Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser	
485 490 495	
ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc agc acc agt	1536
Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser	
500 505 510	
gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca ttg tca ttc	1584
Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe	
515 520 525	
agt gtc ttt gag gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc cca	1632

ES 2 593 002 T3

Ser	Val	Phe	Glu	Glu	Pro	Arg	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
530						535					540					
ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	gcc	gag	ggg	gca	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	1680
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
545					550					555					560	
ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	1728
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
				565					570						575	
aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	1776
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	
			580					585							590	
aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	1824
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
		595					600						605			
cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	1872
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	
	610						615						620			
gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	1920
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	
	625					630					635				640	
tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	tcc	tcc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	1968
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	
				645						650					655	
aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	2016
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
			660						665						670	
gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	2064
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	
		675					680								685	
ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	2112
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	
	690						695								700	

ES 2 593 002 T3

gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc 2160
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 705 710 715 720

ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag 2208
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 725 730 735

ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac 2256
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 740 745 750

tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa 2295
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *
 755 760

<210> 69
 <211> 764
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido de fusión Zcytor17-Fc4 humano

10

<400> 69

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

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

ES 2 593 002 T3

Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly
 465 470 475 480
 Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser
 485 490 495
 Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser
 500 505 510
 Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe
 515 520 525
 Ser Val Phe Glu Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 530 535 540
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
 545 550 555 560
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 565 570 575
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 580 585 590
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 595 600 605
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 610 615 620
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 625 630 635 640
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 645 650 655
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 660 665 670
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 675 680 685
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 690 695 700
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 705 710 715 720
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 725 730 735
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 740 745 750
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 755 760

<210> 70
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29157

10

<400> 70
 ctagtatggc cggccatgaa gctctctccc cagc 34

5 <210> 71
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29150

<400> 71
 gtctgaagat ctgggctcct caaagacact gaatgacaat g 41

15 <210> 72
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29180

<400> 72
 cctggagtcc ctgaaacgaa ag 22

25 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28917

<400> 73
 tgcaagatgc tggattgac 20

40 <210> 74
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC29179

45 <400> 74
 gcagggttgg gaacggtgg 19

<210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28916

<400> 75
 agtcaattcc agcatcttgc 20

55 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28918

65 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC28918

<400> 76
 tcacagagtc atcagactcc 20

5 <210> 77
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC38065

<400> 77
 ctttctggg aatctgtgc t 21

15 <210> 78
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC38068

<400> 78
 cctccagctc tggtgctg 18

25 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC10651

<400> 79
 agcttttctg cagcagctct 20

35 <210> 80
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC10565

45 <400> 80
 tttgcagaaa aggttgcaaa tgc 23

50 <210> 81
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial del cebador oligonucleotídico ZC

55 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC37877

<400> 81
 caaaaaacc aacaaattga ctca 24

60 <210> 82
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial del cebador oligonucleotídico ZC

65 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC37876

<400> 82
 catgtggcta tactactttc agcag 25

5 <210> 83
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial del cebador oligonucleotidico ZC

10 <220>
 <223> Sonda TaqMan® de zcytor17 del cebador oligonucleotidico ZC37776

15 <400> 83
 ctgtgttggc ccaccgttc ca 22

20 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial del cebador oligonucleotidico ZC

25 <220>
 <223> cebador directo de ARNr

30 <400> 84
 cggctaccac atccaaggaa 20

35 <210> 85
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial del cebador oligonucleotidico ZC

40 <220>
 <223> cebador inverso de ARNr

45 <400> 85
 gctggaatta cgcggct 18

50 <210> 86
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial del cebador oligonucleotidico ZC

55 <220>
 <223> sonda TaqMan® de ARNr

60 <400> 86
 tgctgcacc agactgccc tc 22

65 <210> 87
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial del cebador oligonucleotidico ZC

