

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 079**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2010** **PCT/US2010/047461**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011** **WO11031600**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2010** **E 10815921 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 2475388**

54 Título: **Uso de antagonistas de IL-33 para tratar enfermedades fibróticas**

30 Prioridad:

10.09.2009 US 241324 P

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

16.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

RANKIN, ANDREW, L.;
PFLANZ, STEFAN y
MUMM, JOHN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 655 079 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

Uso de antagonistas de IL-33 para tratar enfermedades fibróticas

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere en general a métodos para tratar enfermedades fibróticas que implican los agentes que antagonizan la IL-33.

10 **Antecedentes de la invención**

La fibrosis se caracteriza por el exceso de acumulación de componentes de la matriz extracelular (ECM) que incluyen colágeno. Wynn (2008) J. Pathol. 214:199-210; Sivakumar y Das (2008) Inflamm. Res. 57:410-418. Se piensa que la fibrosis es una consecuencia de una irritación o daño tisular crónicos. Wynn (2008) J. Pathol. 214:199-210; Friedman (2008) Gastroenterology 134:1655-1669; Trojanowska y Varga (2007) Curr. Opin. Rheumatol. 19:568-573; Selman y Pardo (2006) Proc. Am. Thorac. Soc. 3:364-372. El remplazo progresivo con ECM de los tejidos parenquimatosos se observó en las enfermedades fibróticas tales como la esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar idiopática y cirrosis hepática, dando lugar a la alteración de la función del órgano. Se estima que la fibrosis contribuye a casi un 45 % de las muertes en el mundo desarrollado. Sin embargo, los factores celulares y moleculares que sostienen la cascada fibrótica siguen estando poco entendidos.

La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) es una enfermedad pulmonar no neoplásica caracterizada por la excesiva fibrosis (formación de tejido cicatricial) en el pulmón. Meltzer y Noble (2008) Orphanet J. Rare Dis. 3:8. Se estima que la IPF afecta a cinco millones de personas en el mundo, con una edad media de presentación de 66 años. La IPF normalmente es progresiva, con una supervivencia media de 2 a 5 años desde el diagnóstico. Id. El trasplante de pulmón es la única terapia eficaz actualmente. Véase también, Mendelian Inheritance in Man N° 178500, disponible en el sitio de internet de los Institutos Nacionales de la Salud de EE. UU. NCBI/OMIM. La etiología de la IPF no se entiende completamente.

La escleroderma (a la que también se hace referencia como esclerosis sistémica, o SSC) es una enfermedad autoinmunitaria del tejido conjuntivo que se caracteriza por una fibrosis extensa de la piel y órganos viscerales, así como la obliteración de la luz de pequeñas arterias. Gabrielli et al. (2007) Curr. Op. Immunol. 19:640. La progresión puede dar lugar a rigidez de la piel y daño del tracto gastrointestinal, pulmones, corazón y riñones. Se estima que 300.000 personas tienen escleroderma en los Estados Unidos, superando las mujeres a los hombres 4:1, y con una media de edad al diagnóstico a los 40. Se han observado comúnmente autoanticuerpos contra varios antígenos intracelulares (nucleares), y aunque su presencia es útil para el diagnóstico, no hay todavía una prueba directa que una estos anticuerpos a la patogénesis de la enfermedad. No hay actualmente una cura para la escleroderma, aunque a menudo está disponible el tratamiento de sus distintos síntomas.

Existe una necesidad de métodos mejorados para tratar las enfermedades fibróticas, tales como fibrosis pulmonar idiopática y escleroderma.

Sumario de la invención

La presente divulgación cumple con estas necesidades y más proporcionando métodos para tratar las enfermedades fibróticas que comprenden la administración de un antagonista de la IL-33.

En una realización, la fibrosis es una fibrosis de un tejido de la barrera epitelial, tal como la piel, pulmón o intestino. En distintas realizaciones, la enfermedad fibrótica se selecciona de entre el grupo que consiste en esofagitis eosinofílica, síndromes hipereosinofílicos (HES), endomiocarditis de Loeffler, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática, y escleroderma. En realizaciones específicas, la enfermedad fibrótica es la fibrosis pulmonar idiopática y escleroderma.

