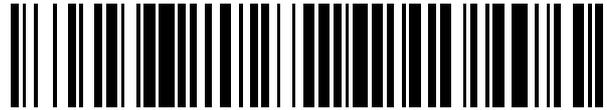


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 483**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| C12N 15/24 | (2006.01) |
| C07K 14/54 | (2006.01) |
| C07K 16/24 | (2006.01) |
| C12Q 1/68 | (2006.01) |
| G01N 33/68 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.1998 E 09156327 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2100959**

54 Título: **Citocina de mamífero: interleucina-B30 y agentes relacionados**

30 Prioridad:

25.07.1997 US 900905

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

27.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BAZAN, J. FERNANDO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 610 483 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

Citocina de mamífero: interleucina-B30 y agentes relacionados

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones relacionadas con proteínas que funcionan en el control de la biología y la fisiología de las células de mamífero, por ejemplo, células de un sistema inmune de mamífero. En particular, proporciona genes purificados, proteínas, anticuerpos y reactivos relacionados útiles para regular, por ejemplo, la activación, el desarrollo, la diferenciación y la función de diferentes tipos celulares, incluyendo células hematopoyéticas.

Antecedentes de la invención

La tecnología de ADN recombinante se refiere en general a la técnica de integrar información genética procedente de una fuente donante en vectores para su procesamiento posterior, tal como a través de la introducción en un hospedador, mediante el cual la información genética transferida se copia y/o expresa en el nuevo entorno. Comúnmente, la información genética existe en forma de ADN complementario (ADNc) derivado del ARN mensajero (ARNm) que codifica un producto proteico deseado. El transportador es frecuentemente un plásmido que tiene la capacidad de incorporar el ADNc para su replicación posterior en un hospedador y, en algunos casos, de controlar realmente la expresión del ADNc y dirigir de este modo la síntesis del producto codificado en el hospedador.

Durante algún tiempo se ha sabido que la respuesta inmune de los mamíferos está basada en una serie de interacciones celulares complejas, lo que se denomina "la red inmune". Una investigación reciente ha proporcionado una nueva visión acerca del funcionamiento interno de esta red. Aunque queda claro que gran parte de la respuesta gira, de hecho, alrededor de interacciones similares a una red de linfocitos, macrófagos, granulocitos y otras células, los inmunólogos mantienen actualmente en general la opinión de que las proteínas solubles conocidas como linfocinas, citocinas o monocinas, desempeñan una función crítica en el control de estas interacciones celulares. Existe por tanto un considerable interés en el aislamiento, la caracterización y los mecanismos de acción de factores moduladores celulares, una comprensión de los cuales dará lugar a avances significativos en el diagnóstico y la terapia de numerosas anomalías médicas, por ejemplo, de enfermedades del sistema inmune. Algunos de estos factores son factores de crecimiento hematopoyéticos, por ejemplo, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Véase, por ejemplo, Thomson (1994; ed.) *The Cytokine Handbook* (2ª ed.) Academic Press, San Diego; Metcalf y Nicola (1995) *The Hematopoietic Colony Stimulating Factors* Cambridge University Press; y Aggarwal y Gutterman (1991) *Human Cytokines* Blackwell Pub. Ito et al. (Pig STAT2 cDNA entrada de la base de datos de la EMBL SSAB4061, N° de Acceso AB004061, 1997) describen una secuencia para pigSTAT2.

Las linfocinas median aparentemente actividades celulares de una variedad de formas. Se ha demostrado que apoyan la proliferación, el crecimiento y la diferenciación de células madre hematopoyéticas pluripotenciales en un gran número de progenitores que comprenden diversos linajes celulares que constituyen un sistema inmune complejo. Son necesarias interacciones correctas y equilibradas entre los componentes celulares para obtener una respuesta inmune sana. Los diferentes linajes celulares a menudo responden de manera diferente cuando se administran linfocinas junto con otros agentes.

Los linajes celulares especialmente importantes para el sistema inmune incluyen dos clases de linfocitos: las células B que pueden producir y secretar inmunoglobulinas (proteínas que tienen la capacidad de reconocer y unirse a materiales extraños para llevar a cabo su eliminación), y las células T de varios subgrupos que secretan linfocinas e inducen o suprimen a las células B y a diversas otras células (incluyendo otras células T) que constituyen la red inmune. Estos linfocitos interactúan con muchos otros tipos celulares.

Otro linaje celular importante está constituido por el del mastocito (que no ha sido identificado positivamente en todas las especies de mamífero), que es una célula de tejido conectivo que contiene gránulos situada próxima a los capilares por todo el organismo. Estas células se encuentran en concentraciones especialmente elevadas en los pulmones, la piel y los tractos gastrointestinal y genitourinario. Los mastocitos desempeñan un papel fundamental en las enfermedades relacionadas con la alergia, particularmente en la anafilaxis, según sigue: cuando antígenos seleccionados se entrecruzan con una clase de inmunoglobulinas unidas a receptores en la superficie de los mastocitos, los mastocitos se desgranulan y liberan mediadores, por ejemplo, histamina, serotonina, heparina y prostaglandinas, que producen reacciones alérgicas, por ejemplo, anafilaxis.

La investigación para conocer mejor y tratar las diferentes enfermedades inmunes ha estado dificultada por la incapacidad general para mantener células del sistema inmune *in vitro*. Los inmunólogos han descubierto que el cultivo de estas células puede ser llevado a cabo mediante la utilización de sobrenadantes de células T y de sobrenadantes de otras células, que contienen diferentes factores de crecimiento, incluyendo muchas de las linfocinas.

A partir de todo lo anterior es evidente que el descubrimiento y el desarrollo de nuevas linfocinas, por ejemplo

relacionadas con G-CSF y/o IL-6, podría contribuir a nuevas terapias para un amplio rango de afecciones degenerativas o anormales que implican directamente o indirectamente a las células del sistema inmune y/o a las células hematopoyéticas. En particular, sería muy ventajoso el descubrimiento y el desarrollo de linfocinas que incrementaran o potenciaran las actividades beneficiosas de las linfocinas conocidas. En el presente documento se divulgan nuevas composiciones de interleucinas y compuestos relacionados, así como métodos para su utilización.

Sumario de la invención

La presente invención está dirigida a la interleucina-B30 (IL-B30) de mamífero, por ejemplo, de roedores, canina, felina, de primate, y a sus actividades biológicas. En el presente documento se divulgan ácidos nucleicos que codifican los propios polipéptidos y métodos para su producción y utilización. Los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento se caracterizan, en parte, por su homología con secuencias de ADN complementario (ADNc) clonadas incluidas en el presente documento, y/o por ensayos funcionales para determinar actividades similares a las de factores de crecimiento o a las de citocinas, por ejemplo, G-CSF (véase, Nagata (1994) en Thomson The Cytokine Handbook 2ªed., Academic Press, San Diego) y/o IL-6 (véase, Hirano (1994) en Thomson The Cytokine Handbook 2ªed., Academic Press, San Diego), aplicados a los polipéptidos que están codificados típicamente por estos ácidos nucleicos. Se divulgan métodos para modular o intervenir en el control de una respuesta fisiológica o una respuesta inmune dependientes de un factor de crecimiento.

La presente invención está basada en parte en el descubrimiento de una nueva secuencia de citocina que presenta una similitud de secuencia y estructural significativa con G-CSF e IL-6. En particular, en el presente documento se divulga un gen de primate, por ejemplo, humano, que codifica una proteína cuyo tamaño maduro es de aproximadamente 168 aminoácidos y secuencias de cerdo y murinas, por ejemplo, de ratón. Se encontrarán disponibles equivalentes funcionales que muestren una homología de secuencia significativa a partir de otras especies de mamífero, por ejemplo, vaca, caballo y rata y especies no de mamífero. La IL-B30 puede comprender una secuencia madura de la tabla 1; o puede mostrar un patrón de modificación postraducciona distinto del de la IL-B30 natural; o la proteína o el péptido: puede proceder de un animal de sangre caliente seleccionado entre un mamífero, incluyendo un primate; puede comprender al menos un segmento de polipéptido de SEQ ID NO: 2; puede mostrar una diversidad de porciones que muestran la identidad; puede ser una variante alélica natural de IL-B30; puede tener una longitud de al menos aproximadamente 30 aminoácidos; puede mostrar al menos dos epítomos no solapantes que son específicos para una IL-B30 de mamífero; puede mostrar una identidad de secuencia de al menos el 90% a lo largo de al menos 20 aminoácidos con IL-B30 de mamífero; puede estar glucosilada; puede tener un peso molecular de al menos 10 kDa con glucosilación natural; puede ser un polipéptido sintético; puede estar unido a un sustrato sólido; está conjugado a otro resto químico; puede tener una sustitución quintuple o menor respecto de la secuencia natural; puede ser una variante de eliminación o inserción respecto de una secuencia natural. En el presente documento se divulga una composición que comprende: una proteína o péptido de IL-B30 estéril; o la proteína o péptido de IL-B30 y un portador, en donde el portador es: un compuesto acuoso incluyendo agua, suero salino y/o tampón; y/o se formula para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral. En el presente documento se divulgan proteínas de fusión en las que la proteína puede tener: la secuencia de proteína madura de la tabla 1; una etiqueta de detección o purificación, incluyendo una secuencia FLAG, His6 o Ig; y/o la secuencia de otra citocina o quimiocina.

En el presente documento se divulgan compuestos de unión en los que el compuesto puede tener un sitio de unión antigénico de un anticuerpo, que se une específicamente a una proteína IL-B30 natural, en donde: la IL-B30 puede ser una proteína de mamífero; el compuesto de unión puede ser un fragmento Fv, Fab o Fab2; el compuesto de unión puede estar conjugado a otro resto químico; o el anticuerpo: puede generarse contra una secuencia peptídica de un polipéptido maduro de la tabla 1; puede generarse contra una IL-B30 madura; puede generarse contra una IL-B30 purificada de roedor; puede inmunoseleccionarse; puede ser un anticuerpo policlonal; puede unirse a una IL-B30 desnaturalizada, puede mostrar una Kd de al menos 30 μ M; puede estar unido a un sustrato sólido, incluyendo una perla o una membrana de plástico; puede estar en una composición estéril; o puede etiquetarse de manera detectable, incluyendo una etiqueta fluorescente o radiactiva. En el presente documento se divulgan kits que contienen compuestos de unión, incluyendo aquellos con: un compartimento que comprende el compuesto de unión; y/o instrucciones para el uso o desechado de reactivos en el kit. A menudo, el kit puede ser capaz de producir un análisis cualitativo o cuantitativo. Las composiciones pueden comprender: un compuesto de unión estéril; o el compuesto de unión y un portador, en donde el portador es: un compuesto acuoso, incluyendo agua, suero salino y/o tampón; y/o formularse para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral.

La invención se define en las reivindicaciones.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan por referencia con el mismo alcance que en caso de que cada publicación individual o solicitud de patente estuviese indicada específica e individualmente como incorporada por referencia.

I. General

5 En el presente documento se divulgan secuencias de aminoácidos y secuencias de ADN que codifican varias proteínas de mamífero que son citocinas, por ejemplo que son moléculas secretadas que pueden mediar una señal entre células inmunes u otras células. Véase, por ejemplo, Paul (1994) Fundamental Immunology (3ª ed.) Raven Press, N.Y. Las citocinas de longitud completa, y los fragmentos, o los antagonistas serán útiles en la modulación fisiológica de células que expresen un receptor. Es probable que IL-B30 tenga efectos estimulantes o inhibidores sobre células hematopoyéticas, incluyendo por ejemplo células linfoides tales como células T, células B, linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos, células dendríticas, progenitores hematopoyéticos, etc. Las proteínas serán también útiles como antígenos, por ejemplo inmunógenos, para la producción de anticuerpos hacia varios epítopos de la proteína, epítopos lineales y conformacionales.

10 Se identificó un ADNc que codifica IL-B30 procedente de una línea celular humana. La molécula fue denominada huIL-B30. Se identificó también un gen relacionado correspondiente a una secuencia de cerdo. Se describe también una secuencia de roedor, por ejemplo, de ratón.

15 El gen humano codifica una proteína soluble pequeña similar a citocina, de 168 aminoácidos aproximadamente. La secuencia señal es probablemente de 21 restos aproximadamente y se extendería desde la Met hasta la Ala aproximadamente. Véase la Tabla 1 y las SEQ ID NO: 1 y 2. La IL-B30 presenta motivos estructurales característicos de los miembros de las citocinas de cadena larga. Compárense, por ejemplo, las secuencias de IL-B30, G-CSF e IL-6 disponibles en GenBank. Véase también la Tabla 2.

Tabla 1: Ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) que codifica IL-B30 de un primate, por ejemplo, un humano. La secuencia de aminoácidos traducida es la SEQ ID NO: 2.

25 Tabla 1: Ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) que codifica IL-B30 de un primate, por ejemplo, ser humano. La secuencia de aminoácidos traducida es la SEQ ID NO: 2.

ES 2 610 483 T3

ATG CTG GGG AGC AGA GCT GTA ATG CTG CTG TTG CTG CTG CCC TGG ACA
 48
 Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr
 -21 -20 -15 -10

 GCT CAG GGC AGA GCT GTG CCT GGG GGC AGC AGC CCT GCC TGG ACT CAG
 96
 Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln
 -5 1 5 10

 TGC CAG CAG CTT TCA CAG AAG CTC TGC ACA CTG GCC TGG AGT GCA CAT
 144
 Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His
 15 20 25

 CCA CTA GTG GGA CAC ATG GAT CTA AGA GAA GAG GGA GAT GAA GAG ACT
 192
 Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr
 30 35 40

 ACA AAT GAT GTT CCC CAT ATC CAG TGT GGA GAT GGC TGT GAC CCC CAA
 240
 Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln
 45 50 55

 GGA CTC AGG GAC AAC AGT CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CAC CAG GGT
 288
 Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly
 60 65 70 75

 CTG ATT TTT TAT GAG AAG CTG CTA GGA TCG GAT ATT TTC ACA GGG GAG
 336
 Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu
 80 85 90

 CCT TCT CTG CTC CCT GAT AGC CCT GTG GCG CAG CTT CAT GCC TCC CTA
 384
 Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Ala Gln Leu His Ala Ser Leu
 95 100 105

 CTG GGC CTC AGC CAA CTC CTG CAG CCT GAG GGT CAC CAC TGG GAG ACT
 432
 Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr
 110 115 120

 CAG CAG ATT CCA AGC CTC AGT CCC AGC CAG CCA TGG CAG CGT CTC CTT
 480
 Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu
 125 130 135
 CTC CGC TTC AAA ATC CTT CGC AGC CTC CAG GCC TTT GTG GCT GTA GCC
 528
 Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala
 140 145 150 155

 GCC CGG GTC TTT GCC CAT GGA GCA GCA ACC CTG AGT CCC TAA
 570
 Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
 160 165

Secuencia codificante:

ES 2 610 483 T3

ATGCTGGGGA GCAGAGCTGT AATGCTGCTG TTGCTGCTGC CCTGGACAGC
 TCAGGGCAGA GCTGTGCCTG GGGGCAGCAG CCCTGCCTGG ACTCAGTGCC
 AGCAGCTTTC ACAGAAGCTC TGCACACTGG CCTGGAGTGC ACATCCACTA
 GTGGGACACA TGGATCTAAG AGAAGAGGGA GATGAAGAGA CTACAAATGA
 TGTTCCCCAT ATCCAGTGTG GAGATGGCTG TGACCCCCAA GGACTCAGGG
 ACAACAGTCA GTTCTGCTTG CAAAGGATCC ACCAGGGTCT GATTTTTTAT
 GAGAAGCTGC TAGGATCGGA TATTTTCACA GGGGAGCCTT CTCTGCTCCC
 TGATAGCCCT GTGGCGCAGC TTCATGCCTC CCTACTGGGC CTCAGCCAAC
 TCCTGCAGCC TGAGGGTCCAC CACTGGGAGA CTCAGCAGAT TCCAAGCCTC
 AGTCCCAGCC AGCCATGGCA GCGTCTCCTT CTCCGCTTCA AAATCCTTCG
 CAGCCTCCAG GCCTTTGTGG CTGTAGCCGC CCGGGTCTTT GCCCATGGAG
 CAGCAACCCT GAGTCCCTAA

IL-B30 de roedor, por ejemplo, ratón (SEQ ID NO: 3 y 4):

CGCTTAGAAG TCGGACTACA GAGTTAGACT CAGAACCAAA GGAGGTGGAT AGGGGGTCCA 60
 CAGGCCTGGT GCAGATCACA GAGCCAGCCA GATCTGAGAA GCAGGGAACA AG ATG 115
 Met
 -21
 CTG GAT TGC AGA GCA GTA ATA ATG CTA TGG CTG TTG CCC TGG GTC ACT 163
 Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val Thr
 -20 -15 -10 -5
 CAG GGC CTG GCT GTG CCT AGG AGT AGC AGT CCT GAC TGG GCT CAG TGC 211
 Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys
 1 5 10
 CAG CAG CTC TCT CGG AAT CTC TGC ATG CTA GCC TGG AAC GCA CAT GCA 259
 Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala
 15 20 25
 CCA GCG GGA CAT ATG AAT CTA CTA AGA GAA GAA GAG GAT GAA GAG ACT 307
 Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr
 30 35 40
 AAA AAT AAT GTG CCC CGT ATC CAG TGT GAA GAT GGT TGT GAC CCA CAA 355
 Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln
 45 50 55 60
 GGA CTC AAG GAC AAC AGC CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CGC CAA GGT 403
 Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly
 65 70 75
 CTG GCT TTT TAT AAG CAC CTG CTT GAC TCT GAC ATC TTC AAA GGG GAG 451
 Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu
 80 85 90