<220>
 <223> Cebador oligonucleotidico ZC22276

<400> 87
 gctgcccct cagcatgtag a 21

<210> 88
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotidico ZC38239

ES 2 593 002 T3

```

<400> 88
gccgactaag ccagagaac          19

5
<210> 89
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10
<220>
<223> Cebador oligonucleotidico ZC38245

<400> 89
ctgttgacag ttctgaaccg        20

15
<210> 90
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20
<220>
<223> Cebador oligonucleotidico ZC38238

<400> 90
cgcggttcc attgtatctg        20

25
<210> 91
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30
<220>
<223> Péptido etiqueta Glu-Glu modificado

35
<400> 91

          Gly Ser Glu Tyr Met Pro Met Glu
          1           5

40
<210> 92
<211> 2728
<212> ADN
<213> Mus musculus

45
<220>
<221> CDS
<222> (237)...(1877)

<400> 92

gatggggccc tgaatgttga tctgacagaa ttccagacca acctggtggt tattgtcctt      60
ttcatctggt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaaggtgct gctgtccggg      120
ctctcagaga aggcagtgct ggaggcgttc ctggcccggg tctcctccta ctgttcctgg      180
tagcccagcc ttctcggggg ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg      239
                                         Met
                                         1

ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac      287

```

ES 2 593 002 T3

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			

ES 2 593 002 T3

cgg ttc aga act gtc aac agt agc cgc tgg acg gaa gtc aat ttt gaa	815
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu	
180 185 190	
aac tgt aaa cag gtc tgc aac ctc aca gga ctt cag gct ttc aca gaa	863
Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr Glu	
195 200 205	
tat gtc ctg gct cta cga ttc agg ttc aat gac tca aga tat tgg agc	911
Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp Ser	
210 215 220 225	
aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtg act atg gag gaa gtt cca cat	959
Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro His	
230 235 240	
gtc ctg gac ctg tgg aga att ctg gaa cca gca gac atg aac gga gac	1007
Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly Asp	
245 250 255	
agg aag gtg cga ttg ctg tgg aag aag gca aga gga gcc ccc gtc ttg	1055
Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val Leu	
260 265 270	
gag aaa aca ttt ggc tac cac ata cag tac ttt gca gag aac agc act	1103
Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser Thr	
275 280 285	
aac ctc aca gag ata aac aac atc acc acc cag cag tat gaa ctg ctt	1151
Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu Leu	
290 295 300 305	
ctg atg agc cag gca cac tct gtg tcc gtg act tct ttt aat tct ctt	1199
Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser Leu	
310 315 320	
ggc aag tcc caa gag acc atc ctg agg atc cca gat gtc cat gag aag	1247
Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu Lys	
325 330 335	
acc ttc cag tac att aag agc atg cag gcc tac ata gcc gag ccc ctg	1295
Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro Leu	
340 345 350	

ES 2 593 002 T3

ttg gtg gtg aac tgg caa agc tcc att cct gcg gtg gac act tgg ata	1343
Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp Ile	
355 360 365	
gtg gag tgg ctc cca gaa gct gcc atg tcg aag ttc cct gcc ctt tcc	1391
Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu Ser	
370 375 380 385	
tgg gaa tct gtg tct cag gtc acg aac tgg acc atc gag caa gat aaa	1439
Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp Lys	
390 395 400	
cta aaa cct ttc aca tgc tat aat ata tca gtg tat cca gtg ttg gga	1487
Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu Gly	
405 410 415	
cac cga gtt gga gag ccg tat tca atc caa gct tat gcc aaa gaa gga	1535
His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly	
420 425 430	
act cca tta aaa ggt cct gag acc agg gtg gag aac atc ggt ctg agg	1583
Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu Arg	
435 440 445	
aca gcc acg atc aca tgg aag gag att cct aag agt gct agg aat gga	1631
Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn Gly	
450 455 460 465	
ttt atc aac aat tac act gta ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gaa	1679
Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Glu	
470 475 480	
ctc tcc aag act gtt aac tct cat gcc ctg cag tgt gac ctg gag tct	1727
Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu Ser	
485 490 495	
ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga	1775
Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg	
500 505 510	
gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc	1823