En distintas realizaciones, el antagonista de la IL-33 se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo antagonista (o fragmento de unión al antígeno del mismo), una molécula pequeña, un polipéptido ST2 soluble, o un inhibidor de la expresión de un ácido nucleico (tal como un ácido nucleico antisentido o una molécula de ARNip). En una realización específica, el antagonista de la IL-33 es un anticuerpo antagonista o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

60 **Breve descripción de los dibujos**

Las FIG. 1A-D presentan los resultados obtenidos cuando se inyectaba por vía subcutánea la IL-33 en ratones, como se describe con más detalle en el Ejemplo 3.

La FIG. 1A presenta fotomicrografías de secciones de piel representativas obtenidas de ratones inyectados con albúmina sérica (MSA) (control) o ratones inyectados con IL-33 (IL-33) teñidas con H-E. En esta y otras figuras del presente documento, la letra "A" en la fotomicrografía indica el tejido adiposo subcutáneo y "F" indica una

región más oscura de alguna manera del tejido subcutáneo fibrótico, que está presente solo en el tejido tratado con IL-33. En esta y otras figuras del presente documento, la barra de escala indica 200 mm.

La FIG. 1B muestra el contenido de colágeno (mg) en punciones dérmicas aisladas de ratones inyectados con MSA-(control) o IL-33. Los símbolos indican los valores obtenidos de ratones individuales y las líneas indican los valores medios a lo largo de las figuras. ***, $p = 0,001$; Ensayo t de Student.

La FIG. 1C muestra el número de eosinófilos en secciones de piel obtenidas de ratones inyectados con MSA-(círculos huecos) o IL-33 (círculos sólidos). ***, $p = 0,001$; Ensayo t de Student.

La FIG. 1D muestra el número de células CD3⁺ en secciones de piel obtenidas de ratones inyectados con MSA-(control) o IL-33 (círculos sólidos). Los experimentos se repitieron independientemente al menos dos veces con resultados comparables.

La FIG. 2 presenta fotomicrografías de secciones de piel representativas teñidas con H-E obtenidas de ratones B6/129F2 y C57B1/6 de tipo silvestre (fila superior), así como ratones IL-1RAcP^{-/-} B6/129F2 y ST2^{-/-} C57B1/6 (fila inferior), que se habían inyectado todos ellos con IL-33. Los experimentos se llevaron a cabo al menos con 5 ratones por grupo y se repitieron independientemente al menos dos veces con resultados comparables. Véase el Ejemplo 4.

Las FIG. 3A-3D presenta el análisis TAQman® de expresión genética en tiempo real de la expresión de ARNm de distintos genes en las muestras de piel obtenidas de ratones inyectados con MSA-(círculos huecos) o IL-33 (círculos sólidos). La FIG. 3A muestra los resultados para las citocinas Th2 IL-4, IL-5 e IL-13. Las FIG. 3B y 3C muestran los resultados de distintos genes asociados con la ECM (colágeno VIa, colágeno IIIa, fibronectina, TIMP1, MMP-12 y MMP-13). La FIG. 3D muestra los resultados del TGF-β. Los puntos de datos individuales representan valores obtenidos de ratones individuales; las líneas indican el resultado medio. Los experimentos se repitieron independientemente al menos dos veces con resultados comparables. ***, $p = 0,008$; **, $p = 0,016$; *, $p = 0,032$; Ensayo U de Mann-Whitney. Véase el Ejemplo 5.

La FIG. 4 proporciona los niveles de expresión media (y errores estándar) de distintos genes asociados con la matriz extracelular (ECM) en las muestras de piel obtenidas de ratones inyectados con MSA-("control") o IL-33 (N = 5 ratones/afección). Los niveles de expresión se determinaron por un análisis TAQman® de expresión genética en tiempo real. La FIG. 4 también proporciona la relación de expresión en células KO a IL-33 y los niveles de la expresión en controles calculados utilizando el ensayo U de Mann-Whitney.