ES 2 610 483 T3

| | |
|---|------|
| CCT GCT CTA CTC CCT GAT AGC CCC ATG GAG CAA CTT CAC ACC TCC CTA | 499 |
| Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu | |
| 95 100 105 | |
| CTA GGA CTC AGC CAA CTC CTC CAG CCA GAG GAT CAC CCC CGG GAG ACC | 547 |
| Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr | |
| 110 115 120 | |
| CAA CAG ATG CCC AGC CTG AGT TCT AGT CAG CAG TGG CAG CGC CCC CTT | 595 |
| Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu | |
| 125 130 135 140 | |
| CTC CGT TCC AAG ATC CTT CGA AGC CTC CAG GCC TTT TTG GCC ATA GCT | 643 |
| Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala | |
| 145 150 155 | |
| GCC CGG GTC TTT GCC CAC GGA GCA GCA ACT CTG ACT GAG CCC TTA GTG | 691 |
| Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val | |
| 160 165 170 | |
| CCA ACA GCT TAAGGATGCC CAGGTTCCCA TGGCTACCAT GATAAGACTA | 740 |
| Pro Thr Ala | |
| 175 | |
| ATCTATCAGC CCAGACATCT ACCAGTTAAT TAACCCATTA GGACTTGTGC TGTTCCTTGT | 800 |
| TCGTTTGT | |
| TCGTTTGT TCGTGAAGG GCAAGGACAC CATTATTAAA GAGAAAAGAA ACAAACCCCA | 860 |
| GAGCAGGCAG CTGGCTAGAG AAAGGAGCTG GAGAAGAAGA ATAAAGTCTC GAGCCCTTGG | 920 |
| CCTTGGAAGC GGGCAAGCAG CTGCGTGGCC TGAGGGGAAG GGGCGGTGG CATCGAGAAA | 980 |
| CTGTGAGAAA ACCCAGAGCA TCAGAAAAG TGAGCCCAGG CTTTGCCAT TATCTGTAAG | 1040 |
| AAAAACAAGA AAAGGGGAAC ATTATACTTT CCTGGGTGGC TCAGGGAAAT GTGCAGATGC | 1100 |
| ACAGTACTCC AGACAGCAGC TCTGTACCTG CCTGCTCTGT CCCTCAGTTC TAACAGAATC | 1160 |
| TAGTCACTAA GAACCTAACAG GACTACCAAT ACGAACTGAC AAA | 1203 |

Tabla 2: Comparación de varias realizaciones de IL-6 y G-CSF comparadas con IL-B30. La IL-B30 humana es la SEQ ID NO: 2; la IL-B30 de ratón es la SEQ ID NO: 4; la IL-B30 de cerdo es la SEQ ID NO: 5; el G-CSF bovino es la SEQ ID NO: 6; el G-CSF felino es la SEQ ID NO: 7; el G-CSF humano es la SEQ ID NO: 8; el G-CSF de ratón es la SEQ ID NO: 9; La IL-6 de nutria es la SEQ ID NO: 10; la IL-6 felina es la SEQ ID NO: 11; la IL-6 humana es la SEQ ID NO: 12; la IL-6 de oveja es la SEQ ID NO: 13; la IL-6 de ratón es la SEQ ID NO: 14; el MGF de pollo es la SEQ ID NO: 15 y una IL-6 vírica, del virus del herpes del sarcoma de Kaposi, KSHV, es la SEQ ID NO: 16.

| | |
|----------------|--|
| il30_humana |VPGG SSPVWTQCQQ LSQKLC.LA WSAHPLVG.. |
| il30_ratón |VPRS SSPDWAQCQQ LSRNLCM.LA WNAHAPAG.. |
| il30_cerdo | |
| 15 gcsf_bovino |TPLG P.....AR SLPQSFLKLC LEQVRKIQAD GAELQERL.. |
| gcsf_felino |TPLG P.....TS SLPQSFLKLC LEQVRKVQAD GTALQERL.. |
| gcsf_humano |TPLG P.....AS SLPQSFLKLC LEQVRKIQGD GAALQEKLVS |
| gcsf_ratón | VPLVTVSALP P.....SL PLPRSFLKLS LEQVRKIQAS GSVLLEQL.. |
| 20 il6_nutria | .AFPTPGPLG GDSKDDATSN RPPLTSADKM EDFIKFILGK ISALRNEM.. |
| il6_felina | .AFPTPGPLG G....DATSN RLPLTPADKM EELIKYILGK ISALKKEM.. |
| il6_humana | .AFPAPVPPG EDSKDVAAPH RQPLTSSERI DKQIRYILDG ISALRKET.. |
| il6_oveja | .AFPTPGPLG EDFKNDTPS RLLLTPEKT EALIKHIVDK ISAIRKEI.. |
| il6_ratón | .AFPTSQVRR GDFTEDTPN R.PVYTTSQV GGLITHVLWE IVEMRKEL.. |
| mgf_pollo |APLAELSGD HDFQLFLHKN LEFTRKIRGD VAALQRAV.. |
| 25 il6_khsv |TRG KLPDAPEFEK DILLIQRNLNM LWVIDEFCFRD |
| il30_humana | .HMD.LREEG DEETTNDVPH I...QCGDGC DPQGLRDNSQ FCLQRIHQGL |
| il30_ratón | .HMNLLREEE DEETKNNVPR I...QCEDGC DPQGLKDNSQ FCLQRIHQGL |
| il30_cerdo | SCLQRIHQGL |
| 30 gcsf_bovino | .CAA.HKLCH PEELMLLRHS LGIP.QAPLS SCSSQSLQLR GCLNQLHGGL |

ES 2 610 483 T3

```

gcsf_felino      .CAA.HKLCH PEELVLLGHA LGIP.QAPLS SCSSQALQLT GCLRQLHSGL
gcsf_humano      ECAT.YKLCH PEELVLLGHS LGIP.WAPLS SCPSQALQLA GCLSQLHSGL
gcsf_ratón       .CAT.YKLCH PEELVLLGHS LGIP.KASLS GCSSQALQQT QCLSQLHSGL
5  il6_nutria      .CDK.YNKCE DSKEVLAENN LNLPKLAEKD RCFQSRFNQE TCLTRITTGL
   il6_felina      .CDN.YNKCE DSKEALAENN LNLPKLAEKD GCFQSGFNQE TCLTRITTGL
   il6_humana      .CNK.SNMCE SSKEALAENN LNLPKMAEKD GCFQSGFNQE TCLVKIITGL
   il6_oveja       .CEK.NDECE NSKETLAENK LKLPKMEEKD GCFQSGFNQA ICLIKTTAGL
   il6_ratón       .CNG.NSDCM NNDDALAENN LKLPEIQRND GCYQTGYNQE ICLLKISSGL
10 mgf_pollo       .CDT.FQLCT EEELQLVQPD PHLV.QAPLD QCHKRGFQAE VCFTQIRAGL
   il6_khsv        LCYR.TGICK GILEPAAIFH LKLPAINDTD HCGLIGFNET SCLKKLADGF

il30_humana      IFYEKLLGSD IFTGE..... .PSLLPDSPV AQLHASLLGL SQLLOPE..G
il30_ratón       AFYKHLSDSD IFKGE..... .PALLPDSPM EQLHTSLLGL RQLLOPE..D
15 il30_cerdo       VFYEKLLGSD IFTGE..... .PSLHPDGSV GQLHASLLGL RQLLOPE..G
gcsf_bovino      FLYQGLLQAL AGIS..... .PELAPTLDT LQLDVTDFAT NIWLQMEDLG
gcsf_felino      FLYQGLLQAL AGIS..... .PELAPTLDM LQLDITDFAI NIWQQMEDVG
gcsf_humano      FLYQGLLQAL EGIS..... .PELGPTLDT LQLDVADFAT TIWQQMEELG
gcsf_ratón       CLYQGLLQAL SGIS..... .PALAPTLDL LQLDVANFAT TIWQQMENLG
20 il6_nutria      QEFQIHLKYL ESNYEG...N KDNAHSVYIS TKHLLQTLRP M..NQIEVTT
   il6_felina      QEFQIYLKFL QDKYEG...D KENAKSVYTS TNVLLQMLKR KGKNQDEVTTI
   il6_humana      LEFEVYLEYL QNRFES...S EEQARAVQMS TKVLIQFLQK KAKNLDAITT
   il6_oveja       LEYQIYLDLFL QNEFEG...N QETVMELQSS IRTLIQILKE KIAGL...I
   il6_ratón       LEYHSYLEYM KNNLKDN..K KDKARVLQRD TETLIHIFNQ EVKDLHKIVL
25 mgf_pollo       HAYHDSLGAV LRLLP..... .NHTTLVET LQLDAANLSS NIQQQMEDLG
   il6_khsv        FEFEVLFKFL TTEFGKSVIN VDMELLTKT LGWDIQEELN KLTKTHY..S

il30_humana      HHWETQQIP. .SLSPSQ..P WQRLLLRFKI LRSLQAFVAV AARVFAHGAA
il30_ratón       HPRETQQMP. .SLSSSQ..Q WQRPLLRSKI LRSLQAFVAV AARVFAHGAA
30 il30_cerdo       HHWETEQTP. .SPSPSQ..P WQRLLLRKI LRSLQAFVAV AARVFAHGAA
gcsf_bovino      AAPAVQPTQ. .GAMPTFTSA FQRRAGGVLV ASQLHRFLEL AYRGLRYLAE
gcsf_felino      MAPAVPPTQ. .GTMPFTTSA FQRRAGGTLV ASNLQSFLEV AYRALRHFTK
gcsf_humano      MAPALQPTQ. .GAMPAFASA FQRRAGGVLV ASHLQSFLEV SYRVLRHHLAQ
gcsf_ratón       VAPTVQPTQ. .SAMPFTSA FQRRAGGVLV ISYLQGFLET ARLALHHLA
35 il6_nutria      PDPTTDASL. .QALFKSQDK WLKHTTIHLI LRRLEDFLQF SLRAIRIM..
   il6_felina      PVPTVEVGL. .QLSCSHR.R VAEAHNNHLT LRRLEDFLQL RLRAVRIM..
   il6_humana      PDPTTNASL. .LTKLQAQNG WLQDMTTHLI LRSFKFEFLQS SLRALRQM..
   il6_oveja       TTPATHTDM. .LEKMQSSNE WVKNAKVIII LRSLENFLQF SLRAIRMK..
   il6_ratón       PTPISNALL. .TDKLESQKE WLRTKTIQFI LKSLEEFKLV TLRSTRQT..
40 mgf_pollo       LDTVTLPAEQ RSPPTFSGP FQQQVGGFFI LANFQRFLET AYRALRHLAR
   il6_khsv        P.PKFDRG.. LLGRLQGLKY WVRHFASFYV LSAMEKFAGQ AVRVLDSIPD

il30_humana      TLSP...
il30_ratón       TLTEPLVPTA
45 il30_cerdo       TLSQ...
gcsf_bovino      P.....
gcsf_felino      P.....
gcsf_humano      P.....
gcsf_ratón       .....
50 il6_nutria      .....
   il6_felina      .....
   il6_humana      .....
   il6_oveja       .....
   il6_ratón       .....
55 mgf_pollo       L.....
   il6_khsv        VTPDVHDK

```

La homología estructural de IL-B30 con proteínas citocinas relacionadas sugiere una función relacionada de esta molécula. La IL-B30 es una citocina de cadena larga que presenta una similitud de secuencias con IL-6 y G-CSF.

60 Los agonistas, o antagonistas, de IL-B30 pueden actuar también como antagonistas funcionales o del receptor, por ejemplo, bloqueando la unión de IL-6 o G-CSF a sus receptores respectivos, o mediando las acciones opuestas. Así, IL-B30 o sus antagonistas pueden ser útiles en el tratamiento de condiciones médicas anormales, incluyendo enfermedades inmunes, por ejemplo, deficiencias inmunes de las células T, inflamación crónica o rechazo de tejidos, o en condiciones cardiovasculares o neurofisiológicas.

65 Los antígenos naturales son capaces de mediar varias respuestas bioquímicas que dan lugar a respuestas biológicas o fisiológicas en las células diana. La variante caracterizada en el presente documento es de humano,

pero existen en la naturaleza equivalentes de otros primates o de otras especies. Estarán también disponibles secuencias de proteínas adicionales de otras especies de mamífero, por ejemplo, primates, caninos, felinos y roedores. Véase más adelante. Las descripciones siguientes están dirigidas, con fines ilustrativos, a IL-B30 humana, pero son aplicables de igual modo a variantes relacionadas de otras especies.

5

II. IL-B30 Purificada

La secuencia de aminoácidos de la IL-B30 humana se divulga en el presente documento en la SEQ ID NO: 2. Otros ácidos nucleicos existentes en la naturaleza que codifican la proteína pueden aislarse mediante procedimientos estándar utilizando la secuencia proporcionada, por ejemplo mediante técnicas de PCR o mediante hibridación. Estas secuencias de aminoácidos, proporcionadas desde el extremo amino hasta el carboxi, son importantes para proporcionar información sobre la secuencia de la citocina, permitiendo distinguir la proteína antigénica de otras proteínas y ejemplificar numerosas variantes. Además, las secuencias peptídicas permiten la preparación de péptidos para generar anticuerpos que reconozcan dichos segmentos, y las secuencias de nucleótidos permiten la preparación de sondas de oligonucleótidos, siendo ambas estrategias para la detección o el aislamiento, por ejemplo la clonación, de los genes que codifican dichas secuencias.

Tal como se usa en el presente documento, el término "IL-B30 soluble humana" incluirá, cuando se utiliza en el contexto de proteínas, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido soluble mostrado en la SEQ ID NO: 2, o fragmentos significativos de la misma. En el presente documento se describen también polipéptidos que contienen una pluralidad de segmentos distintos, por ejemplo no solapantes, de la longitud especificada. Típicamente, la pluralidad será de al menos dos, más habitualmente de al menos tres y, preferiblemente de 5, 7 o incluso más segmentos. Aunque se describe la longitud mínima, longitudes mayores de diferentes tamaños pueden ser adecuadas, por ejemplo uno de longitud 7 y dos de longitud 12.

25

Los componentes de unión, por ejemplo anticuerpos, se unen típicamente a la IL-B30 con una alta afinidad, por ejemplo de al menos aproximadamente 100 nM, normalmente mejor de aproximadamente 30 nM, preferiblemente mejor de aproximadamente 10 nM y, más preferiblemente, mejor de aproximadamente 3 nM. En especies de mamíferos distintas de humano se encontrarán proteínas homólogas, por ejemplo en otros primates, ungulados o roedores. Las especies que no sean de mamíferos podrían poseer también genes y proteínas estructuralmente o funcionalmente relacionadas, por ejemplo aves o anfibios.

30

El término "polipéptido", tal como se usa en el presente documento incluye un fragmento o segmento significativo y abarca un tramo de restos de aminoácidos de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, generalmente de al menos aproximadamente 12 aminoácidos, típicamente de al menos aproximadamente 16 aminoácidos, preferiblemente de al menos aproximadamente 20 aminoácidos y, en realizaciones particularmente preferidas, de al menos aproximadamente 30 aminoácidos o más, por ejemplo 35, 40, 45, 50, etc. Tales fragmentos pueden tener extremos que comiencen y/o terminen en virtualmente todas las posiciones, por ejemplo, que empiecen en los restos 1, 2, 3, etc., y que finalicen en, por ejemplo, 150, 149, 148, etc., en todas las combinaciones prácticas. Los péptidos particularmente interesantes tienen extremos que corresponden a límites de dominios estructurales, por ejemplo, hélices A, B, C y/o D. Véase la Tabla 1.

35

40

El término "composición de unión" se refiere a moléculas que se unen específicamente a IL-B30, por ejemplo en una interacción anticuerpo-antígeno. La especificidad puede ser más o menos inclusiva, por ejemplo pueden ser específicas para una variante particular, o para grupos de variantes relacionadas, por ejemplo, primates, roedores, etc. Incluye también compuestos, por ejemplo proteínas, que se asocian específicamente con IL-B30, incluyendo una interacción proteína-proteína natural fisiológicamente relevante, covalente o no covalente. La molécula puede ser un polímero o un reactivo químico. Un análogo funcional puede ser una proteína con modificaciones estructurales, o puede ser una molécula que tenga una forma molecular que interactúe con los determinantes de unión adecuados. Los compuestos pueden actuar como agonistas o antagonistas de una interacción de unión con el receptor. Véase, por ejemplo, Goodman et al. (eds.) Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics (edición actual) Pergamon Press.

45

50

Sustancialmente pura, por ejemplo en un contexto de proteínas, significa típicamente que la proteína está libre de otras proteínas, de otros ácidos nucleicos o de otros compuestos biológicos contaminantes derivados del organismo de origen. La pureza puede analizarse mediante métodos estándar, típicamente en peso y será normalmente al menos aproximadamente un 40% pura, generalmente al menos aproximadamente un 50% pura, a menudo al menos aproximadamente un 60% pura, típicamente al menos aproximadamente un 80% pura, preferiblemente al menos aproximadamente un 90% pura y, en las realizaciones más preferidas, al menos aproximadamente un 95% pura. A menudo se añadirán vehículos o excipientes.

55

60

La solubilidad de un polipéptido o de un fragmento depende del entorno y del polipéptido. Muchos parámetros afectan a la solubilidad de un polipéptido incluyendo la temperatura, el entorno electrolítico, el tamaño y las características moleculares del polipéptido y la naturaleza del disolvente. Típicamente, la temperatura a la cual se utiliza el polipéptido varía desde aproximadamente 4°C hasta aproximadamente 65°C. Normalmente la temperatura de utilización es superior a aproximadamente 18°C. Para fines de diagnóstico, la temperatura estará normalmente

65

próxima a la temperatura ambiente o superior, pero será menor que la temperatura de desnaturalización de los componentes del ensayo. Para fines terapéuticos, la temperatura será normalmente la temperatura corporal, típicamente de aproximadamente 37°C para humanos y ratones, aunque en ciertas condiciones la temperatura puede aumentarse o reducirse *in situ* o *in vitro*.

5 El tamaño y la estructura del polipéptido estarán generalmente en un estado sustancialmente estable y no estarán normalmente en estado desnaturalizado. El polipéptido puede estar asociado con otros polipéptidos en una estructura cuaternaria, por ejemplo para conferir solubilidad, o estar asociado con lípidos o detergentes.

10 El disolvente y los electrolitos serán normalmente un tampón biológicamente compatible del tipo utilizado para la conservación de las actividades biológicas, y se aproximarán normalmente a un disolvente acuoso fisiológico. Normalmente el disolvente tendrá un pH neutro, típicamente entre aproximadamente 5 y 10, y preferiblemente de aproximadamente 7,5. En algunas ocasiones, se añadirán uno o más detergentes, típicamente uno suave no desnaturalizante, por ejemplo CHS (hemisuccinato de colesterilo) o CHAPS (sulfonato de 3-[3-colamidopropil]dimetilamonio]-1-propano), o a una concentración suficientemente baja como para evitar una alteración significativa de las propiedades estructurales o fisiológicas de la proteína. En otros casos, puede utilizarse un detergente fuerte para llevar a cabo una desnaturalización significativa.

20 III. Variantes Físicas

Se describen en el presente documento proteínas o péptidos que poseen una identidad de secuencia de aminoácidos sustancial con la secuencia de aminoácidos del antígeno IL-B30. Las variantes incluyen variantes de especie, polimórficas o alélicas.