ES 2 593 002 T3

Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile
 515 520 525

agt gag tac tgg ctt cag gcc tca ttc tgg agt tta ctt cgg gtt gga 1871
 Ser Glu Tyr Trp Leu Gln Ala Ser Phe Trp Ser Leu Leu Arg Val Gly
 530 535 540 545

aat gtt tgacaggagc aaggagagcc agcagagggc agcagagcat ggettctcct 1927
 Asn Val

gctctctctg gctcactcac ctcccaggag ttactgagga gctggcaaag ggagggctga 1987
 gttagaccaa caggccattt tgatccttgc tggttaagcag ccacaaataa tcttaagatg 2047
 aagcaagcaa catccacttc agcctcagcc acgtcaaagg ctggtgcctg agctcacact 2107
 ggccagttcc taaatgtcag gagttgtgca atagaacctg ggaaggaaca actggttgat 2167
 cagaggtcac tgacaagga cttaatgtta ccactcgcgg tggggctttt gtttcgtttt 2227
 gtttgtttgt tatgtgtatt caacttatca gcttttacgt tgaaaacatg aaaagcaaga 2287
 caaatttggt agatatcaca tataatgtga aatataatag ttaataatt gagtaggaaa 2347
 gctgagggca tgtaatagac agagggaaaa gaagaggaaa gccagtctgg tctacaaagt 2407
 gagttccagg acagccaggg ctacatggag aaacctgtc tcaatcaatc aatcaatcaa 2467
 tcaatcagtc aatcaatcaa aattcaagca gcattgacaa gttttgcaat aactactata 2527
 aaccaaaaaa gtcactctga tgtatctcag aagcccctg ttatttatgt tcctgaagac 2587
 taaagtagac cgtggctctg agaaccatga gcaagataac acgttctgtc ctgcagccta 2647
 acaatgcctt cttggtattc tttttgatac aacttctaaa ataacttttt tttaaaaaaa 2707
 ataaaaatca tgttacagct a 2728

<210> 93
 <211> 547
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 93

5

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 Gln Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu
 50 55 60
 Thr Cys Thr Trp Arg Pro Gln Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile
 65 70 75 80

10

ES 2 593 002 T3

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 Gln 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

ES 2 593 002 T3

Gly His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu
 420 425 430
 Gly Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu
 435 440 445
 Arg Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn
 450 455 460
 Gly Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys
 465 470 475 480
 Glu Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu
 485 490 495
 Ser Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr
 500 505 510
 Arg Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser
 515 520 525
 Ile Ser Glu Tyr Trp Leu Gln Ala Ser Phe Trp Ser Leu Leu Arg Val
 530 535 540
 Gly Asn Val
 545

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido se selecciona del grupo de:

- 5 (a) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 (Met) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;
- (b) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;
- 10 (c) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 544 (Lys) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;
- (d) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 - 239 de la SEQ ID NO: 22;
- (e) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 227 (Pro) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;
- 15 (f) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 (Met) a 649 (Ile) como se muestra en la SEQ ID NO: 46; y
- (g) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 - 324 de la SEQ ID NO: 18.

2. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- 20 (i) los restos de aminoácidos 1-732 de la SEQ ID NO: 2;
- (ii) los restos de aminoácidos 20-732 de la SEQ ID NO: 2;
- (iii) los restos de aminoácidos 544-732 de la SEQ ID NO: 2; y
- 25 (iv) los restos de aminoácidos 1-239 de la SEQ ID NO: 22.

3. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1 (c), en el que el polipéptido comprende adicionalmente un dominio transmembrana que consiste en los restos 520 (Ile) a 543 (Leu) de la SEQ ID NO: 2.

4. Un polinucleótido aislado, en el que la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido se selecciona del grupo de:

- 30 (a) una secuencia de polinucleótidos que comprende los restos de nucleótidos 1 a 2402 como se muestra en la SEQ ID NO: 1;
- (b) una secuencia de polinucleótidos que comprende los restos de nucleótidos 1 a 2366 como se muestra en la SEQ ID NO: 1;
- 35 (c) una secuencia de polinucleótidos que comprende los restos de nucleótidos 171 a 2366 como se muestra en la SEQ ID NO: 1;
- (d) una secuencia de polinucleótidos que comprende los restos de nucleótidos 228 a 2366 como se muestra en la SEQ ID NO: 1;
- 40 (e) una secuencia de polinucleótidos que comprende los restos de nucleótidos 1800 a 2366 como se muestra en la SEQ ID NO: 1;
- (f) una secuencia de polinucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 21;
- (g) una secuencia de polinucleótidos que consiste en los restos de nucleótidos 228 a 851 como se muestra en la SEQ ID NO: 1;
- 45 (h) una secuencia de polinucleótidos que consiste en los restos de nucleótidos 162 a 2108 como se muestra en la SEQ ID NO: 45;
- (i) una secuencia de polinucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 17; y
- (j) una secuencia de polinucleótidos complementaria a de (a) a (i).

5. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: un promotor de la transcripción, un segmento de ADN que codifica un polipéptido y un terminador de la transcripción, en donde el promotor, el segmento de ADN y el terminador están unidos operativamente; y en donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado se selecciona del grupo que consiste en:

- 55 (i) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;
- (ii) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2; y
- 60 (iii) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 227 (Pro) como se muestra en la SEQ ID NO: 2.

6. Un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el polipéptido codificado es como se define en (i) o (ii), y en donde el vector de expresión comprende adicionalmente una secuencia señal secretora unida operativamente al segmento de ADN.

7. Un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6 en el que la secuencia señal secretora comprende los

restos de aminoácidos 1-19 de la SEQ ID NO: 2.

8. Una célula cultivada que comprende un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN.

9. Una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión, en donde la construcción de ADN comprende:

(i) un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido se selecciona del grupo de:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

(b) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 544 (Lys) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

(c) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2; y

(d) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 227 (Pro) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

y
(ii) otro segmento de ADN que codifica un polipéptido adicional, en el que el polipéptido adicional es una proteína heteróloga seleccionada de:

(a) una región o un dominio de otra proteína de la familia de receptores de citocina humana;

(b) un péptido señal secretor no nativo y/o no relacionado que facilita la secreción de la proteína de fusión; y

(c) una etiqueta de afinidad seleccionada de una proteína de unión a maltosa o un dominio de inmunoglobulina;

en la que dichos primer y otros segmentos de ADN codifican la proteína de fusión.

10. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: un promotor de la transcripción, una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión de acuerdo con la Reivindicación 9 y un terminador de la transcripción, en donde el promotor está unido operativamente a la construcción de ADN y la construcción de ADN está unida operativamente al terminador de la transcripción.

11. Una célula cultivada que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la célula expresa el polipéptido codificado por la construcción de ADN.

12. Un método de producción de una proteína de fusión, que comprende cultivar una célula de acuerdo con la reivindicación 11 y aislar el polipéptido producido por la célula.

13. Un polipéptido aislado, en donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido se selecciona del grupo de:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 (Met) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

(b) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

(c) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 544 (Lys) a 732 (Val) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

(d) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1-239 de la SEQ ID NO: 22;

(e) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 227 (Pro) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

(f) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 (Met) a 649 (Ile) como se muestra en la SEQ ID NO: 46; y

(g) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1-324 de la SEQ ID NO: 18.

14. Un polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

(i) los restos de aminoácidos 1-732 de la SEQ ID NO: 2;

(ii) los restos de aminoácidos 20-732 de la SEQ ID NO: 2;

(iii) los restos de aminoácidos 544-732 de la SEQ ID NO: 2; y

(iv) los restos de aminoácidos 1-239 de la SEQ ID NO: 22.

15. Un polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 13(c), en donde el polipéptido comprende adicionalmente un dominio transmembrana que consiste en los restos 520 (Ile) a 543 (Leu) de la SEQ ID NO: 2.

16. Un método de producción de un polipéptido que comprende cultivar la célula de acuerdo con la reivindicación 8 y aislar el polipéptido producido por la célula.
- 5 17. Un método de producción de un anticuerpo no humano contra un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 13 o 14, en el que el polipéptido suscita una respuesta inmunitaria en un animal no humano inoculado para producir un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido, y en el que el anticuerpo puede aislarse del animal no humano.
- 10 18. Un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15.
19. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18, que se une específicamente a un polipéptido que consiste en los restos de aminoácidos 20-732 de la SEQ ID NO: 2.
- 15 20. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 18 o 19, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
21. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 18 o 19, en donde el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
- 20 22. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo monoclonal está humanizado.
- 25 23. Un método de detección, en una muestra de ensayo, de la presencia de un modulador de actividad de las proteínas de receptores de citocina, que comprende: cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la célula expresa la proteína codificada por el segmento de ADN en presencia y en ausencia de una muestra de ensayo, y comparar los niveles de la actividad de la proteína en presencia y en ausencia de una muestra de ensayo mediante un ensayo biológico o bioquímico, y determinar, a partir de la comparación, la presencia de un modulador de la actividad de las proteínas en la muestra de ensayo.
- 30 24. Un método para detectar un ligando de receptores de citocina en una muestra de ensayo, que comprende:
poner en contacto una muestra de ensayo con un polipéptido, en donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido se selecciona del grupo de:
- 35 (a) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1-239 de la SEQ ID NO: 22;
(b) la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1-324 de la SEQ ID NO: 18;
(c) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 (Ala) a 227 (Pro) como se muestra en la SEQ ID NO: 2;
- y detectar en la muestra la unión de dicho polipéptido a un ligando.
- 40 25. Un método de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el polipéptido está unido a membrana en el interior de una célula cultivada y la etapa de detección comprende medir una respuesta biológica en la célula cultivada.
- 45 26. Un método de acuerdo con la reivindicación 25, en el que la respuesta biológica es una proliferación celular o una activación de la transcripción de un gen indicador.
27. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado es como se define en (b).
- 50 28. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1(b), en donde el polipéptido codificado consiste en los restos de aminoácidos 20-732 de la SEQ ID NO: 2.
29. Un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado es como se define en (i).
- 55 30. Una construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado es como se define en (i)(a).