Las FIG. 5A-5G presentan los resultados de los experimentos para evaluar el papel de la IL-13 en las respuestas a IL-33, como se describe con más detalle en el Ejemplo 6.

La FIG. 5A presenta fotomicrografías de secciones de piel representativas obtenidas de ratones de tipo silvestre (TS) o IL-13 KO (IL-13^{-/-}) inyectados con IL-33, teñidas con H-E.

La FIG. 5B muestra el contenido de colágeno (mg) en punciones dérmicas obtenidas de ratones tratados con MSA-(control) y con IL-33 (IL-33) de tipo silvestre (TS) y IL-13^{-/-} (KO). Los símbolos representan los valores obtenidos de ratones individuales y las líneas indican los valores medios a lo largo de la figura. ***, $p < 0,0001$; Ensayo t de Student.

La FIG. 5C muestran el análisis TAQman® de expresión genética en tiempo real de los genes de colágeno VIa y colágeno IIIa en ratones de tipo silvestre e IL-13^{-/-} (KO) tratados con IL-33.

La FIG. 5D muestra un análisis TAQman® de expresión genética en tiempo real de los genes MMP12, MMP13 y TIMP1 en ratones de tipo silvestre (TS) e IL-13^{-/-} (KO) tratados con IL-33. ***, $p = 0,008$; *, $p = 0,016$. Ensayo U de Mann-Whitney.

La FIG. 5E muestra un análisis TAQman® de expresión genética en tiempo real de fibronectina en muestras de piel individuales obtenidas de ratones tratados con MSA-(control) o de tipo silvestre (TS) e IL-13^{-/-} (KO) tratados con IL-33.

La FIG. 5F muestra el número de eosinófilos en secciones de piel obtenidas de ratones de tipo silvestre (TS) o IL-13^{-/-} (KO) inyectados con IL-33.

Descripción detallada

. Los números de registro de GenBank de las secuencias de ácido nucleico y proteínas a los que se hace referencia en el presente documento se refiere a los contenidos de la base de datos a la fecha de presentación de la presente solicitud. Aunque dichas entradas de la base de datos se pueden modificar posteriormente, el GenBank mantiene un registro público de todas las versiones anteriores de las secuencias en función de la fecha, haciendo que dichas entradas en la base de datos sea una referencia sin ambigüedad para una secuencia específica.

. La cita de referencias en el presente documento no tiene la intención de ser una admisión de que la referencia sea una técnica anterior relevante, ni constituye una admisión de los contenidos o fecha de estas publicaciones o documentos.

I. Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras tales como "un", "una", y "el", incluyen sus correspondientes referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

“Aproximadamente” como se utiliza en el presente documento, se refiere al valor de un parámetro medido con el grado de precisión que se típico en la técnica. Específicamente, se refiere a un valor que estaría en las tolerancias típicas de dicho parámetro, como entiende un experto en la técnica.

5 Como se utiliza en el presente documento, a menos de que se indique otra cosa (por ejemplo, IL-33), la forma “madura” de una proteína se refiere a la cadena polipeptídica que permanece después de retirar la secuencia de señal (péptido líder), por ejemplo, la forma de la proteína que se secreta de la célula. Las secuencias de señal de las proteínas desveladas en el presente documento se enumeran en el Listado de Secuencias.

10 como se utiliza en el presente documento, “tejido de barrera epitelial” se refiere a los tejidos que tienen un contacto regular con el ambiente externo y proporciona una función de barrera. Los tejidos de barrera epitelial a modo de ejemplo incluyen la piel, pulmón e intestino.

15 Como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” puede referirse a cualquier forma de anticuerpo que presenta la actividad biológica deseada. Por lo tanto, se utiliza en un amplio sentido y específicamente cubre los anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos, etc., a condición de que presenten la actividad biológica deseada.