25 La homología de secuencias de aminoácidos, o la identidad de secuencias, se determina optimizando las coincidencias de restos, si es necesario, mediante la introducción de huecos según se requiera. Véase también Needleham et al. (1970) J. Mol. Biol., 48:443-453; Sankoff et al. (1983) Capítulo Uno en Time Warps, String Editores, y Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison, Addison-Wesley, Reading, MA; y los paquetes de programas de ordenador de IntelliGenetics, Mountain View, CA; y del University of Wisconsin Genetics-Computer Group, Madison, WI. La identidad de secuencias cambia cuando se consideran sustituciones conservativas como coincidencias. Las sustituciones conservativas incluyen típicamente sustituciones dentro de los grupos siguientes: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparragina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. La conservación puede afectar a las características biológicas, a las características funcionales o a las características estructurales. Las secuencias de aminoácidos homólogas tienen la intención de incluir típicamente variaciones polimórficas o alélicas naturales y variaciones interespecie de una secuencia de proteínas. Las proteínas o péptidos homólogos típicos tendrán desde un 25-100% de identidad (si pueden introducirse huecos) hasta un 50-100% de identidad (si se incluyen sustituciones conservativas) con la secuencia de aminoácidos de la IL-B30. Las medidas de identidad serán de al menos aproximadamente un 35%, generalmente de al menos aproximadamente un 40%, a menudo de al menos aproximadamente un 50%, típicamente de al menos aproximadamente un 60%, normalmente de al menos aproximadamente un 70%, preferiblemente de al menos aproximadamente un 80% y más preferiblemente de al menos aproximadamente un 90%.

45 El ADN de IL-B30 aislado puede ser modificarse fácilmente mediante sustituciones de nucleótidos, eliminaciones de nucleótidos, inserciones de nucleótidos e inversiones de tramos cortos de nucleótidos. Estas modificaciones tienen como resultado nuevas secuencias de ADN que codifican estos antígenos, sus derivados o proteínas con una actividad fisiológica, inmunogénica, antigénica similar o con otra actividad funcional. Estas secuencias modificadas pueden utilizarse para producir antígenos mutantes o para intensificar la expresión. La expresión incrementada puede implicar una amplificación de genes, una transcripción incrementada, una traducción incrementada y otros mecanismos. El término "IL-B30 mutante" incluye un polipéptido que por lo demás está dentro de la definición de identidad de secuencias de la IL-B30 según se describió anteriormente, pero que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de la IL-B30 normalmente encontrada en la naturaleza, ya sea por una delección, sustitución o inserción. Esto incluye generalmente proteínas que tienen identidad significativa con una proteína que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2 y que comparten varias actividades biológicas, por ejemplo antigénicas o inmunogénicas, con esas secuencias, y que contienen la mayor parte de las secuencias naturales de longitud completa descritas. Se preferirán típicamente secuencias de longitud completa, aunque versiones truncadas serán también útiles; de igual modo genes o proteínas de origen natural son típicamente los más deseados. Conceptos similares son aplicables a las diferentes proteínas IL-B30, particularmente a las encontradas en diferentes animales de sangre caliente, por ejemplo mamíferos y aves. Estas descripciones tienen la intención de incluir de manera general a todas las proteínas IL-B30, no limitándose a las realizaciones particulares de primates discutidas específicamente.

65 La mutagénesis de IL-B30 puede llevarse a cabo también realizando inserciones o eliminaciones de aminoácidos. Pueden producirse sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación para llegar a una construcción final. Las inserciones incluyen fusiones amino- o carboxi-terminales. Puede llevarse a cabo mutagénesis aleatoria en un codón diana y los mutantes expresados pueden someterse posteriormente a selección respecto de la actividad

deseada. Los métodos para producir mutaciones por sustitución en lugares predeterminados del ADN con una secuencia conocida son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante las técnicas de mutagénesis con el cebador M13 o con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989); Ausubel et al. (1987 y suplementos) y Kunkel et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382. En el presente documento se divulgan, por ejemplo, sustituciones de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 7 veces, etc., preferiblemente conservadoras, a nivel de nucleótidos o de aminoácidos. Preferiblemente las sustituciones estarán lejos de las cisteínas conservadas y a menudo estarán en regiones distantes de los dominios estructurales de las hélices. Tales variantes pueden ser útiles para producir anticuerpos específicos, y a menudo compartirán muchas o todas las propiedades biológicas.

En el presente documento se divulgan proteínas recombinantes, por ejemplo, proteínas de fusión heterólogas utilizando segmentos de estas proteínas. Una proteína de fusión heteróloga es una fusión de proteínas o segmentos que normalmente no están fusionados de la misma manera en la naturaleza. Se aplica un concepto similar a las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas.

Además, pueden producirse nuevas construcciones combinando dominios funcionales similares de otras proteínas. Por ejemplo, un segmento de unión a una diana u otros segmentos pueden ser "intercambiados" entre nuevos polipéptidos o fragmentos de fusión diferentes. Véase, por ejemplo, Cunningham et al. (1989) *Science* 243:1330-1336; y O'Dowd et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992.

El método de las fosforamiditas descrito por Beaucage y Carruthers (1981) *Tetra. Letts.* 22:1859-1862, producirá fragmentos de ADN sintéticos adecuados. Normalmente, se obtendrá un fragmento de doble hebra mediante la síntesis de la hebra complementaria e hibridando las hebras en condiciones adecuadas, o bien añadiendo la hebra complementaria utilizando ADN polimerasa con una secuencia de cebadores adecuada, por ejemplo mediante técnicas de PCR.

A este gen se le puede aplicar un análisis estructural, en comparación con la familia de citocinas IL-6. La familia incluye, por ejemplo, IL-6, IL-11, IL-12, G-CSF, LIF, OSM, CNTF y Ob. La alineación de las secuencias de IL-B30 de humano, cerdo y ratón con otros miembros de la familia de IL-6 permitirá la definición de características estructurales. En particular, pueden determinarse los restos de la lámina β y de la hélice α utilizando, por ejemplo, el programa RASMOL, véase Bazan et al. (1996) *Nature* 379:591; Lodi et al. (1994) *Science* 263:1762-1766; Sayle y Milner-White (1995) *TIBS* 20:374-376; y Gronenberg et al. (1991) *Protein Engineering* 4:263-269. Los restos preferidos para sustituciones incluyen los restos expuestos de la superficie que podría predecirse que interactuarán con el receptor. Otros restos que deben conservar la función serán sustituciones conservativas, particularmente en una posición distante respecto de los restos expuestos en la superficie.

IV. Variantes Funcionales

El bloqueo de la respuesta fisiológica a IL-B30 puede ser el resultado de la inhibición competitiva de la unión del ligando a su receptor.

Los ensayos *in vitro* divulgados en el presente documento utilizarán normalmente la proteína aislada, fragmentos solubles que contienen segmentos de unión al receptor de estas proteínas o fragmentos unidos a sustratos en fase sólida. Estos ensayos permitirán también la determinación diagnóstica de los efectos de mutaciones y modificaciones del segmento de unión o bien de los efectos de mutaciones y modificaciones de la citocina, por ejemplo, análogos de IL-B30.

En el presente documento también se divulga el uso de ensayos de selección de fármacos competitivos, por ejemplo aquellos en los que anticuerpos neutralizantes para la citocina o fragmentos de unión al receptor compiten con un compuesto de ensayo.

Los "derivados" de los antígenos IL-B30 incluyen mutantes de la secuencia de aminoácidos de formas que existen en la naturaleza, variantes de glucosilación y conjugados o agregados covalentes con otros restos químicos. Los derivados covalentes pueden prepararse mediante la unión de grupos funcionales a grupos que se encuentran en las cadenas de aminoácidos laterales de IL-B30 o en los extremos N o C, por ejemplo, por medios estándar. Véase, por ejemplo, Lundblad y Noyes (1988) *Chemical Reagents for Protein Modification*, vols. 1-2, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL; Hugli (ed. 1989) *Techniques in Protein Chemistry*, Academic Press, San Diego, CA; y Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking*, CRC Press, Boca Raton, FL.

En particular, se incluyen, por ejemplo, alteraciones de la glucosilación producidas mediante la modificación de los patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento, o en etapas de procesamiento adicionales. Véase, por ejemplo, Elbein (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56:497-534. Se incluyen también versiones de los péptidos con la misma secuencia de aminoácidos primaria que tienen otras pequeñas modificaciones, incluyendo restos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

Se proporcionan también polipéptidos de fusión entre IL-B30 y otras proteínas homólogas o heterólogas. Muchos

receptores de citocinas u otras proteínas de superficie son multiméricos, por ejemplo, entidades homodiméricas, y una construcción repetida puede tener varias ventajas, incluyendo una menor susceptibilidad al corte proteolítico. Los ejemplos típicos son fusiones de un polipéptido indicador, por ejemplo, luciferasa, con un segmento o dominio de una proteína, por ejemplo, un segmento de unión al receptor, de tal manera que la presencia o la posición del ligando fusionado puede determinarse fácilmente. Véase, por ejemplo, Dull et al., Patente de los Estados Unidos n.º 4.859.609. Otras parejas de fusión de genes incluyen β -galactosidasa bacteriana, trpE, Proteína A, β -lactamasa, amilasa alfa, alcohol deshidrogenasa, factor de acoplamiento alfa de levaduras y etiquetas para la detección o purificación, tales como la secuencia FLAG o la secuencia His6. Véase, por ejemplo, Godowski et al. (1988) Science 241:812-816.

Los péptidos de fusión se producirán típicamente mediante métodos de ácidos nucleicos recombinantes o mediante métodos de polipéptidos sintéticos. Las técnicas para la manipulación y expresión de ácidos nucleicos están descritas de manera general en, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory; y en Ausubel et al. (eds. 1993) Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, NY. Técnicas para la síntesis de polipéptidos están descritas en, por ejemplo, Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2156; Merrifield (1986) Science 232:341-347; Atherton et al. (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford; y Grant (1992) Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman, NY. Los métodos de repliegamiento pueden ser aplicables a las proteínas sintéticas.

En el presente documento se divulga la utilización de derivados de proteínas IL-B30 distintos de las variaciones de la secuencia de aminoácidos o de la glucosilación. Tales derivados pueden implicar la asociación covalente o mediante agregación con restos químicos o con transportadores proteicos. Los derivados covalentes o por agregación serán útiles como inmunógenos, como reactivos en inmunoensayos o en métodos de purificación tales como para la purificación por afinidad de parejas de unión, por ejemplo, otros antígenos. Una IL-B30 puede inmovilizarse por unión covalente a un soporte sólido tal como SEPHAROSA activada con bromuro de cianógeno, mediante métodos que son bien conocidos en la técnica, o adsorbida sobre superficies de poliolefina, con o sin entrecruzamiento con glutaldehído, para utilización en el ensayo de purificación de anticuerpos anti-IL-B30 o en una composición de unión alternativa. Las proteínas IL-B30 también pueden marcarse con un grupo detectable para utilizarse, por ejemplo, en ensayos de diagnóstico. La purificación de IL-B30 puede llevarse a cabo con un anticuerpo inmovilizado o con una pareja de unión complementaria, por ejemplo, la porción de unión de un receptor.

Un fragmento de IL-B30 solubilizado divulgado en el presente documento puede utilizarse como inmunógeno para la producción de antisueros o de anticuerpos específicos para la unión. El antígeno purificado puede utilizarse para la selección de anticuerpos monoclonales o de fragmentos de unión a antígeno, incluyendo los fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos naturales, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab)₂, etc. Los antígenos IL-B30 purificados pueden utilizarse también como reactivos para detectar anticuerpos generados como respuesta a la presencia de niveles elevados de la citocina, lo cual puede ser el diagnóstico de una patología o enfermedad fisiológica anormal o específica. En el presente documento se divulgan anticuerpos producidos contra secuencias de aminoácidos codificadas por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o contra fragmentos de proteínas que la contienen. En particular, en el presente documento se divulgan anticuerpos que tienen afinidad de unión con, o que han sido producidos contra, dominios específicos, por ejemplo las hélices A, B, C o D.

En el presente documento se divulga el aislamiento de variantes procedentes de especies estrechamente relacionadas adicionales. El análisis de transferencia de Southern y Northern establecerá que existen entidades genéticas similares en otros mamíferos. Es probable que las IL-B30 estén extendidas en variantes de especies, por ejemplo, roedores, lagomorfos, carnívoros, artiodáctila, perisodáctila y primates.

En el presente documento se divulga un medio para aislar un grupo de antígenos relacionados que presenten distinciones y similitudes en cuanto a su estructura, expresión y función. La elucidación de muchos de los efectos fisiológicos de las moléculas se acelerará enormemente mediante el aislamiento y la caracterización de especies distintas adicionales o de variantes polimórficas de las mismas. En particular, en el presente documento se divulgan sondas útiles para identificar entidades genéticas homólogas adicionales en diferentes especies.

Los genes aislados permitirán la transformación de células que carezcan de la expresión de IL-B30, por ejemplo tipos de especies o células que carezcan de las proteínas correspondientes y presenten una actividad de fondo negativa. Esto permitiría el análisis de la función de IL-B30 en comparación con células control no transformadas.

El análisis minucioso de los elementos estructurales críticos que llevan a cabo las diferentes funciones fisiológicas mediadas por estos antígenos es posible utilizando técnicas estándar de biología molecular moderna, particularmente al comparar miembros de clases relacionadas. Véase, por ejemplo, la técnica de mutagénesis para la selección de homólogos descrita en Cunningham et al. (1989) Science 243:1339-1336; y los procedimientos utilizados en O'Dowd et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:15985-15992; y Lechleiter et al. (1990) EMBO J. 9:4381-4390.

Las funciones intracelulares implicarán probablemente la generación de señales para receptores. Sin embargo, puede producirse la internalización de la proteína en ciertas circunstancias y puede producirse una interacción entre componentes intracelulares y la citocina. Segmentos específicos de interacción de IL-B30 con componentes de

interacción pueden ser identificados por mutagénesis o por medios bioquímicos directos, por ejemplo, por métodos de entrecruzamiento o afinidad. Será aplicable también el análisis estructural por métodos cristalográficos u otros métodos físicos. Una investigación adicional del mecanismo de la transmisión de señales incluirá el estudio de componentes asociados que pueden ser aislables por métodos de afinidad o por medios genéticos, por ejemplo, el análisis de mutantes por complementación.

Se continuará con un estudio adicional de la expresión y el control de IL-B30. Los elementos de control asociados con los antígenos presentarán diferentes patrones fisiológicos, de desarrollo, específicos de un tejido u otros patrones de expresión. Son de interés las regiones genéticas cadena arriba o cadena abajo, por ejemplo, los elementos de control.

Los estudios estructurales de los antígenos IL-B30 darán lugar al diseño de nuevos antígenos, particularmente de análogos que presenten propiedades agonistas o antagonistas sobre la molécula. Esto puede combinarse con los métodos de selección previamente descritos para aislar antígenos que presenten espectros de actividades deseados.

V. Anticuerpos

Pueden producirse anticuerpos contra diversos epítopos de las proteínas IL-B30, incluyendo variantes de especie, polimórficas o alélicas y fragmentos de las mismas, tanto en sus formas de origen natural como en sus formas recombinantes. Además, pueden generarse anticuerpo contra las IL-B30 ya sea en sus formas activas o en sus formas inactivas, incluyendo versiones nativas o desnaturalizadas. También se contemplan los anticuerpos anti-idiotípicos.

Pueden producirse anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión y versiones monocatenarias, contra fragmentos predeterminados de los antígenos, mediante la inmunización de animales con conjugados de los fragmentos con proteínas inmunogénicas. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de células que secretan del anticuerpo deseado. Estos anticuerpos pueden seleccionarse por su unión a IL-B30 normales o defectuosas, o pueden seleccionarse por su actividad agonista o antagonista, por ejemplo, mediada a través de un receptor. Los anticuerpos pueden ser agonistas o antagonistas, por ejemplo, mediante el bloqueo estérico de la unión a un receptor. Estos anticuerpos monoclonales se unirán normalmente con al menos una K_D de aproximadamente 1 mM, más habitualmente de al menos aproximadamente 300 μ M, típicamente de al menos aproximadamente 100 μ M, más típicamente de al menos aproximadamente 30 μ M, preferiblemente de al menos aproximadamente 10 μ M y, más preferiblemente, de al menos aproximadamente 3 μ M o mejor.

Los anticuerpos de esta invención pueden ser también útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, pueden seleccionarse por su capacidad para unirse a los antígenos sin inhibir la unión a un receptor. Como anticuerpos neutralizantes, pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva. Serán también útiles para detectar o cuantificar la proteína IL-B30 o sus receptores. Véase, por ejemplo, Chan (ed. 1987) *Immunology: A Practical Guide*, Academic Press, Orlando, FL; Price y Newman (eds. 1991) *Principles and Practise of Immunoassay*, Stockton Press, N.Y.; y Ngo (ed. 1988) *Nonisotopic Immunoassay*, Plenum Press, N.Y. Absorciones cruzadas u otros ensayos identificarán anticuerpos que presenten varios espectros de especificidades, por ejemplo, especificidades únicas o compartidas entre especies.

Además, los anticuerpos, incluyendo los fragmentos de unión a antígeno de esta invención pueden ser potentes antagonistas que se unen al antígeno e inhiben la unión funcional a, por ejemplo, un receptor que pueda producir una respuesta biológica. Pueden ser útiles también como anticuerpos no neutralizantes y pueden acoplarse a toxinas o radionúclidos de tal manera que cuando el anticuerpo se une al antígeno, se destruya una célula que exprese el mismo, por ejemplo en su superficie. Además, estos anticuerpos pueden conjugarse a fármacos o a otros agentes terapéuticos, ya sea directamente o indirectamente por medio de un adaptador, y pueden llevar a cabo el direccionamiento de fármacos.