ES 2 593 002 T3

	1		50
SEQ ID NO:46	MMWTWALWML	PSLCKFSLAA LPAKPENISC	VYYRKNLTC TWSPGKETS
SEQ ID NO:18	MMWTWALWML	PSLCKFSLAA LPAKPENISC	VYYRKNLTC TWSPGKETS
SEQ ID NO:2	MMWTWALWML	PSLCKFSLAA LPAKPENISC	VYYRKNLTC TWSPGKETS
SEQ ID NO:22	MMWTWALWML	PSLCKFSLAA LPAKPENISC	VYYRKNLTC TWSPGKETS
	51		100
SEQ ID NO:46	TQYTVKRTYA	FGEKHDNCTT NSSTSENRAS	CSFFLPRITI PDNYTIEVEA
SEQ ID NO:18	TQYTVKRTYA	FGEKHDNCTT NSSTSENRAS	CSFFLPRITI PDNYTIEVEA
SEQ ID NO:2	TQYTVKRTYA	FGEKHDNCTT NSSTSENRAS	CSFFLPRITI PDNYTIEVEA
SEQ ID NO:22	TQYTVKRTYA	FGEKHDNCTT NSSTSENRAS	CSFFLPRITI PDNYTIEVEA
	101		150
SEQ ID NO:46	ENGDGVKSH	MTYWRLNIA KTEPPKIFRV	KPVLGIKMI QIEWIKPELA
SEQ ID NO:18	ENGDGVKSH	MTYWRLNIA KTEPPKIFRV	KPVLGIKMI QIEWIKPELA
SEQ ID NO:2	ENGDGVKSH	MTYWRLNIA KTEPPKIFRV	KPVLGIKMI QIEWIKPELA
SEQ ID NO:22	ENGDGVKSH	MTYWRLNIA KTEPPKIFRV	KPVLGIKMI QIEWIKPELA
	151		200
SEQ ID NO:46	PVSSDLKYTL	RFRTVNSTSW MEVNFANRK	DKNQTYNLTG LQPFTEYVIA
SEQ ID NO:18	PVSSDLKYTL	RFRTVNSTSW MEVNFANRK	DKNQTYNLTG LQPFTEYVIA
SEQ ID NO:2	PVSSDLKYTL	RFRTVNSTSW MEVNFANRK	DKNQTYNLTG LQPFTEYVIA
SEQ ID NO:22	PVSSDLKYTL	RFRTVNSTSW MEVNFANRK	DKNQTYNLTG LQPFTEYVIA
	201		250
SEQ ID NO:46	LRCVAVKESKF	WSDWSQEKMG MTEEEAPCGL	ELWRVLKPAE ADGRRPVRL
SEQ ID NO:18	LRCVAVKESKF	WSDWSQEKMG MTEEEAPCGL	ELWRVLKPAE ADGRRPVRL
SEQ ID NO:2	LRCVAVKESKF	WSDWSQEKMG MTEEEAPCGL	ELWRVLKPAE ADGRRPVRL
SEQ ID NO:22	LRCVAVKESKF	WSDWSQEKMG MTEEEGKL.L	PAIPVLSALV ~~~~~
	251		300
SEQ ID NO:46	WKKARGAPVL	EKTLGYNIWY YPESNTNLTE	TMNTTNQQL LHLGGESFW
SEQ ID NO:18	WKKARGAPVL	EKTLGYNIWY YPESNTNLTE	TMNTTNQQL LHLGGESFW
SEQ ID NO:2	WKKARGAPVL	EKTLGYNIWY YPESNTNLTE	TMNTTNQQL LHLGGESFW
SEQ ID NO:22	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	301		350
SEQ ID NO:46	SMISYNSLGK	SPVATLRIPA IQEKSFCIE	VMQACVAEDQ LVVWKQSSAL
SEQ ID NO:18	SMISYNSLGK	SPVATLRIPA IQEK~~~~~	~~~~~
SEQ ID NO:2	SMISYNSLGK	SPVATLRIPA IQEKSFCIE	VMQACVAEDQ LVVWKQSSAL
SEQ ID NO:22	~~~~~	~~~~~	~~~~~

FIG. 1A

	351				400
SEQ ID NO:46	DVNTWMIWF	PDVDSEPTTL	SWESVSQATN	WTIQQDKLKP	FWCYNISVYP
SEQ ID NO:18	-----	-----	-----	-----	-----
SEQ ID NO:2	DVNTWMIWF	PDVDSEPTTL	SWESVSQATN	WTIQQDKLKP	FWCYNISVYP
SEQ ID NO:22	-----	-----	-----	-----	-----
	401				450
SEQ ID NO:46	MLHDKVGEPY	SIQAYAKEGV	PSEGPETKVE	NIGVKTVTIT	WKEIPKSERK
SEQ ID NO:18	-----	-----	-----	-----	-----
SEQ ID NO:2	MLHDKVGEPY	SIQAYAKEGV	PSEGPETKVE	NIGVKTVTIT	WKEIPKSERK
SEQ ID NO:22	-----	-----	-----	-----	-----
	451				500
SEQ ID NO:46	GIICNYTIFY	QAEGGKGFSK	TVNSSILQYG	LESLKRKTSY	IVQVMASTSA
SEQ ID NO:18	-----	-----	-----	-----	-----
SEQ ID NO:2	GIICNYTIFY	QAEGGKGFSK	TVNSSILQYG	LESLKRKTSY	IVQVMASTSA
SEQ ID NO:22	-----	-----	-----	-----	-----
	501				550
SEQ ID NO:46	GGTNGTSINF	KTLSFSVFEI	ILITSLIGGG	LLILIILTVA	YGLKKPNKLT
SEQ ID NO:18	-----	-----	-----	-----	-----
SEQ ID NO:2	GGTNGTSINF	KTLSFSVFEI	ILITSLIGGG	LLILIILTVA	YGLKKPNKLT
SEQ ID NO:22	-----	-----	-----	-----	-----
	551				600
SEQ ID NO:46	HLCWPTVPNP	AESSIATWHG	DDFKDKLNLK	ESDDSVNTED	RILKPCSTPS
SEQ ID NO:18	-----	-----	-----	-----	-----
SEQ ID NO:2	HLCWPTVPNP	AESSIATWHG	DDFKDKLNLK	ESDDSVNTED	RILKPCSTPS
SEQ ID NO:22	-----	-----	-----	-----	-----
	601				650
SEQ ID NO:46	DKLVIDKLVV	NFGNVLQEIF	TDEARTGQEN	NLGGEKNGTR	ILSSCPTSI~
SEQ ID NO:18	-----	-----	-----	-----	-----
SEQ ID NO:2	DKLVIDKLVV	NFGNVLQEIF	TDEARTGQEN	NLGGEKNGYV	TCPFRPDCPL
SEQ ID NO:22	-----	-----	-----	-----	-----
	651				700
SEQ ID NO:46	-----	-----	-----	-----	-----
SEQ ID NO:18	-----	-----	-----	-----	-----
SEQ ID NO:2	GKSFEELPVS	PEIPPRKSQY	LRSRMPEGTR	PEAKEQLLFS	GQSLVPDHLC
SEQ ID NO:22	-----	-----	-----	-----	-----

FIG. 1B

	701			733
SEQ ID NO:46	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~
SEQ ID NO:18	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~
SEQ ID NO:2	EEGAPNPYLK	NSVTAREFLV	SEKLPEHTKG	EV~
SEQ ID NO:22	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~

FIG. 1C