Los fragmentos del antígeno pueden unirse a otros materiales, particularmente polipéptidos, como polipéptidos fusionados o unidos covalentemente, para utilizarse como inmunógenos. Un antígeno y sus fragmentos pueden fusionarse o unirse covalentemente a una variedad de inmunógenos tales como la hemocianina de la lapa californiana, seroalbúmina bovina, toxoide tetánico, etc. Véase, *Microbiology*, Hoeber Medical Division, Harper y Row, 1969; Landsteiner (1962) *Specificity of Serological Reactions*, Dover Publications, Nueva York; Williams et al. (1967) *Methods in Immunology and Immunochemistry*, vol. 1, Academic Press, Nueva York; y Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, NY, para descripciones de métodos de preparación de antisueros policlonales.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales a partir de varios hospedadores mamíferos, tales como ratones, roedores, primates, humanos, etc. Puede encontrarse una descripción de técnicas para preparar dichos anticuerpos monoclonales en, por ejemplo, Stites et al. (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4ª ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y las referencias citadas en el mismo; Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.), Academic

Press, Nueva York; y particularmente en Kohler y Milstein (1975), Nature 256:495-497, que discuten un método para generar anticuerpos monoclonales.

5 Otras técnicas adecuadas implican la exposición *in vitro* de linfocitos a los polipéptidos antigénicos, o como alternativa, la selección de bibliotecas de anticuerpos en fagos o vectores similares. Véase, Huse et al. (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", Science 246:1275-1281; y Ward et al. (1989) Nature 341:544-546. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse con o sin modificación, incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos se marcarán mediante la unión, covalente o no covalente, de una sustancia que
10 proporcione una señal detectable. Se conocen una amplia variedad de etiquetas y de técnicas de conjugación y están descritas extensamente en la literatura científica y en la literatura de patentes. Marcas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, etcétera. Las patentes que describen la utilización de dichas etiquetas incluyen las Patentes de los Estados Unidos n.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. También
15 pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes, Véase Cabilly, Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; Moore et al., Patente de los Estados Unidos n.º 4.642.334 y Queen et al. (1989) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:10029-10033.

20 Los anticuerpos de esta invención pueden utilizarse también para cromatografía de afinidad en el aislamiento de la proteína. Pueden prepararse columnas en las que los anticuerpos estén unidos a un soporte sólido. Véase, por ejemplo, Wilchek et al. (1984) Meth. Enzymol. 104:3-55.

25 Los anticuerpos producidos contra cada IL-B30 serán útiles también para producir anticuerpos anti-idiotípicos. Éstos serán útiles para la detección o el diagnóstico de varias afecciones inmunológicas relacionadas con la expresión de los antígenos respectivos.

VI. Ácidos Nucleicos

30 Las secuencias peptídicas descritas y los reactivos relacionados son útiles para detectar, aislar o identificar un clon de ADN que codifique IL-B30 procedente de, por ejemplo, una fuente natural. Típicamente, serán útiles para aislar un gen de mamífero y se aplicarán procedimientos similares para aislar genes de otras especies, por ejemplo, de animales de sangre caliente tales como aves y mamíferos. La hibridación cruzada permitirá el aislamiento de IL-B30 de la misma especie, por ejemplo, de variantes polimórficas, o de otras especies. Estarán disponibles varios procedimientos diferentes para aislar con éxito un clon de ácido nucleico adecuado.

35 La proteína purificada o los péptidos definidos son útiles para generar anticuerpos mediante métodos estándar, según se describió anteriormente. Los péptidos sintéticos o la proteína purificada pueden ser presentados a un sistema inmune con el fin de generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véase, por ejemplo, Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; y Harlow y Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press.

40 Por ejemplo, la composición de unión específica podría utilizarse para someter a selección una biblioteca de expresión producida a partir de una línea celular que exprese una IL-B30. La selección por la expresión intracelular puede realizarse mediante varios procedimientos de tinción o de inmunofluorescencia. Las composiciones de unión
45 podrían utilizarse para purificar por afinidad o para seleccionar células que expresen una proteína de fusión en la superficie.

50 Los segmentos peptídicos pueden utilizarse también con el fin de predecir oligonucleótidos adecuados para someter a selección una biblioteca. El código genético puede emplearse para seleccionar oligonucleótidos adecuados útiles como sondas para la selección. Véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1. En combinación con técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los oligonucleótidos sintéticos serán útiles para seleccionar los clones correctos de una biblioteca. Las secuencias complementarias se utilizarán también como sondas, cebadores o hebras no codificantes. Varios fragmentos serán particularmente útiles, por ejemplo, acoplados con un vector anclado o con técnicas de PCR complementaria con poli-A o con ADN complementario de otros péptidos.

55 En el presente documento se divulga el uso de ADN aislado o de fragmentos que codifican el polipéptido de IL-B30 correspondiente biológicamente activo, particularmente carentes de la porción que codifica la porción 5' no traducida de la secuencia descrita. Además, en el presente documento se divulga ADN aislado o recombinante que codifica una proteína o polipéptido biológicamente activo y que es capaz de hibridar en condiciones adecuadas con las
60 secuencias de ADN descritas en el presente documento. Dicha proteína o polipéptido biológicamente activo puede ser un antígeno intacto que tenga la secuencia de aminoácidos descrita en, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2, particularmente un polipéptido secretado maduro. Además, en el presente documento se divulga la utilización de ADN aislado o recombinante, o de fragmentos del mismo, que codifica las proteínas de la invención. El ADN aislado puede tener las secuencias reguladoras respectivas en los flancos 5' y 3', por ejemplo, promotores, potenciadores,
65 señales de adición de poli-A y otras. Como alternativa, la expresión puede llevarse a cabo mediante la unión operativa de un segmento codificador a un promotor heterólogo, por ejemplo, insertando un promotor cadena arriba

de un gen endógeno.

Un ácido nucleico "aislado" es un ácido nucleico, por ejemplo ARN, ADN o un polímero mixto, que está separado sustancialmente de los demás componentes que de forma natural acompañan a una secuencia nativa, por ejemplo
 5 ribosomas, polimerasas y/o secuencias genómicas flanqueantes procedentes de la especie de origen. El término incluye una secuencia de ácido nucleico que haya sido extraída de su entorno natural e incluye aislados de ADN recombinantes o clonados y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula. Generalmente, el
 10 ácido estará en un vector o en un fragmento menor de aproximadamente 50 kb, normalmente menor de aproximadamente 30 kb, típicamente menor de aproximadamente 10 kb y, preferiblemente, menor de aproximadamente 6 kb.

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

Un ácido nucleico "recombinante" está definido por su método de producción o por su estructura. Con referencia a su método de producción, por ejemplo, un producto producido mediante un proceso, el proceso utiliza técnicas de ácidos nucleicos recombinantes, implicando por ejemplo la intervención humana en la secuencia de nucleótidos, típicamente la selección o la producción. Como alternativa, puede ser un ácido nucleico producido mediante la
 20 generación de una secuencia que comprende la fusión de dos fragmentos que no están contiguos en la naturaleza, pero se tiene la intención de excluir productos de la naturaleza, por ejemplo, mutantes existentes de forma natural. Así, se incluyen, por ejemplo, productos producidos mediante la transformación de células con cualquier vector que no exista de manera natural, así como ácidos nucleicos que contengan una secuencia derivada utilizando cualquier
 25 proceso de síntesis de oligonucleótidos. Esto se realiza a menudo para sustituir un codón con un codón redundante que codifique el mismo aminoácido o un aminoácido conservador, a la vez que se introduce o se elimina típicamente un sitio de reconocimiento de secuencia.

Como alternativa, se realiza la unión de segmentos de ácidos nucleicos de funciones deseadas para generar una
 30 única entidad genética que contenga una combinación deseada de funciones no encontradas en las formas naturales comúnmente disponibles. Los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción son a menudo la diana de tales manipulaciones artificiales, pero pueden incorporarse mediante diseño otras dianas específicas de sitio, por ejemplo, promotores, lugares de replicación de ADN, secuencias reguladoras, secuencias de control u otras características útiles. Un concepto similar está dirigido a un polipéptido recombinante, por ejemplo, de fusión. Se describen también ácidos nucleicos sintéticos que, por la redundancia del código genético, codifican polipéptidos
 35 similares a fragmentos de estos antígenos y fusiones de secuencias procedentes de varias especies diferentes o variantes polimórficas.

Un "fragmento" significativo en el contexto de un ácido nucleico es un segmento contiguo de al menos
 40 aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente de al menos aproximadamente 22 nucleótidos, comúnmente de al menos aproximadamente 29 nucleótidos, más a menudo de al menos aproximadamente 35 nucleótidos, típicamente de al menos aproximadamente 41 nucleótidos, normalmente de al menos aproximadamente 47 nucleótidos, preferiblemente de al menos aproximadamente 55 nucleótidos y, en particular, será de al menos aproximadamente
 45 60 o más nucleótidos, por ejemplo 67, 73, 81, 95, etc.

Un ADN que codifica una proteína IL-B30 será particularmente útil para identificar genes, ARNm y especies de ADNc que codifiquen proteínas relacionadas o similares, así como ADN que codifiquen proteínas homólogas de especies diferentes. Habrá homólogos en otras especies, incluyendo primates, roedores, caninos, felinos y aves. Varias proteínas IL-B30 serán homólogas y están incluidas en el presente documento. Sin embargo, incluso proteínas que
 50 tengan una relación evolutiva más distante con el antígeno pueden aislarse fácilmente en condiciones adecuadas utilizando estas secuencias si son suficientemente homólogas. Las proteínas IL-B30 de primates son de particular interés.

Los clones recombinantes derivados de las secuencias genómicas que contienen, por ejemplo, intrones, serán útiles
 55 para estudios transgénicos, incluyendo por ejemplo células y organismos transgénicos, y para terapia génica. Véase, por ejemplo, Goodnow (1992) "Transgenic Animals" en Roitt (ed.) Encyclopedia of Immunology, Academic Press, San Diego, págs. 1502-1504; Travis (1992) Science 256:1392-1394; Kuhn et al. (1991) Science 254:707-710; Capecchi (1989) Science 244:1288; Robertson (1987) (ed.) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, IRL Press, Oxford; y Rosenberg (1992) J. Clinical Oncology 10:180-199.

Una homología sustancial, por ejemplo identidad, en el contexto de comparación de secuencias de ácidos nucleicos indica que los segmentos, o su hebra complementaria, cuando se comparan, son idénticos cuando son alineados óptimamente, con inserciones o eliminaciones de nucleótidos adecuadas, en al menos aproximadamente el 50 % de
 60 los nucleótidos, generalmente en al menos aproximadamente el 58 %, comúnmente en al menos aproximadamente el 65 %, a menudo en al menos aproximadamente el 71 %, típicamente en al menos aproximadamente el 77 %, normalmente en al menos aproximadamente el 85 %, preferiblemente en al menos aproximadamente del 95 al 98%

o más, y en particular tanto como en aproximadamente el 99% o más de los nucleótidos. Como alternativa, existe una homología sustancial cuando los segmentos hibriden en condiciones de hibridación selectivas con una hebra o su complemento, típicamente utilizando una secuencia de IL-B30, por ejemplo la SEQ ID NO: 1. Típicamente, tendrá lugar una hibridación selectiva cuando exista una identidad de al menos aproximadamente un 55% en un tramo de al menos aproximadamente 30 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente un 75% en un tramo de aproximadamente 25 nucleótidos y, muy preferiblemente, al menos aproximadamente un 90% en un tramo de aproximadamente 20 nucleótidos. Véase, Kanehisa (1984) *Nuc. Acids Res.* 12:203-213. La longitud de la comparación de identidad, según se describe, puede ser en tramos más largos y puede ser en un tramo de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, normalmente de al menos aproximadamente 28 nucleótidos, típicamente de al menos aproximadamente 40 nucleótidos y, preferiblemente, de al menos aproximadamente 75 a 100 o más nucleótidos.

Las condiciones rigurosas, con referencia a la homología en el contexto de hibridación, serán condiciones rigurosas combinadas de sal, temperatura, disolventes orgánicos y otros parámetros, típicamente los controlados en las reacciones de hibridación. Las condiciones de temperatura rigurosas incluirán normalmente temperaturas por encima de aproximadamente 30°C, normalmente por encima de aproximadamente 37°C, típicamente por encima de aproximadamente 55°C, preferiblemente por encima de aproximadamente 70°C. Las condiciones de sal rigurosas serán normalmente menores aproximadamente 1000 mM, normalmente menores aproximadamente 400 mM, típicamente menores aproximadamente 250 mM, preferiblemente menores aproximadamente 150 mM, incluyendo aproximadamente 100, 50 o incluso 20 mM. Sin embargo, la comparación de parámetros es mucho más importante que la medida de cualquier parámetro individual. Véase, por ejemplo, Wetmur y Davidson (1968) *J. Mol. Biol.* 31:349-370. La hibridación en condiciones rigurosas dará un fondo de al menos 2 veces sobre el fondo, preferiblemente de al menos 3-5 o más.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo para la comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia son introducidas en un ordenador, se designan, si es necesario, coordenadas de subsecuencias y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencias. El algoritmo para la comparación de secuencias calcula posteriormente el porcentaje de identidad de secuencias para la(s) secuencia(s) de ensayo con relación a la secuencia de referencia basándose en los parámetros del programa designados.

La alineación óptica de secuencias para comparación puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482, mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (Véase, en general, Ausubel et al., anteriormente citado).

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones progresivas de parejas para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencias. Representa gráficamente también un árbol o dendrograma que muestra las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35:351-360. El método utilizado es similar al método descrito por Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-153. El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de ellas con una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple comienza con la alineación de parejas de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo se alinea posteriormente con la siguiente secuencia más relacionada o con el siguiente grupo de secuencias alineadas. Dos grupos de secuencias son alineados por una simple extensión de la alineación de parejas de dos secuencias individuales. La alineación final se consigue por una serie de alineaciones de parejas progresivas. El programa se hace funcionar designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para las regiones de comparación de secuencias y designando los parámetros del programa. Por ejemplo, una secuencia de referencia puede ser comparada con otras secuencias de ensayo para determinar la relación de identidad de secuencias en porcentaje utilizando los parámetros siguientes: peso de los huecos por defecto (3.00), peso de la longitud de los huecos por defecto (0.10) y los huecos terminales ponderados.

Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y de similitud de secuencias es el algoritmo BLAST, que está descrito en Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. El programa de ordenador para llevar a cabo los análisis BLAST está disponible públicamente en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica la identificación en primer lugar de pares de secuencias con una elevada puntuación (HSPs), identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que coincidan o satisfagan una puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud de una base de datos de secuencias. T es referido como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al., anteriormente citado). Estos ciertos iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas con el fin de encontrar HSPs más largos que las contengan. Los ciertos de palabras son posteriormente extendidos en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta que pueda

incrementarse la puntuación de alineación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de la alineación acumulativa disminuye en una cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa desciende hasta cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos con puntuación negativa; o bien se alcanza el extremo de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabras (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:10915), alineaciones (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y la comparación de ambas hebras.

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencias, el algoritmo BLAST realiza también un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (Véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad mínima de suma (P(N)), que proporciona una indicación sobre la probabilidad de que tenga lugar por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico es considerado similar a una secuencia de referencia si la probabilidad mínima de suma en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01 y, muy preferiblemente, menor de aproximadamente 0,001.

Una indicación más de que dos secuencias de ácidos nucleicos de polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico sea reactivo de manera cruzada inmunológicamente con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, según se describe más adelante. Así, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren únicamente por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibriden entre sí en condiciones rigurosas, según se describe más adelante.

La IL-B30 de otras especies de mamíferos puede ser clonada y aislada mediante hibridación específica cruzada de especies estrechamente relacionadas. La homología puede ser relativamente baja entre especies poco relacionadas, y por tanto es aconsejable la hibridación de especies relativamente relacionadas estrechamente. Como alternativa, la preparación de un anticuerpo que presente menos especificidad de especie puede ser útil en procedimientos de clonación y expresión.

VII. Producción de IL-B30; Miméticos

El ADN que codifica IL-B30 o fragmentos de la misma puede obtenerse mediante síntesis química, mediante la selección de bibliotecas de ADNc o mediante la selección de bibliotecas genómicas preparadas a partir de una amplia variedad de líneas celulares o muestras de tejido. Véase, por ejemplo, Okayama y Berg (1982) Mol. Cell. Biol. 2:161-170; Gubler y Hoffman (1983) Gene 25:263-269; y Glover (ed. 1984) DNA Cloning: A Practical Approach, IRL Press, Oxford. Como alternativa, las secuencias proporcionadas en el presente documento proporcionan cebadores de PCR útiles o permiten la preparación sintética u otro tipo de preparación de genes adecuados que codifiquen IL-B30, incluyendo realizaciones existentes de forma natural.

Este ADN puede expresarse en una amplia variedad de células hospedadoras para la síntesis de una IL-B30 de longitud completa o de fragmentos que pueden utilizarse a su vez para, por ejemplo, generar anticuerpos policlonales o monoclonales; para estudios de unión; para la construcción y la expresión de moléculas modificadas y para estudios de estructura/función.

Los vectores, según son utilizados en el presente documento, comprenden plásmidos, virus, bacteriófagos, fragmentos de ADN integrables y otros vehículos que permitan la integración de fragmentos de ADN en el genoma del hospedador. Véase, por ejemplo, Pouwels et al. (1985 y Suplementos) Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y.; y Rodríguez et al. (1988) (eds.) Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworth, Boston, MA.

Para los fines de esta invención, las secuencias de ADN están unidas operativamente cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, un ADN de una presecuencia o de un líder secretor está unido operativamente a un polipéptido si se expresa como una preproteína o participa direccionando el polipéptido a la membrana celular o en la secreción del polipéptido. Un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción del polipéptido; un sitio de unión de ribosomas está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado de tal forma que permita la traducción. Normalmente, unido operativamente significa contiguo y en el marco de lectura; sin embargo, ciertos elementos genéticos tales como genes represores no están unidos contiguamente, sino que se unen a secuencias operadoras que a su vez controlan la expresión. Véase, por ejemplo, Rodríguez et al., Capítulo 10, págs. 205-236; Balbas y Bolivar (1990) Methods in Enzymology 185:14-37; y Ausubel et al. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, Greene y Wiley, NY.

Los ejemplos representativos de vectores de expresión adecuados incluyen pCDNA1; pCD, Véase Okayama et al. (1985) Mol. Cell Biol. 5:1136-1142; pMC1neo Poli-A, Véase Thomas et al. (1987) Cell 51:503-512; y un vector

baculovírico tal como pAC 373 o pAC 610. Véase, por ejemplo, Miller (1988) *Ann. Rev. Microbiol.* 42:177-199.

A menudo será deseable expresar un polipéptido IL-B30 en un sistema que proporcione un patrón de glucosilación específico o definido. Véase, por ejemplo, Luckow y Summers (1988) *Bio/Technology* 6:47-55; y Kaufman (1990) *Meth. Enzymol.* 185:487-511.

La IL-B30, o un fragmento de la misma, puede manipularse para que sea fosfatidil inositol (PI) unido a una membrana celular, pero puede eliminarse de la membrana mediante tratamiento con un enzima que corte fosfatidil inositol, por ejemplo, fosfatidil inositol fosfolipasa-C. Este enzima libera el antígeno en una forma biológicamente activa y permite su purificación mediante procedimientos estándar de la química de proteínas. Véase, por ejemplo, Low (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 988:427-454; Tse et al. (1985) *Science* 230:1003-1008; y Brunner et al. (1991) *J. Cell Biol.* 114:1275-1283.

Ahora que la IL-B30 ha sido caracterizada, pueden prepararse fragmentos o derivados de la misma mediante procesos convencionales para la síntesis de péptidos. Estos incluyen procesos tales como los descritos en Stewart y Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky y Bodanszky (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Nueva York; Bodanszky (1984) *The Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Nueva York; y Villafranca (ed. 1991) *Techniques in Protein Chemistry II*, Academic Press, San Diego, CA.

VIII. Usos

En el presente documento se divulgan reactivos que serán útiles en aplicaciones de diagnóstico según se describe en otras partes del presente documento, por ejemplo, en condiciones mediadas por IL-B30, o más adelante en la descripción de kits de diagnóstico. El gen puede ser útil en ciencias forenses, por ejemplo, para distinguir roedores de humanos, o como marcador para distinguir entre diferentes células que presenten patrones de expresión o modificación diferencial.

En el presente documento se divulgan reactivos con un potencial comercial y/o terapéutico significativo. La IL-B30 (natural o recombinante), fragmentos de la misma y anticuerpos hacia la misma, junto con compuestos identificados como poseedores de afinidad de unión a IL-B30, serán útiles como reactivos para la descripción de técnicas de biología molecular, inmunología o fisiología. Pueden prepararse kits adecuados con los reactivos, por ejemplo, en ejercicios de laboratorio prácticos para la producción o la utilización de proteínas, anticuerpos, métodos de clonación, histología, etc.

Los reactivos serán también útiles en el tratamiento de afecciones asociadas con una fisiología o un desarrollo anormales, incluyendo afecciones inflamatorias. Pueden ser útiles en ensayos *in vitro* para determinar la presencia o ausencia de componentes que interaccionen, lo cual puede correlacionarse con el éxito de estrategias de tratamiento particulares. En particular, se conseguirá la modulación de la fisiología de diferentes células, por ejemplo, hematopoyéticas o linfoides, mediante métodos de tratamiento adecuados utilizando las composiciones proporcionadas en el presente documento. Véase, por ejemplo, Thomson (1994; ed.) *The Cytokine Handbook* (2ª ed.) Academic Press, San Diego; Metcalf y Nicola (1995) *The Hematopoietic Colony Stimulating Factors*, Cambridge University Press; y Aggarwal y Gutterman (1991) *Human Cytokines*, Blackwell Pub.

Por ejemplo, una enfermedad o trastorno asociado con la expresión anormal o con la generación de señales anormales por una IL-B30 sería una probable diana para un agonista o un antagonista. La nueva citocina tendría una función en la regulación o el desarrollo de células hematopoyéticas, por ejemplo, de células linfoides, que influyan sobre las respuestas inmunológicas, por ejemplo la inflamación y/o las enfermedades autoinmunes. Como alternativa, puede afectar a la fisiología o al desarrollo vascular, o puede tener efectos neuronales.

En particular, la citocina mediaría, en varios contextos, la síntesis de citocinas por las células, la proliferación, etc. Antagonistas de IL-B30, tales como muteínas variantes de una forma existente en la naturaleza de IL-B30 o anticuerpos bloqueantes, pueden proporcionar una forma selectiva y potente de bloquear respuestas inmunes, por ejemplo, en situaciones tales como respuestas inflamatorias o autoinmunes. Véase también Samter et al. (eds.) *Immunological Diseases* vols. 1 y 2; Little, Brown and Co.

Además, serían útiles ciertas composiciones combinatorias, por ejemplo con otros moduladores de la inflamación. Estas otras moléculas podrían incluir esteroides, otras versiones de IL-6 y/o G-CSF, incluyendo variantes específicas, u homólogos víricos, y sus antagonistas respectivos.

Se conocen varias afecciones anormales en cada uno de los tipos celulares que se sabe que producen ARNm de IL-B30 mediante análisis de transferencia de Northern. Véase, Berkow (ed.) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, N.Y.; y Weatherall et al. (eds.) *Oxford Textbook of Medicine*, Oxford University Press, Oxford. Otras muchas afecciones y enfermedades médicas implican la activación por macrófagos o monocitos, y muchas de éstas serán sensibles al tratamiento con uno de los agonistas o antagonistas proporcionados en el presente documento. Véase, por ejemplo,

Stites y Terr (eds.; 1991) Basic and Clinical Immunology, Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut; y Samter et al. (eds.) Immunological Diseases, Little, Brown and Co. Estos problemas serán susceptibles a la prevención o al tratamiento utilizando las composiciones aquí proporcionadas. La localización en los islotes pancreáticos sugiere una posible relevancia para la diabetes.

5 La IL-B30, los antagonistas, los anticuerpos, etc., pueden purificarse y administrarse posteriormente a un paciente, veterinario o humano. Estos reactivos pueden combinarse para uso terapéutico con ingredientes activos o inertes adicionales, por ejemplo, en vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales, por ejemplo adyuvantes inmunogénicos, junto con estabilizantes, excipientes o conservantes fisiológicamente inocuos. Estas combinaciones pueden esterilizarse por filtración y colocarse en formas de dosificación, tal como mediante liofilización, en viales de dosificación o bien pueden almacenarse en preparaciones acuosas estabilizadas. Esta invención contempla también la utilización de anticuerpos o de fragmentos de unión de los mismos, incluyendo formas que no se unen al complemento.

15 Puede llevarse a cabo la selección de fármacos utilizando IL-B30 o fragmentos de la misma con el fin de identificar compuestos que tengan afinidad de unión a, u otros efectos relevantes sobre, las funciones de IL-B30, incluyendo el aislamiento de componentes asociados. Ensayos biológicos posteriores pueden utilizarse posteriormente para determinar si el compuesto tiene actividad estimulante intrínseca y es por tanto un bloqueante o antagonista en cuanto a que bloquea la actividad de la citocina. De igual modo, un compuesto que tenga actividad estimulante intrínseca puede activar la ruta de señales y es por tanto un agonista en cuanto a que simula la actividad de IL-B30. Esta invención contempla además el uso terapéutico de anticuerpos bloqueantes de IL-B30 como antagonistas y de anticuerpos estimulantes como agonistas. Este abordaje sería particularmente útil con otras variantes específicas de IL-B30.

25 Las cantidades de reactivos necesarias para una terapia eficaz dependerán de muchos factores diferentes, incluyendo la forma de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados. Así, las dosificaciones para el tratamiento serán valoradas para optimizar la seguridad y la eficacia. Típicamente, las dosificaciones utilizadas *in vitro* pueden proporcionar unas directrices útiles sobre las cantidades útiles para la administración *in situ* de estos reactivos. El ensayo en animales de dosis eficaces para el tratamiento de enfermedades particularmente proporcionará una indicación predictiva adicional de la dosificación para humanos. Se describen diferentes consideraciones en, por ejemplo, Gilman et al. (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª Ed., Pergamon Press; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn. En estas referencias y más adelante se discuten métodos de administración, por ejemplo, de administración oral, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular, difusión transdérmica y otros. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluirán agua, solución salina, tampones y otros compuestos descritos en, por ejemplo, The Merck Index, Merck & Co., Rahway, Nueva Jersey. Se esperará que los rangos de dosificación estén normalmente en cantidades inferiores a concentraciones de 1 mM, típicamente concentraciones menores de aproximadamente 10 μ M, normalmente menores de aproximadamente 100 nM, preferiblemente menores de aproximadamente 10 pM (picomolar) y, muy preferiblemente, menores de menores de aproximadamente 1 fM (femtomolar), con un vehículo adecuado. Se utilizarán a menudo formulaciones de liberación lenta, o un aparato de liberación lenta, para administración continua o de larga duración. Véase, por ejemplo, Langer (1990) Science 249:1527-1533.

45 La IL-B30, los fragmentos de la misma y los anticuerpos hacia la misma o sus fragmentos, los antagonistas y los agonistas pueden ser administrados directamente al hospedador que va a ser tratado o, dependiendo del tamaño de los compuestos, puede ser deseable conjugar los mismos a proteínas transportadoras tales como ovoalbúmina o seroalbúmina antes de su administración. Las formulaciones terapéuticas pueden ser administradas en muchas formulaciones de dosificación convencionales. Aunque es posible que el ingrediente activo sea administrado solo, es preferible presentar el mismo como una formulación farmacéutica. Las formulaciones contienen típicamente al menos un ingrediente activo, según se definió anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables del mismo. Cada vehículo debe ser farmacéuticamente y fisiológicamente aceptable, en el sentido de que sea compatible con los demás ingredientes y de que no sea nocivo para el paciente. Las formulaciones incluyen todas aquellas que son adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral (incluyendo administración subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las formulaciones pueden ser presentadas oportunamente en forma de dosificación unidad y pueden ser preparadas mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en el arte de la farmacia. Véase, Gilman et al. (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª Ed., Pergamon Press; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avis et al. (eds. 1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Dekker, Nueva York; Lieberman et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Dekker, Nueva York; y Lieberman et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Dekker, Nueva York. La terapia de esta invención puede combinarse, o utilizarse en asociación, con otros agentes, por ejemplo otras citocinas, incluyendo IL-6 o G-CSF, o sus antagonistas respectivos.

65 Las formas existentes en la naturaleza y las formas recombinantes de las IL-B30 de esta invención son ambas particularmente útiles para kits y métodos de ensayo que sean capaces de seleccionar compuestos por su actividad de unión a las proteínas. En los años recientes se han desarrollado varios métodos de ensayos automatizados con

el fin de permitir el proceso de selección de decenas de miles de compuestos en un corto periodo. Véase, por ejemplo, Fodor et al. (1991) *Science* 251:767-773, que describe medios para analizar la afinidad de unión de una pluralidad de polímeros definidos sintetizados sobre un sustrato sólido. El desarrollo de ensayos adecuados puede facilitarse enormemente por la disponibilidad de grandes cantidades de IL-B30 soluble, purificada, según se divulga en el presente documento.

Pueden utilizarse otros métodos para determinar los restos críticos en las interacciones IL-B30-receptor de IL-B30. Puede llevarse a cabo un análisis mutacional, Véase por ejemplo Somoza et al. (1993) *J. Exptl. Med.* 178:549-558, para determinar los restos específicos críticos para la interacción y/o la producción de señales. PHD (Rost y Sander (1994) *Proteins* 19:55-72) y DSC (King y Stenberg (1996) *Protein Sci.* 5:2298-2310) pueden proporcionar predicciones sobre la estructura secundaria de hélice α (H), hebra β (E) o espiral (L). Las hélices A y D son las más importantes para la interacción con los receptores, siendo la hélice D la región más importante. La hélice A se extendería en el humano desde aproximadamente la pro(7) a la his(27), mientras que la hélice D se extendería desde aproximadamente la trp(135) a la gly(162). Los restos expuestos en la superficie afectarán a la unión con los receptores, mientras que los restos internos afectarán a la estructura general. Restos pronosticados de particular importancia corresponderán probablemente a arg(146), ser(147), gln(149), ala(150), ala(153), val(154), ala(156), arg(157), ala(160) y his(161).

Por ejemplo, pueden encontrarse normalmente antagonistas una vez que el antígeno haya sido definido estructuralmente, por ejemplo mediante los datos de la estructura terciaria. El análisis de análogos potenciales que interaccionen es ahora posible tras el desarrollo de métodos de ensayo altamente automatizados utilizando IL-B30 purificada. En particular, se descubrirán nuevos agonistas y antagonistas utilizando las técnicas de selección descritas en el presente documento. Son de particular importancia aquellos compuestos en los que se ha encontrado que tienen una afinidad de unión combinada por un espectro de moléculas de IL-B30, por ejemplo, compuestos que pueden actuar como antagonistas para las variantes específicas de IL-B30.

Un método para selección de fármacos utiliza células hospedadoras eucariotas o procariotas que han sido transformadas de manera estable con moléculas de ADN recombinante que expresan una IL-B30. Pueden aislarse células que expresen una IL-B30 aislada de otras moléculas. Tales células, en forma viable o fijada, pueden utilizarse para ensayos de unión estándar con parejas de unión. Véase también, Parce et al. (1989) *Science* 246:243-247; y Owicki et al. (1990) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 87:4007-4011, que describen métodos sensibles para detectar respuestas celulares.

Otra técnica para la selección de fármacos implica un procedimiento que proporciona un proceso de selección de alto rendimiento para seleccionar compuestos que tengan una afinidad de unión adecuada a una IL-B30 y se describe con detalle en Geysen, Solicitud de Patente Europea 84/03564, publicada el 13 de Septiembre de 1984. En primer lugar, se sintetiza un gran número de diferentes compuestos de ensayo peptídicos pequeños sobre un sustrato sólido, por ejemplo, alfileres de plástico o cualquier otra superficie adecuada, Véase Fodor et al. (1991). Posteriormente todos los alfileres de plástico se hacen reaccionar con IL-B30 solubilizada sin purificar o solubilizada purificada, y se lavan. La etapa siguiente implica la detección de la IL-B30 unida.

El diseño racional de fármacos puede estar basado también en estudios estructurales de las formas moleculares de la IL-B30 y de otros efectores o análogos. Los efectores pueden ser otras proteínas que medien otras funciones en respuesta a la unión, u otras proteínas que interaccionen normalmente con IL-B30, por ejemplo, un receptor. Un medio para determinar qué lugares interaccionan con otras proteínas específicas es la determinación de la estructura física mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos x o técnicas de RMN 2 dimensional. Éstas proporcionarán directrices en cuanto a qué restos de aminoácidos forman las regiones de contacto molecular, según el modelado, por ejemplo, frente a otros modelos de receptores de citocinas. Para una descripción detallada de la determinación estructural de proteínas Véase, por ejemplo, Blundell y Johnson (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, Nueva York.

IX. Kits

En el presente documento se divulga la utilización de proteínas IL-B30, péptidos y sus productos de fusión en una variedad de kits de diagnóstico y de métodos para detectar la presencia de otra IL-B30 o de una pareja de unión. Típicamente, el kit tendrá un compartimento que contenga un péptido IL-B30 definido o un segmento génico o un reactivo que reconozca el uno o el otro, por ejemplo fragmentos de IL-B30 o anticuerpos.

Un kit para determinar la afinidad de unión de un compuesto de ensayo a una IL-B30 contendrá típicamente un compuesto de ensayo; un compuesto marcado, por ejemplo una pareja de unión o un anticuerpo que tenga una afinidad de unión conocida por IL-B30; una fuente de IL-B30 (natural o recombinante); y un medio para separar el compuesto marcado unido del libre, tal como una fase sólida para inmovilizar la molécula. Una vez que los compuestos han sido sometidos a selección, aquellos que tengan una afinidad de unión adecuada con el antígeno pueden evaluarse en ensayos biológicos adecuados, como es bien conocido en la técnica, para determinar si actúan como agonistas o antagonistas en la ruta de generación de señales de la IL-B30. La disponibilidad de polipéptidos IL-B30 recombinantse proporciona también estándares bien definidos para calibrar tales ensayos.

Un kit preferido para determinar la concentración de, por ejemplo, una IL-B30 en una muestra contendrá típicamente un compuesto marcado, por ejemplo una pareja de unión o un anticuerpo, que tenga una afinidad de unión conocida por el antígeno, una fuente de la citocina (natural o recombinante) y un medio para separar el compuesto marcado unido del libre, por ejemplo una fase sólida para inmovilizar la IL-B30. Normalmente se proporcionarán
5 compartimentos que contengan reactivos e instrucciones.

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, específicos para la IL-B30 o sus fragmentos son útiles en aplicaciones de diagnóstico para detectar la presencia de niveles elevados de IL-B30 y/o sus fragmentos. Tales ensayos de diagnóstico pueden emplear lisados, células vivas, células fijadas, inmunofluorescencia, cultivos
10 celulares, fluidos corporales, y además pueden implicar la detección de antígenos relacionados con el antígeno en el suero, etcétera. Los ensayos de diagnóstico pueden ser homogéneos (sin etapa de separación entre el reactivo libre y el complejo antígeno-pareja de unión) o heterogéneos (con una etapa de separación). Existen varios ensayos comerciales tales como radioinmunoensayo (RIA), ensayo sobre inmunoabsorbente con enzima unido (ELISA),
15 inmunoensayo enzimático (EIA), la técnica de inmunoensayo multiplicado enzimáticamente (EMIT), inmunoensayo con un sustrato marcado con fluorescencia (SLFIA), etcétera. Véase, por ejemplo, Van Vunakis et al. (1980) Meth. Enzymol. 70:1-525; Harlow y Lane (1980) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, NY; y Coligan et al. (eds. 1993) Current Protocols in Immunology, Greene y Wiley, NY.

Los anticuerpos anti-idiotípicos pueden tener una utilización similar para diagnosticar la presencia de anticuerpos
20 contra una IL-B30, igual que para el diagnóstico de varios estados anormales. Por ejemplo, una sobreproducción de IL-B30 puede tener como resultado la producción de diferentes reacciones inmunológicas que pueden ser el diagnóstico de estados fisiológicos anormales, particularmente en condiciones de células proliferativas tales como el cáncer o una activación o diferenciación anormal. Además, el patrón de distribución disponible proporciona la información de que la citocina se expresa en los islotes pancreáticos, sugiriendo la posibilidad de que la citocina
25 pueda estar implicada en la función de ese órgano, por ejemplo, en una afección médica relevante como la diabetes.

Frecuentemente, los reactivos para ensayos de diagnóstico son suministrados en kits con el fin de optimizar la sensibilidad del ensayo. Dependiendo de la naturaleza del ensayo, del protocolo y de la marca, puede proporcionarse el anticuerpo o la pareja de unión marcados o sin marcar, o IL-B30 marcada. Esto está normalmente
30 junto con otros aditivos, tales como tampones, estabilizantes, materiales necesarios para la producción de señales tales como sustratos para los enzimas, etcétera. Preferiblemente, el kit contendrá también instrucciones para su uso correcto y para la eliminación de su contenido después de la utilización. Típicamente, el kit tiene compartimentos para cada reactivo útil. Deseablemente, los reactivos son proporcionados como un polvo liofilizado seco, pudiendo ser los reactivos reconstituidos en un medio acuoso que proporcione las concentraciones adecuadas de los
35 reactivos para la realización del ensayo.

Muchos de los constituyentes anteriormente mencionados del proceso de selección de fármacos y de los ensayos de diagnóstico pueden utilizarse sin modificación o bien pueden modificarse de una variedad de formas. Por ejemplo, el marcaje puede realizarse mediante la unión covalente o no covalente de un resto que proporcione
40 directamente o indirectamente una señal detectable. En cualquiera de estos ensayos, la pareja de unión, el compuesto de ensayo, las IL-B30 o los anticuerpos hacia ella pueden estar marcados directamente o indirectamente. Las posibilidades para el marcaje directo incluyen grupos de etiquetas: radioetiquetas tales como ¹²⁵I, enzimas (Patente de los Estados Unidos n.º 3.645.090) tales como peroxidasa y fosfatasa alcalina, y etiquetas fluorescentes (Patente de los Estados Unidos n.º 3.940.475) capaces de monitorizar el cambio de intensidad de la fluorescencia, el desplazamiento de la longitud de onda o la polarización de la fluorescencia. Las posibilidades para el marcaje indirecto incluyen la biotilación de un constituyente seguido por la unión a avidina acoplada a uno de los
45 grupos de etiquetas anteriores.

Existen también numerosos métodos para separar la IL-B30 unida de la libre, o como alternativa, la unida del compuesto de ensayo libre. La IL-B30 puede inmovilizarse en diferentes matrices seguido por lavado. Las matrices adecuadas incluyen el plástico tal como una placa de ELISA, filtros y esferas. Véase, por ejemplo, Coligan et al. (eds. 1993) Current Protocols in Immunology, Vol. 1, Capítulo 2, Greene y Wiley, NY. Otras técnicas de separación adecuadas incluyen, sin limitación, el método de las partículas magnetizables con un anticuerpo y fluoresceína descrito en Rattle et al. (1984) Clin. Chem. 30:1457-1461, y la separación de partículas magnéticas con doble
50 anticuerpo según se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 4.659.678.

Los métodos para unir proteínas o sus fragmentos a las diferentes etiquetas han sido descritos extensamente en la literatura y no requieren una discusión detallada en el presente documento. Muchas de las técnicas implican la utilización para la unión de grupos carboxilo activados, ya sea mediante la utilización de carbodiimida o de ésteres
60 activos para formar enlaces peptídicos, la formación de tioéteres por la reacción de un grupo mercapto con un halógeno activado tal como cloroacetilo, o una olefina activada tal como maleimida, etcétera. Las proteínas de fusión serán también útiles en estas aplicaciones.

En el presente documento se divulga el uso de secuencias de oligonucleótidos o polinucleótidos extraídas de la secuencia de una IL-B30. Estas secuencias pueden utilizarse como sondas para detectar los niveles del mensaje de IL-B30 en muestras procedentes de pacientes sospechosos de tener una condición anormal, por ejemplo,
65

inflamatoria o autoinmune. Como la citocina puede ser un marcador o un mediador de la activación, puede ser útil determinar el número de células activadas con el fin de determinar, por ejemplo, cuándo puede requerirse una terapia adicional, por ejemplo, de forma preventiva, antes de que los efectos lleguen a ser, y progresen hasta ser, significativos. La preparación de secuencias de nucleótidos de ARN y ADN, el marcaje de las secuencias y el tamaño preferido de las secuencias han sido descritos y discutidos ampliamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Langer Safer et al. (1982) *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 79:4381-4385; Caskey (1987) *Science* 236:962-967; y Wilchek et al. (1988) *Anal. Biochem.* 171:1-32.

Se contemplan también kits de diagnóstico que analicen también la expresión cualitativa o cuantitativa de otras moléculas. El diagnóstico o el pronóstico pueden depender de la combinación de múltiples indicaciones utilizadas como marcadores. Así, los kits pueden utilizarse en ensayos para determinar combinaciones de marcadores. Véase, por ejemplo, Viallet et al. (1989) *Progress in Growth Factor Res.* 1:89-97. Pueden utilizarse otros kits para evaluar otros subgrupos celulares.

X. Aislamiento de un Receptor de IL-B30

Habiendo aislado un ligando de una interacción específica ligando-receptor, existen métodos para aislar el receptor. Véase, Gearing et al. (1989) *EMBO J.* 8:3667-3676. Por ejemplo, puede determinarse un medio para marcar la citocina IL-B30 sin interferir con la unión a su receptor. Por ejemplo, una etiqueta de afinidad puede fusionarse al extremo amino o carboxilo del ligando. Tal marca puede ser una etiqueta epitópica FLAG o, por ejemplo, una Ig o un dominio Fc. Una biblioteca de expresión puede ser sometida a selección por la unión específica de la citocina mediante, por ejemplo, clasificación de células, o puede ser sometida a otros procesos de selección con el fin de detectar subpoblaciones que expresen tal componente de unión. Véase, por ejemplo, Ho et al. (1993) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:11267-11271; y Liu et al. (1994) *J. Immunol.* 152:1821-29. Como alternativa, puede utilizarse un método de cribado en fase sólida ("panning"). Véase, por ejemplo, Seed y Aruffo (1987) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:3365-3369.

Pueden aplicarse técnicas de entrecruzamiento de proteínas con una etiqueta con el fin de aislar parejas de unión de la citocina IL-B30. Esto permitiría la identificación de proteínas que interaccionen específicamente con la citocina, por ejemplo, de manera similar a la interacción ligando-receptor.

Se realizarán experimentos preliminares para determinar si los componentes de los receptores de IL-6 o G-CSF conocidos están implicados en la(s) respuesta(s) a IL-B30. Es también bastante posible que estos complejos de receptores funcionales puedan compartir muchos o todos sus componentes con un complejo del receptor de IL-B30, ya sea una subunidad específica del receptor o una subunidad accesoria del receptor.

Ejemplos

I. Métodos Generales

Muchos de los métodos estándar siguientes se describen o referenciados en, por ejemplo, Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.) Vols. 1-3, CSH Press, NY; Ausubel et al., *Biology, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY*; o Ausubel et al. (1987 y Suplementos) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley/Greene, NY; Innis et al. (eds. 1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, NY. Los métodos para la purificación de proteínas incluyen métodos tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna, electroforesis, centrifugación, cristalización y otros. Véase, por ejemplo, Ausubel et al. (1987 y suplementos periódicos); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification", *Methods in Enzymology* vol. 182 y otros volúmenes de esta serie; Coligan et al. (1995 y suplementos) *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons, Nueva York, NY; P. Matsudaira (ed. 1993) *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*, Academic Press, San Diego, CA; y la literatura de los fabricantes sobre la utilización de los productos para la purificación de proteínas, por ejemplo, Pharmacia, Piscataway, NJ o Bio-Rad, Richmond, CA. La combinación con técnicas recombinantes permite la fusión a segmentos adecuados (etiquetas epitópicas), por ejemplo, a una secuencia FLAG o equivalente que puede fusionarse mediante, por ejemplo, una secuencia eliminable por proteasas. Véase, por ejemplo, Hochuli (1989) *Chemische Industrie* 12:69-70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" en Setlow (ed.) *Genetic Engineering. Principle and Methods* 12:87-98, Plenum Press, NY; y Crowe et al. (1992) *OIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System* QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA.

Las técnicas inmunológicas estándar están descritas en, por ejemplo, Hertenberg et al. (eds. 1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology* vols. 1-4, Blackwell Science; Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene, NY; y *Methods in Enzymology* vols. 70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162 y 163. Ensayos de citocinas se describen en, por ejemplo, Thomson (ed. 1994) *The Cytokine Handbook* (2ª ed.) Academic Press, San Diego; Metcalf y Nicola (1995) *The Hematopoietic Colony Stimulating Factors*, Cambridge University Press; y Aggarwal y Gutterman (1991) *Human Cytokines*, Blackwell Pub.

Los ensayos para determinar actividades biológicas vasculares son bien conocidos en la técnica. Cubrirán las actividades angiogénica y angiostática en tumores u otros tejidos, por ejemplo, la proliferación del músculo liso arterial (Véase, por ejemplo, Koyoma et al. (1996) *Cell* 87:1069-1078), la adhesión de monocitos al epitelio vascular (véase, McEvoy et al. (1997) *J. Exp. Med.* 185:2069-2077), etc. Véase también Ross (1993) *Nature* 362:801-809; Rekhter y Gordon (1995) *Am. J. Pathol.* 147:668-677; Thyberg et al. (1990) *Atherosclerosis* 10:966-990; y Gumbiner (1996) *Cell* 84:345-357.

Los ensayos para determinar actividades biológicas de células neurales se describen en, por ejemplo, Wouterlood (ed. 1995) *Neuroscience Protocols Modules 10*, Elsevier; *Methods in Neurosciences*, Academic Press; y *Neuromethods* Humana Press, Totowa, NJ. La metodología de sistemas del desarrollo se describe en, por ejemplo, Meisami (ed.) *Handbook of Human Growth and Developmental Biology*, CRC Press; y Chrispeels (ed.) *Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology Interscience*.

Los análisis de FACS se describen en Melamed et al. (1990) *Flow Cytometry and Sorting*, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY; Shapiro (1988) *Practical Flow Cytometry*, Liss, Nueva York, NY; y Robinson et al. (1993) *Handbook of Flow Cytometry Methods*, Wiley-Liss, Nueva York, NY.

II. Clonación de la IL-B30 Humana

La secuencia del gen se proporciona en la Tabla 1. La secuencia deriva de una biblioteca de ADNc producida a partir de melanocitos, corazón fetal y útero grávido. Se ha encontrado también a partir de una secuencia de ADNc derivada de un islote pancreático. Estas secuencias permiten la preparación de cebadores para PCR, o de sondas, para determinar la distribución celular del gen. Las secuencias permiten el aislamiento de ADN genómico que codifica el mensaje.

Utilizando la sonda o los cebadores para PCR, se sondan varios tejidos o tipos celulares para determinar la distribución celular. Los productos de la PCR se clonan utilizando, por ejemplo, el kit de clonación TA (Invitrogen). Los plásmidos de ADNc resultantes se secuencian a partir de ambos extremos en un secuenciador automático (Applied Biosystems).

III. Expresión Celular de IL-B30

Se preparan una sonda o cebadores adecuados específicos para el ADNc que codifica la IL-B30 de primates. Típicamente, la sonda se marca mediante, por ejemplo, un cebado aleatorio. La expresión está probablemente en los tipos celulares descritos y quizá también en los islotes pancreáticos. Análisis Southern: ADN (5 µg) de una biblioteca de ADNc amplificado primario fue digerido con los enzimas de restricción adecuados para liberar los insertos, procesado en un gel de agarosa al 1% y transferido a una membrana de nailon (Schleicher y Schuell, Keene, NH).

Las muestras para el aislamiento de ARNm humano incluyen: células mononucleares de sangre periférica (monocitos, células T, células NK, granulocitos, células B), en reposo (T100); células mononucleares de sangre periférica activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 12 horas, agrupadas (T101); células T, clon de TH0 Mot 72, en reposo (T102); células T, clon de TH0 Mot 72, activadas con anti-CD28 y anti-CD3 durante 3, 6, 12 horas, agrupadas (T103); células T, clon de TH0 Mot 72, anérgicas tratadas con un péptido específico durante 2, 7, 12 horas, agrupadas (T104); células T, clon de TH1 HY06, en reposo (T107); células T, clon de TH1 HY06, activadas con anti-CD28 y anti-CD3 durante 3, 6, 12 horas, agrupadas (T108); células T, clon de TH1 HY06, anérgicas tratadas con un péptido específico durante 2, 6, 12 horas, agrupadas (T109); células T, clon de TH2 HY935, en reposo (T110); células T, clon de TH2 HY935, activadas con anti-CD28 y anti-CD3 durante 2, 7, 12 horas, agrupadas (T111); las líneas tumorales de células T Jurkat y Hut78, en reposo (T117); clones de células T, agrupados AD130.2, Tc783.12, Tc783.13, Tc783.58, Tc782.69, en reposo (T118); células T, clones de células T γδ aleatorios, en reposo (T119); clon de células T CD28-; esplenocitos, en reposo (B100); esplenocitos, activados con anti-CD40 e IL-4 (B101); líneas de EBV de células B agrupadas WT49, RSB, JY, CVIR, 721.221, RM3, HSY, en reposo (B102); línea JY de células B, activadas con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupadas (B103); clones de NK 20 agrupadas, en reposo (K100); clones de NK 20 agrupados, activados con PMA e ionomicina durante 6 horas (K101); clon de NKL, derivado de sangre periférica de un paciente con leucemia LGL, tratado con IL-2 (K106); línea TF1 de precursores hematopoyéticos, activada con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupadas (C100); línea premonocítica U937, en reposo (M100); línea premonocítica U937, activada con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupada (M101); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , anti-IL-10 durante 1, 2, 6, 12, 24 horas, agrupados (M102); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , IL-10 durante 1, 2, 6, 12, 24 horas, agrupados (M103); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , anti-IL-10 durante 4, 16 horas, agrupados (M106); monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , IL-10 durante 4, 16 horas, agrupados (M107); monocitos elutriados, activados con LPS durante 1 hora (M108); monocitos elutriados, activados con LPS durante 6 horas (M109); DC 70% CD1a+, de CD34+ GM-CSF, TNF α 12 días, en reposo (D101); DC 70% CD1a+, a partir de CD34+ GM-CSF, TNF α 12 días, activadas con PMA e ionomicina durante 1 hora (D102); DC 70% CD1a+, procedentes de CD34+ GM-CSF, TNF α 12 días, activadas con PMA e ionomicina durante 6 horas (D103); DC 95% CD1a+, procedentes de CD34+ GM-CSF, TNF α 12 días, seleccionadas mediante FACS, activadas con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupadas

(D104); DC 95% CD14+, ex CD34+ GM-CSF, TNF α 12 días, seleccionadas mediante FACS, activadas con PMA e ionomicina, 1, 6 horas, agrupadas (D105); DC CD1a+ CD86+, procedentes de CD34+ GM-CSF, TNF α 12 días seleccionadas mediante FACS, activadas con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupadas (D106); DC procedentes de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, en reposo (D107); DC procedentes de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, en reposo (D108); DC de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, activadas con LPS 4, 16 horas, agrupadas (D109); DC de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, activadas con TNF α , sobrenadante de monocitos durante 4, 16 horas, agrupadas (D110); células epiteliales sin estimular; células epiteliales, activadas con IL-1 β ; línea de sarcoma de fibroblastos pulmonares MRC5, activados con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupados (C101); línea celular de carcinoma epitelial de riñón CHA, activada con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupadas (C102). La expresión del transcrito de IL-B30 era muy elevada en monocitos elutriados activados con LPS, IFN γ , anti-IL-10 durante 4, 16 horas, agrupados (M106); monocitos elutriados activados con LPS, IFN γ , anti-IL-10 durante 1, 2, 6, 12, 24 horas, agrupados (M102); monocitos elutriados activados con LPS durante 6 horas (M109) y en monocitos elutriados activados con LPS durante 1 hora (M108). La expresión era elevada en DC 95% CD1a+, procedentes de CD34+ GM-CSF, TNF α durante 12 días seleccionadas mediante FACS, activadas con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupadas (D104); y en clones de NK 20 agrupados, activados con PMA e ionomicina durante 6 horas (K101). Se detectó una menor expresión en DC 70% CD1a+, procedentes de CD34+ GM-CSF, TNF α durante 12 días, activadas con PMA e ionomicina durante 6 horas (D103); en DC 70% CD1a+, procedentes de CD34+ GM-CSF, TNF α 12 días, activadas con PMA e ionomicina durante 1 hora (D102); en células T, clon de TH1 HY06, anérgicas tratadas con un péptido específico durante 2, 6, 12 horas agrupadas (T109); en células mononucleares de sangre periférica activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 12 horas, agrupadas (T101); en células T, clon de TH0 Mot 72, activadas con anti-CD28 y anti-CD3 durante 3, 6, 12 horas, agrupadas (T103); en esplenocitos activados con anti-CD40 e IL-4 (B101); en células T, clon de TH0 Mot 72, anérgicas tratadas con un péptido específico durante 2, 7, 12 horas, agrupadas (T104); en esplenocitos en reposo (B100); en células T, clon de TH1 HY06, activadas con anti-CD28 y anti-CD3 durante 3, 6, 12 horas, agrupadas (T108); en células epiteliales activadas con IL-1 β ; en monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , IL-10 durante 4, 16 horas, agrupados (M107); y en la línea de células B JY, activadas con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupadas (B103). Se observó una expresión detectable en DC procedentes de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, activadas con LPS 4, 16 horas, agrupadas (D109); en células T, clon de TH0 Mot 72, en reposo (T102); en células mononucleares de sangre periférica (monocitos, células T, células NK, granulocitos, células B), en reposo (T100); en células T CD4+ CD45RO- polarizadas 27 días en anti-CD28, IL-4 y anti-IFN- γ ; en TH2 polarizadas, activadas con anti-CD3 y anti-CD28 4 horas (T116); en los clones de células T agrupados AD130.2, Tc783.12, Tc783.13, Tc783.58, Tc782.69, en reposo (T118); en la línea premonocítica U937, en reposo (M100); en la línea de precursores hematopoyéticos TF1, activada con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupada (C100); en células T, clon de TH2 HY935, activadas con anti-CD28 y anti-CD3 durante 2, 7, 12 horas, agrupadas (T111); en DC CD1a+ CD86+, procedentes de CD34+ GM-CSF, TNF α 12 días, seleccionadas mediante FACS, activadas con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupadas (D106); en monocitos elutriados, activados con LPS, IFN γ , IL-10 durante 1, 2, 6, 12, 24 horas, agrupados (M103); en DC procedentes de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, activadas con TNF α , sobrenadante de monocitos durante 4, 16 horas, agrupadas (D110); en DC de monocitos GM-CSF, IL-4 5 días, en reposo (D108); en la línea premonocítica U937, activada con PMA e ionomicina durante 1, 6 horas, agrupada (M101); en células T, clones de células T $\gamma\delta$ aleatorios, en reposo (T119) y en células T, clon de TH1 HY06, activadas con anti-CD28 y anti-CD3 durante 3, 6, 12 horas, agrupadas (T108). No se detectó señal en las demás muestras.

En resumen, la distribución muestra una IL-B30 elevada en macrófagos activados, sugiriendo un papel en la inflamación; en células Th1 activadas, sugiriendo un papel regulador o efector en los subgrupos de células T cooperadoras, particularmente en respuestas inmunes de Th1; y en células dendríticas activadas, sugiriendo un papel en la presentación del antígeno o en las interacciones de células T o B del centro germinal con DC.

Las muestras para el aislamiento de ARNm de ratón incluyen: la línea celular L fibroblástica de ratón en reposo (C200); células transfectadas con Braf:ER (fusión de Braf con el receptor de estrógenos), control (C201); células T sin activación previa Me114+ de bazo, en reposo (T209); células T sin activación previa Me114+ de bazo, estimuladas con IFN γ , IL-12 y anti-IL-4 para polarizarlas hacia células TH1, expuestas a IFN γ e IL-4 durante 6, 12, 24 horas, agrupadas (T210); células T sin activación previa Me114+ de bazo, estimuladas con IL-4 y anti-IFN γ para polarizarlas hacia células Th2, expuestas a IL-4 y anti-IFN γ durante 6, 13, 24 horas, agrupadas (T211); células T, polarizadas hacia TH1 (células CD4+, Me114 brillante, de bazo, polarizadas durante 7 días con IFN γ y anti-IL-4; T200); células T, polarizadas hacia TH2 (células CD4+, Me114 brillante, de bazo, polarizadas durante 7 días con IL-4 y anti-IFN γ ; T201); células T, altamente polarizadas 3x hacia TH1 procedentes de Balb/C transgénicos (véase, Openshaw et al. (1995) J. Exp. Med. 182:1357-1367; activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 24 horas, agrupadas; T202); células T, altamente polarizadas 3x hacia TH2 de Balb/C transgénicos (activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 24 horas, agrupadas; T203); células T, altamente polarizadas 3x hacia TH1 procedentes de C57bl/6 transgénicos (activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 24 horas, agrupadas; T212); células T, altamente polarizadas 3x hacia TH2 procedentes de C57bl/6 transgénicos (activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 24 horas, agrupadas; T213); células T, altamente polarizadas hacia TH1 (células T CD4+ sin activación previa procedentes de Balb/C transgénicos, polarizadas 3x con IFN γ , IL-12 y anti-IL-4; estimuladas con IGIF, IL-12 y anti-IL-4 durante 6, 12, 24 horas, agrupadas); células pre T CD44- CD25+, seleccionadas del timo (T204); clon D1.1 de células T TH1, en reposo durante 3 semanas después de la última estimulación con el antígeno (T205); clon D1.1 de células T TH1, estimuladas con 10 μ g/ml de ConA durante 15 horas (T206); clon CDC35 de células T TH2, en reposo durante 3

semanas después de la última estimulación con el antígeno (T207); clon CDC35 de células T TH2, estimuladas con 10 µg/ml de ConA durante 15 horas (T208); línea CH12 de células B sin estimular (B201); línea celular A20 de leucemia de células B maduras sin estimular (B200); células B grandes del bazo sin estimular (B202); células B procedentes del bazo total, activadas con LPS (B203); células dendríticas del bazo enriquecidas con metrizamida, en reposo (D200); células dendríticas de médula ósea, en reposo (D201); células dendríticas derivadas de médula ósea sin estimular reducidas con anti-B220, anti-CD3 y anti-Clase II, cultivadas en GM-CSF e IL-4 (D202); células dendríticas derivadas de médula ósea reducidas con B220, anti-CD3 y anti-Clase II, cultivadas en GM-CSF e IL-4, estimuladas con anti-CD40 durante 1, 5 días, agrupadas (D203); línea celular de monocitos RAW 264.7 activada con LPS durante 4 horas (M200); macrófagos de médula ósea derivados con GM y M-CSF (M201); macrófagos de médula ósea derivados con GM-CSF, estimulados con LPS, IFN-γ e IL-10 durante 24 horas (M205); macrófagos de médula ósea derivados con GM-CSF, estimulados con LPS, IFNγ y anti-IL-10 durante 24 horas (M206); macrófagos peritoneales (M207); línea celular de macrófagos J774, en reposo (M202); línea celular de macrófagos J774 + LPS + anti-IL-10 a 0,5, 1, 3, 6, 12 horas, agrupada (M203); línea celular de macrófagos J774 + LPS + IL-10 a 0,5, 1, 3, 5, 12 horas, agrupada (M204); líneas celulares de mastocitos MC-9 y MCP-12 sin estimular (M208); línea de células endoteliales inmortalizadas derivadas de células endoteliales de la microvasculatura cerebral, sin estimular (E200); línea de células endoteliales inmortalizadas derivadas de células endoteliales de la microvasculatura cerebral, estimuladas durante una noche con TNFα (E201); línea de células endoteliales inmortalizadas derivadas de células endoteliales de la microvasculatura cerebral, estimuladas durante una noche con TNFα (E202); línea de células endoteliales inmortalizadas derivadas de células endoteliales de la microvasculatura cerebral, estimuladas durante una noche con TNFα e IL-10 (E203); aorta total de ratones C57bl/6 de tipo salvaje; aorta total de ratón KO ApoE de 5 meses (X207); aorta total de ratones KO ApoE de 12 meses (X207); timo de tipo salvaje (0214); timo total, rag-1 (0208); riñón total, rag-1 (0209); riñón total, ratón NZ B/W; y corazón total, rag-1 (0202). Se detectó una señal elevada en la línea celular de monocitos RAW 264.7 activados con LPS durante 4 horas (M200); en células T, altamente polarizadas 3x hacia TH1 procedentes de C57bl/6 transgénicos (activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 24 horas, agrupadas; T212); y en células T, altamente polarizadas hacia TH1 (células T CD4+ sin activación previa procedentes de Balb/C transgénicos, polarizadas 3x con IFNγ, IL-12 y anti-IL-4; estimuladas con IGIF, IL-12 y anti-IL-4 durante 6, 12, 24 horas, agrupadas). Se detectaron señales detectables en células T, altamente polarizadas 3x hacia TH1 procedentes de Balb/c transgénicos (véase, Openshaw et al. (1995) J. Exp. Med. 182:1357-1367; activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 24 horas, agrupadas; T202); en células T, polarizadas hacia TH2 (células CD4+, Me114 brillante, de bazo, polarizadas durante 7 días con IL-4 y anti-IFN-γ; T201); en células T, polarizadas hacia TH1 (células CD4+, Me114 brillante, de bazo, polarizadas durante 7 días con IFN-γ y anti-IL-4; T200); en la línea celular de macrófagos J774 + LPS + anti-IL-10 a 0,5, 1, 3, 6, 12 horas, agrupadas (M203); en la línea celular de macrófagos J774, en reposo (M202); en la línea celular de macrófagos J774 + LPS + IL-10 a 0,5, 1, 3, 5, 12 horas, agrupadas (M209); en la línea de células endoteliales inmortalizadas derivadas de células endoteliales de la microvasculatura cerebral, estimuladas durante una noche con TNFα (E201); y en macrófagos de médula ósea derivados con GM-CSF, estimulados con LPS, IFNγ y anti-IL-10 durante 24 horas (M206). Las demás muestras no mostraron ninguna señal. La expresión en la línea celular de monocitos de ratón RAW 264.7 sugiere una fuente natural de la proteína.

40 IV. Mapeo Cromosómico de IL-B30

Se utiliza un ADNc aislado que codifica la IL-B30. El mapeo cromosómico es una técnica estándar. Véase, por ejemplo, BIOS Laboratories (New Haven, CT) y métodos para la utilización de un panel híbrido de células somáticas de ratón con PCR. La evidencia circunstancial sugiere que el gen de IL-B30 de ratón mapea en el cromosoma 10.

45 V. Purificación de la Proteína IL-B30

Múltiples líneas celulares transfectadas son sometidas a cribado para seleccionar una que exprese la citocina a un nivel elevado en comparación con las demás células. Varias líneas celulares son sometidas a cribado y seleccionadas por sus propiedades favorables de manejo. La IL-B30 natural puede ser aislada de fuentes naturales o mediante la expresión por una célula transformada utilizando un vector de expresión adecuado. La purificación de la proteína expresada se lleva a cabo mediante procedimientos estándar, o puede ser combinada con un medio manipulado para conseguir una purificación eficaz con un elevado rendimiento a partir de lisados o sobrenadantes celulares. Pueden utilizarse segmentos FLAG o His₆ para tales características de purificación. Como alternativa, puede utilizarse cromatografía de afinidad con anticuerpos específicos, Véase más adelante.

La proteína se produce en *coli*, células de insecto o en sistemas de expresión de mamífero, según se desee.

60 VI. Aislamiento de Genes de IL-B30 Homólogos

El ADNc de IL-B30, o una secuencia equivalente de otra especie, puede utilizarse como sonda de hibridación para someter a selección una biblioteca procedente de una fuente deseada, por ejemplo, una biblioteca de ADNc de células de primate. Muchas especies diferentes pueden someterse a selección por la rigurosidad necesaria para una hibridación fácil y por la presencia utilizando una sonda. Se utilizarán condiciones de hibridación adecuadas para seleccionar los clones que presenten especificidad de hibridación cruzada.

La selección por hibridación utilizando sondas degeneradas basadas en las secuencias peptídicas permitirá también el aislamiento de clones adecuados. Como alternativa, la utilización de cebadores adecuados para la selección por PCR producirá el enriquecimiento de clones de ácido nucleico adecuados.

- 5 Pueden aplicarse métodos similares para aislar variantes específicas, polimórficas o alélicas. Las variantes específicas se aíslan utilizando técnicas de hibridación de especies cruzadas basadas en el aislamiento de un aislado de longitud completa o un fragmento de una especie como sonda.

- 10 Como alternativa, se utilizarán anticuerpos producidos contra la IL-B30 humana para seleccionar células que expresen proteínas reactivas de manera cruzada procedentes de una biblioteca adecuada, por ejemplo de ADNc. La proteína purificada o los péptidos definidos son útiles para generar anticuerpos mediante métodos estándar, según se describió anteriormente. Los péptidos sintéticos o la proteína purificada se presentan a un sistema inmune para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véase, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene; y Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. Los anticuerpos resultantes son útiles para la selección, la purificación o el diagnóstico, según se ha descrito.

VII. Preparación de Anticuerpos Específicos para IL-B30

- 20 Los péptidos sintéticos o la proteína purificada se presentan a un sistema inmune para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véase, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene; y Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. Puede prepararse suero policlonal o pueden prepararse hibridomas. En situaciones adecuadas, el reactivo de unión se marca según se describió anteriormente mediante, por ejemplo, fluorescencia u otra marca, o bien es inmovilizado en un sustrato para los métodos de cribado en fase sólida ("panning"). La inmunoselección y las técnicas relacionadas están disponibles para preparar reactivos selectivos, según se desee.

VIII. Evaluación de la Amplitud de Funciones Biológicas

- 30 Las actividades biológicas de IL-B30 fueron analizadas basándose en la secuencia y la homología estructural entre IL-B30 e IL-6 y G-CSF. Inicialmente, se examinaron los ensayos que habían mostrado actividades biológicas de IL-6 o de G-CSF.

A. Efectos sobre la proliferación de las células

- 35 El efecto sobre la proliferación de varios tipos celulares se evalúa con diferentes concentraciones de la citocina. Se realiza un análisis respuesta a la dosis en combinaciones con las citocinas relacionadas IL-6, G-CSF, etc.

B. Efectos sobre la expresión de moléculas en la superficie celular de monocitos humanos

- 40 Los monocitos se purifican mediante selección negativa de células mononucleares de sangre periférica procedentes de donantes sanos normales. Brevemente, 3×10^8 células mononucleares bandeadas en Ficoll son incubadas sobre hielo con un cóctel de anticuerpos monoclonales (Becton-Dickinson; Mountain View, CA) que consta de, por ejemplo, 200 μ l de α CD2 (Leu-5A), 200 μ l de α CD3 (Leu-4), 100 μ l de α CD8 (Leu-2a), 100 μ l de α CD19 (Leu-12), 100 μ l de α CD20 (Leu-16), 100 μ l de α CD56 (Leu-19), 100 μ l de α CD67 (IOM 67; Immunotech, Westbrook, ME) y un anticuerpo anti-glicoforina (10F7MN, ATCC, Rockville, MD). Las células con el anticuerpo unido son lavadas e incubadas posteriormente con esferas magnéticas que llevaban acoplado anti-IgG de ratón producido en cabra (Dynal, Oslo, Noruega) en una proporción de esferas respecto a células de 20:1. Las células con el anticuerpo unido son separadas de los monocitos mediante la aplicación de un campo magnético. Posteriormente, los monocitos humanos con cultivados en medio de Yssel (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) que contiene un 1% de suero AB humano en ausencia o presencia de IL-B30, IL-6, G-CSF o combinaciones.

- 50 Los análisis de la expresión de moléculas en la superficie celular pueden ser llevados a cabo mediante inmunofluorescencia directa. Por ejemplo, 2×10^5 monocitos humanos purificados son incubados en solución salina tamponada con fosfato (PBS) conteniendo un 1% de suero humano sobre hielo durante 20 minutos. Las células son aglutinadas a 200 x g. Las células son resuspendidas en 20 ml de mAb marcado con PE o FITC. Después de una incubación adicional de 20 minutos sobre hielo, las células son lavadas en PBS conteniendo un 1% de suero humano seguido por dos lavados en PBS solo. Las células son fijadas en PBS conteniendo un 1% de paraformaldehído y analizadas en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson; Mountain View, CA). Se utilizan mAbs ejemplares, por ejemplo: CD11b (anti-mac1), CD11c (una gp150/95), CD14 (Leu-M3), CD54 (Leu-54), CD80 (anti-BB1/B7), HLA-DR (L243) de Becton-Dickinson y CD86 (FUN 1; Pharmingen), CD64 (32.2; Medarex), CD40 (mAb89; Schering-Plough France).

C. Efectos de la IL-B30 sobre la producción de citocinas por monocitos humanos

- 65 Los monocitos humanos se aíslan según se ha descrito y se cultivan en medio de Yssel (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) que contiene un 1% de suero AB humano en ausencia o presencia de IL-B30 (material expresado

por baculovirus, dilución 1/100). Además, los monocitos se estimulan con LPS (*E. coli* 0127:B8, Difco) en ausencia o presencia de IL-B30 y se determina mediante ELISA la concentración de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF α , GM-CSF e IL-10) en el sobrenadante del cultivo celular.

- 5 Para la tinción intracitoplásmica de citocinas, los monocitos son cultivados (1 millón/ml) en medio de Yssel en ausencia o presencia de IL-B30 y LPS (*E. coli* 0127:B8, Difco) y 10 mg/ml de Brefeldina A (Epicentre Technologies, Madison, WI) durante 12 horas. Las células son lavadas en PBS e incubadas en una solución de formaldehído al 2%/PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células son lavadas, resuspendidas en tampón de permeabilización (saponina al 0,5% (Sigma) en PBS/BSA (0,5%)/Azida (1 mM)) e incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células (2×10^5) son centrifugadas y resuspendidas en 20 ml de mAbs anticitocina conjugados directamente diluidos 1:10 en tampón de permeabilización durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pueden utilizarse los anticuerpos siguientes: IL-1 α -PE (364-3B3-14); IL-6-PE (MQ2-13A5); TNF α -PE (MAb11); GM-CSF-PE (BVD2-21C11) e IL-12-PE (C11.5.14; Pharmingen, San Diego, CA). Posteriormente, las células son lavadas dos veces en tampón de permeabilización y una vez en PBS/BSA/Azida y analizadas en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson; Mountain View, CA).

D. Efectos de IL-B30 sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas

20 Las PBMC totales se aíslan de las capas leucocitarias de donantes sanos normales mediante centrifugación en Ficoll-Hypaque según está descrito (Boyum et al.). Las PBMC se cultivan en 200 μ l de medio Yssel (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) que contiene un 1% de suero AB humano en placas de 96 pocillos (Falcon, Becton-Dickinson, NJ) en ausencia o presencia de IL-B30. Las células se cultivan en medio solo o bien en combinación con 100 U/ml de IL-2 (R&D Systems) durante 120 horas. Durante las últimas seis horas del cultivo se añade ³H-Timidina (0,1 mCi) y se determina la incorporación de la ³H-Timidina mediante conteo de centelleo líquido.

25 Las proteínas nativas, recombinantes y de fusión se analizarán para determinar la actividad agonista y antagonista en muchos otros sistemas de ensayo biológicos, por ejemplo en células T, en células B, en NK, en macrófagos, en células dendríticas, en progenitores hematopoyéticos, etc. Debido a la relación estructural de IL-6 y G-CSF, se analizarán ensayos relacionados con esas actividades.

30 La IL-B30 se evalúa para determinar su actividad agonista o antagonista en células transfectadas que expresen el receptor de IL-6 o de G-CSF y en controles. Véase, por ejemplo, Ho et al. (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:11267-11271; Ho et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15:5043-5053 y Liu et al. (1994) J. Immunol. 152:1821-1829.

35 La IL-B30 se evalúa para determinar su efecto en la activación de macrófagos/células dendríticas y en ensayos de presentación de antígeno, en la producción de citocinas por células T y la proliferación en respuesta a un estímulo antigénico o alogénico. Véase, por ejemplo, de Waal Malefyt et al. (1991) J. Exp. Med. 174:1209-1220; de Waal Malefyt et al. (1991) J. Exp. Med. 174:915-924; Fiorentino et al. (1991) J. Immunol. 147:3815-3822; Fiorentino et al. (1991) J. Immunol. 146:3444-3451; y Groux et al. (1996) J. Exp. Med. 184:19-29.

40 La IL-B30 se evaluará también para determinar sus efectos sobre la estimulación de células NK. Los ensayos pueden estar basados en, por ejemplo, Hsu et al. (1992) Internat. Immunol. 4:563-569; y Schwarz et al. (1994) J. Immunother. 16:95-104. Los efectos sobre el crecimiento y la diferenciación de células B serán analizados mediante, por ejemplo, la metodología descrita en, por ejemplo, DeFrance et al. (1992) J. Exp. Med. 175:671-682; Rousset et al. (1992) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:1890-1893; incluyendo ensayos del factor de conmutación de IgG2 e IgA2. Observar que, a diferencia de los sobrenadantes de COS7, los sobrenadantes de NIH3T3 y COP no interfieren aparentemente con los ensayos de células B humanas.

IX. Generación y Análisis de Animales Alterados Genéticamente

50 Pueden generarse ratones transgénicos mediante métodos estándar. Dichos animales son útiles para determinar los efectos de la eliminación del gen en tejidos específicos o completamente en todo el organismo. Los mismos pueden proporcionar una percepción interesante sobre el desarrollo del animal o de tejidos particulares en varias etapas. Además, puede evaluarse el efecto sobre diferentes respuestas al estrés biológico. Véase, por ejemplo, Hogan et al. (1995) Manipulating the Mousse Embryo: A Laboratory Manual (2^a ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

60 Se ha generado un ratón transgénico, y aunque el animal parece sobrevivir al nacimiento, no prospera y típicamente muere en pocas semanas. La construcción está basada en un promotor de la actina con un intensificador de CMV, que debe dar lugar a una expresión clara y elevada. Los ratones, igual que los ratones transgénicos para IL-6, son enanos. Además, presentan un abdomen hinchado, inflamación del estómago y de los intestinos, infiltración de células en el hígado y, típicamente, mueren antes del día 50. Estos ratones no se reproducen. Un segundo subgrupo de los ratones transgénicos tiene un fenotipo menos extremo y se están haciendo lugar intentos para que se reproduzcan.

65 Se ha determinado la estructura genómica de la IL-B30 de ratón. Se ha desarrollado una estrategia para la producción de ratones en los que se ha eliminado el gen de IL-B30 ("knock-out") y se ha comenzado a producir

construcciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ácido nucleico natural de la IL-B30 de primate.
La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos natural de la IL-B30 de primate.
La SEQ ID NO: 3 es una secuencia de ácido nucleico natural de la IL-B30 de roedor.
La SEQ ID NO: 4 es una secuencia de aminoácidos natural de la IL-B30 de roedor.
La SEQ ID NO: 5 es una IL-B30 de cerdo.
- 10 La SEQ ID NO: 6 es G-CSF bovino.
La SEQ ID NO: 7 es G-CSF felino.
La SEQ ID NO: 8 es G-CSF humano.
La SEQ ID NO: 9 es G-CSF de ratón.
La SEQ ID NO: 10 es IL-6 de nutria.
- 15 La SEQ ID NO: 11 es IL-6 felina.
La SEQ ID NO: 12 es IL-6 humana.
La SEQ ID NO: 13 es IL-6 de oveja.
La SEQ ID NO: 14 es IL-6 de ratón.
La SEQ ID NO: 15 es MGF de pollo.
- 20 La SEQ ID NO: 16 es una IL-6 vírica, del virus del herpes del sarcoma de Kaposi, KSHV.
(1) INFORMACIÓN GENERAL:
- 25 (i) SOLICITANTE: Schering Corporation
(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: CITOCINA DE MAMÍFERO; REACTIVOS RELACIONADOS
(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 16
(iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:
- 30 (A) DESTINATARIO: Schering Corporation
(B) CALLE: 2000 Galloping Hill Road
(C) CIUDAD: Kenilworth
(D) ESTADO: Nueva Jersey
(E) PAÍS: EE.UU.
(F) ZIP: 07033-0530
- 35 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 40 (A) TIPO DE MEDIO: Disco magnético flexible
(B) ORDENADOR: Power Macintosh 7600/120
(C) SISTEMA OPERATIVO: Windows
(D) PROGRAMA: MS Word
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 45 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE REGISTRO: 24 de Julio de 1998
(C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
- 50 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/900.905
(B) FECHA DE REGISTRO: 25-JULIO-1997
- (viii) INFORMACIÓN SOBRE EL APODERADO/AGENTE:
- 55 (A) NOMBRE: Thampoe, Immac J.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 36.322
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/DOCUMENTO: DX0758K1
- (ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIÓN:
- 60 (A) TELÉFONO: (908) 298-5061
(B) TELEFAX: (908) 298-5388
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:
- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 610 483 T3

(A) LONGITUD: 570 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (ix) CARACTERÍSTICA:

10

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 1..567

(ix) CARACTERÍSTICA:

15

(A) NOMBRE/CLAVE: mat_peptide (péptido maduro)
 (B) LOCALIZACIÓN: 64..567

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

| | |
|---|-----|
| ATG CTG GGG AGC AGA GCT GTA ATG CTG CTG TTG CTG CTG CCC TGG ACA | 48 |
| Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr | |
| -21 -20 -15 -10 | |
| GCT CAG GGC AGA GCT GTG CCT GGG GGC AGC AGC CCT GCC TGG ACT CAG | 96 |
| Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln | |
| -5 1 5 10 | |
| TGC CAG CAG CTT TCA CAG AAG CTC TGC ACA CTG GCC TGG AGT GCA CAT | 144 |
| Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His | |
| 15 20 25 | |
| CCA CTA GTG GGA CAC ATG GAT CTA AGA GAA GAG GGA GAT GAA GAG ACT | 192 |
| Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr | |
| 30 35 40 | |
| ACA AAT GAT GTT CCC CAT ATC CAG TGT GGA GAT GGC TGT GAC CCC CAA | 240 |
| Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln | |
| 45 50 55 | |
| GGA CTC AGG GAC AAC AGT CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CAC CAG GGT | 288 |
| Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly | |
| 60 65 70 75 | |
| CTG ATT TTT TAT GAG AAG CTG CTA GGA TCG GAT ATT TTC ACA GGG GAG | 336 |
| Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu | |
| 80 85 90 | |
| CCT TCT CTG CTC CCT GAT AGC CCT GTG GCG CAG CTT CAT GCC TCC CTA | 384 |
| Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Ala Gln Leu His Ala Ser Leu | |
| 95 100 105 | |
| CTG GGC CTC AGC CAA CTC CTG CAG CCT GAG GGT CAC CAC TGG GAG ACT | 432 |
| Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr | |
| 110 115 120 | |
| CAG CAG ATT CCA AGC CTC AGT CCC AGC CAG CCA TGG CAG CGT CTC CTT | 480 |
| Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu | |
| 125 130 135 | |
| CTC CGC TTC AAA ATC CTT CGC AGC CTC CAG GCC TTT GTG GCT GTA GCC | 528 |
| Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala | |
| 140 145 150 155 | |
| GCC CGG GTC TTT GCC CAT GGA GCA GCA ACC CTG AGT CCC TAA | 570 |
| Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro | |
| 160 165 | |

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 189 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

10 Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr
 -21 -20 -15 -10

Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln
 -5 1 5 10

Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His
 15 20 25

Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr
 30 35 40

Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln
 45 50 55

Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly
 60 65 70 75

Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu
 80 85 90

Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Ala Gln Leu His Ala Ser Leu
 95 100 105

Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr
 110 115 120

Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu
 125 130 135

Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala
 140 145 150 155

Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
 160 165

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 1203 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA: (A) NOMBRE/CLAVE: CDS (B) LOCALIZACIÓN: 113..700

- 25 (ix) CARACTERÍSTICA: (A) NOMBRE/CLAVE: mat_peptide (péptido maduro) (B) LOCALIZACIÓN: 176..700

ES 2 610 483 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

| | |
|---|-----------------|
| CGCTTAGAAG TCGGACTACA GAGTTAGACT CAGAACCAAA GGAGGTGGAT AGGGGGTCCA | 60 |
| CAGGCCTGGT GCAGATCACA GAGCCAGCCA GATCTGAGAA GCAGGGAACA AG ATG | 115 |
| | Met -21 |
| CTG GAT TGC AGA GCA GTA ATA ATG CTA TGG CTG TTG CCC TGG GTC ACT | 163 |
| Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val Thr | |
| -20 | -15 -10 -5 |
| CAG GGC CTG GCT GTG CCT AGG AGT AGC AGT CCT GAC TGG GCT CAG TGC | 211 |
| Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys | |
| | 1 5 10 |
| CAG CAG CTC TCT CGG AAT CTC TGC ATG CTA GCC TGG AAC GCA CAT GCA | 259 |
| Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala | |
| | 15 20 25 |
| CCA GCG GGA CAT ATG AAT CTA CTA AGA GAA GAA GAG GAT GAA GAG ACT | 307 |
| Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr | |
| | 30 35 40 |
| AAA AAT AAT GTG CCC CGT ATC CAG TGT GAA GAT GGT TGT GAC CCA CAA | 355 |
| Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln | |
| | 45 50 55 60 |
| GGA CTC AAG GAC AAC AGC CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CGC CAA GGT | 403 |
| Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly | |
| | 65 70 75 |
| CTG GCT TTT TAT AAG CAC CTG CTT GAC TCT GAC ATC TTC AAA GGG GAG | 451 |
| Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu | |
| | 80 85 90 |
| CCT GCT CTA CTC CCT GAT AGC CCC ATG GAG CAA CTT CAC ACC TCC CTA | 499 |
| Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu | |
| | 95 100 105 |
| CTA GGA CTC AGC CAA CTC CTC CAG CCA GAG GAT CAC CCC CGG GAG ACC | 547 |
| Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr | |
| | 110 115 120 |
| CAA CAG ATG CCC AGC CTG AGT TCT AGT CAG CAG TGG CAG CGC CCC CTT | 595 |
| Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu | |
| | 125 130 135 140 |
| CTC CGT TCC AAG ATC CTT CGA AGC CTC CAG GCC TTT TTG GCC ATA GCT | 643 |
| Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala | |
| | 145 150 155 |

ES 2 610 483 T3

GCC CGG GTC TTT GCC CAC GGA GCA GCA ACT CTG ACT GAG CCC TTA GTG 691
 Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val
 160 165 170

CCA ACA GCT TAAGGATGCC CAGGTTCCCA TGGCTACCAT GATAAGACTA 740
 Pro Thr Ala
 175

ATCTATCAGC CCAGACATCT ACCAGTTAAT TAACCCATTA GGACTTGTGC TGTTCCTGTT 800

TCGTTTGTTT TGCCTGAAGG GCAAGGACAC CATTATTAAA GAGAAAAGAA ACAAACCCCA 860

GAGCAGGCAG CTGGCTAGAG AAAGGAGCTG GAGAAGAAGA ATAAAGTCTC GAGCCCTGG 920

CCTTGGAAGC GGGCAAGCAG CTGCGTGGCC TGAGGGGAAG GGGCGGTGG CATCGAGAAA 980

CTGTGAGAAA ACCCAGAGCA TCAGAAAAAG TGAGCCCAGG CTTTGGCCAT TATCTGTAAG 1040

AAAAACAAGA AAAGGGGAAC ATTATACTTT CCTGGGTGGC TCAGGGAAAT GTGCAGATGC 1100

ACAGTACTCC AGACAGCAGC TCTGTACCTG CCTGCTCTGT CCCTCAGTTC TAACAGAATC 1160

TAGTCACTAA GAACTAACAG GACTACCAAT ACGAACTGAC AAA 1203

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 196 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

Met Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val
 -21 -20 -15 -10

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

Cys Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His
 15 20 25

Ala Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu
 30 35 40

Thr Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro
 45 50 55

Gln Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln
 60 65 70 75

Gly Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly
 80 85 90

Glu Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser
 95 100 105

Leu Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu
 110 115 120

15

ES 2 610 483 T3

Thr Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro
 125 130 135

Leu Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile
 140 145 150 155

Ala Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu
 160 165 170

Val Pro Thr Ala
 175

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 102 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

15

Ser Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly Leu Val Phe Tyr Glu Lys Leu
 1 5 10 15

Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu Pro Ser Leu His Pro Asp Gly
 20 25 30

Ser Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu Leu Gly Leu Arg Gln Leu Leu
 35 40 45

Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr Glu Gln Thr Pro Ser Pro Ser
 50 55 60

Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu Leu Arg Leu Lys Ile Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala Ala Arg Val Phe Ala His Gly
 85 90 95

Ala Ala Thr Leu Ser Gln
 100

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 174 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

30

ES 2 610 483 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 174 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

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

ES 2 610 483 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 177 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

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

15

ES 2 610 483 T3

Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp
 145 150 155 160

Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly
 165 170 175

Pro

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 9:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 178 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

15

Val Pro Leu Val Thr Val Ser Ala Leu Pro Pro Ser Leu Pro Leu Pro
 1 5 10 15

Arg Ser Phe Leu Leu Lys Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala
 20 25 30

Ser Gly Ser Val Leu Leu Glu Gln Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys
 35 40 45

His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Lys
 50 55 60

Ala Ser Leu Ser Gly Cys Ser Ser Gln Ala Leu Gln Gln Thr Gln Cys
 65 70 75 80

Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Cys Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln
 85 90 95

Ala Leu Ser Gly Ile Ser Pro Ala Leu Ala Pro Thr Leu Asp Leu Leu
 100 105 110

Gln Leu Asp Val Ala Asn Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu
 115 120 125

Asn Leu Gly Val Ala Pro Thr Val Gln Pro Thr Gln Ser Ala Met Pro
 130 135 140

Ala Phe Thr Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Ala Ile
 145 150 155 160

Ser Tyr Leu Gln Gly Phe Leu Glu Thr Ala Arg Leu Ala Leu His His
 165 170 175

Leu Ala

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 10:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 186 aminoácidos

- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 11:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 183 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 12:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 188 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

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

15

ES 2 610 483 T3

Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn
 50 55 60

Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser
 65 70 75 80

Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu
 85 90 95

Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser
 100 105 110

Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln
 115 120 125

Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp
 130 135 140

Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln
 145 150 155 160

Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu
 165 170 175

Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
 180 185

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 13:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 184 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

Ala Phe Pro Thr Pro Gly Pro Leu Gly Glu Asp Phe Lys Asn Asp Thr
 1 5 10 15

Thr Pro Ser Arg Leu Leu Leu Thr Thr Pro Glu Lys Thr Glu Ala Leu
 20 25 30

Ile Lys His Ile Val Asp Lys Ile Ser Ala Ile Arg Lys Glu Ile Cys
 35 40 45

Glu Lys Asn Asp Glu Cys Glu Asn Ser Lys Glu Thr Leu Ala Glu Asn
 50 55 60

Lys Leu Lys Leu Pro Lys Met Glu Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser
 65 70 75 80

Gly Phe Asn Gln Ala Ile Cys Leu Ile Lys Thr Thr Ala Gly Leu Leu
 85 90 95

Glu Tyr Gln Ile Tyr Leu Asp Phe Leu Gln Asn Glu Phe Glu Gly Asn
 100 105 110

15

Gln Glu Thr Val Met Glu Leu Gln Ser Ser Ile Arg Thr Leu Ile Gln
 115 120 125

Ile Leu Lys Glu Lys Ile Ala Gly Leu Ile Thr Thr Pro Ala Thr His
 130 135 140

Thr Asp Met Leu Glu Lys Met Gln Ser Ser Asn Glu Trp Val Lys Asn
 145 150 155 160

Ala Lys Val Ile Ile Ile Leu Arg Ser Leu Glu Asn Phe Leu Gln Phe
 165 170 175

Ser Leu Arg Ala Ile Arg Met Lys
 180

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 14:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 188 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

Ala Phe Pro Thr Ser Gln Val Arg Arg Gly Asp Phe Thr Glu Asp Thr
 1 5 10 15

Thr Pro Asn Arg Pro Val Tyr Thr Thr Ser Gln Val Gly Gly Leu Ile
 20 25 30

Thr His Val Leu Trp Glu Ile Val Glu Met Arg Lys Glu Leu Cys Asn
 35 40 45

Gly Asn Ser Asp Cys Met Asn Asn Asp Asp Ala Leu Ala Glu Asn Asn
 50 55 60

Leu Lys Leu Pro Glu Ile Gln Arg Asn Asp Gly Cys Tyr Gln Thr Gly
 65 70 75 80

Tyr Asn Gln Glu Ile Cys Leu Leu Lys Ile Ser Ser Gly Leu Leu Glu
 85 90 95

Tyr His Ser Tyr Leu Glu Tyr Met Lys Asn Asn Leu Lys Asp Asn Lys
 100 105 110

Lys Asp Lys Ala Arg Val Leu Gln Arg Asp Thr Glu Thr Leu Ile His
 115 120 125

Ile Phe Asn Gln Glu Val Lys Asp Leu His Lys Ile Val Leu Pro Thr
 130 135 140

Pro Ile Ser Asn Ala Leu Leu Thr Asp Lys Leu Glu Ser Gln Lys Glu
 145 150 155 160

Trp Leu Arg Thr Lys Thr Ile Gln Phe Ile Leu Lys Ser Leu Glu Glu
 165 170 175

Phe Leu Lys Val Thr Leu Arg Ser Thr Arg Gln Thr
 180 185

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 178 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

Ala Pro Leu Ala Glu Leu Ser Gly Asp His Asp Phe Gln Leu Phe Leu
 1 5 10 15

His Lys Asn Leu Glu Phe Thr Arg Lys Ile Arg Gly Asp Val Ala Ala
 20 25 30

Leu Gln Arg Ala Val Cys Asp Thr Phe Gln Leu Cys Thr Glu Glu Glu
 35 40 45

Leu Gln Leu Val Gln Pro Asp Pro His Leu Val Gln Ala Pro Leu Asp
 50 55 60

Gln Cys His Lys Arg Gly Phe Gln Ala Glu Val Cys Phe Thr Gln Ile
 65 70 75 80

Arg Ala Gly Leu His Ala Tyr His Asp Ser Leu Gly Ala Val Leu Arg
 85 90 95

Leu Leu Pro Asn His Thr Thr Leu Val Glu Thr Leu Gln Leu Asp Ala
 100 105 110

Ala Asn Leu Ser Ser Asn Ile Gln Gln Gln Met Glu Asp Leu Gly Leu
 115 120 125

Asp Thr Val Thr Leu Pro Ala Glu Gln Arg Ser Pro Pro Pro Thr Phe
 130 135 140

Ser Gly Pro Phe Gln Gln Gln Val Gly Gly Phe Phe Ile Leu Ala Asn
 145 150 155 160

Phe Gln Arg Phe Leu Glu Thr Ala Tyr Arg Ala Leu Arg His Leu Ala
 165 170 175

Arg Leu

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 185 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE HEBRA: no relevante
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

ES 2 610 483 T3

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la secuencia de aminoácidos madura de SEQ ID NO: 2 o 4 o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 5 o 7 sustituciones de aminoácidos conservativas.
2. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une específicamente a la secuencia de aminoácidos madura de SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 5 o 7 sustituciones de aminoácidos conservativas.
- 10 3. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.
4. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión es:
- 15 a) un fragmento Fab;
b) un fragmento Fab';
c) un fragmento F(ab)₂; o
d) un anticuerpo monocatenario.
- 20 5. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo quimérico o humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 25 6. Una composición estéril que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Una formulación farmacéutica que comprende:
- 30 a) el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5; y
b) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.