20 Como se utiliza en el presente documento, cuando se hace referencia a anticuerpos, las expresiones “fragmento de unión del mismo” o “fragmento de unión al antígeno del mismo” engloba un fragmento o un derivado de un anticuerpo que mantiene aun sustancialmente la capacidad de unirse a su diana. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de
25 cadena sencilla, por ejemplo, scFv; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpo. Normalmente, un fragmento de unión o derivado mantiene al menos un 10 % de su afinidad por su diana, por ejemplo, no más de un cambio de 10 veces en la constante de unión en equilibrio (K_d). Preferentemente, un fragmento de unión o derivado mantiene al menos un 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % (o más) de su afinidad de unión, aunque cualquier fragmento de unión con afinidad suficiente para ejercer el efecto
30 biológico deseado será útil. También se tiene la intención de que, cuando se especifique, un fragmento de unión puede incluir variantes de secuencia con sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Se une “específicamente” o “selectivamente”, cuando se hace referencia a la unión de un anticuerpo a su antígeno, indica una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de
35 proteínas y otros agentes biológicos. Como se entiende comúnmente en el campo, y se reitera en el presente documento por énfasis, un anticuerpo que se dice que se une específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia determinada (por ejemplo, IL-33) se une a los polipéptidos que comprenden la secuencia de IL-33 pero no se une a proteínas que carecen de la secuencia de IL-33. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido comprende IL-33 puede unirse a una forma marcada con FLAG® de IL-33, pero no se unirá a otras
40 proteínas marcadas con FLAG®.

La expresión “anticuerpo monoclonal”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en
45 cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único epítipo antigénico. Por el contrario, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) normalmente incluyen una multitud de anticuerpos dirigidos (o específicos para) diferentes epítopos. El adjetivo “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo de que se obtiene de una población de anticuerpo sustancialmente homogénea, y no se tiene que considerar que necesitan la producción del anticuerpo por cualquier método en particular. Por ejemplo, los
50 anticuerpos monoclonales que se van a utilizar de acuerdo con la presente divulgación se pueden producir por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al. (1975) Nature 256: 495, o se puede producir por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. N° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también se pueden aislar de bibliotecas de fagos utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628 y Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597.

55 Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente los anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una parte de cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga con secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, aunque el resto de la cadena es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, a condición de que presenten la actividad biológica deseada. Pat. de EE. UU. N° 4.816.567; Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855.

60 Como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo humanizado” se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) así como secuencias de anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En

general, los dominios variables de un anticuerpo humanizado comprenderán al menos una, y hasta seis de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) (a las que también se hace referencia como bucles hipervariables) de una inmunoglobulina no humana, con todas o sustancialmente todas las regiones marco conservadas (FR) derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana.

La expresión “anticuerpo completamente humano” se refiere a un anticuerpo que solo comprende secuencias proteicas de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidrato murinas si se produce en un ratón, en una célula de ratón, o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. De manera similar, un “anticuerpo de ratón” o un “anticuerpo de rata” se refieren a un anticuerpo que comprende solamente secuencias de inmunoglobulina de ratón o de rata, respectivamente. Un anticuerpo completamente humano se puede generar en un ser humano, en un animal transgénico que tenga secuencias de la línea germinal de inmunoglobulina humana, por fago de presentación u otros métodos de biología molecular.

“IL-33” se refiere a la interleucina-33 humana, y también se muestra con los alias IL-1F11, NF-HEV, y C9orf26. La IL-33 se describe adicionalmente en internet en Mendelian Inheritance in Man (OMIM) entrada 608678 y con el ID Genético N° 90865, y las secuencias a modo de ejemplo de ácido nucleico y proteína de origen natural para la IL-33 humana se encuentran con los N° de registro en el GenBank NM_033439.2 (SEQ ID NO: 5) y AY905581 (SEQ ID NO: 6), respectivamente, todas ellas disponibles en el sitio de internet del NCBI. Véase también Schmitz et al. (2005) Immunity 23: 479-490. Una forma madura de IL-33 comprende los restos 112-270 de la SEQ ID NO: 6 se ha propuesto que es la forma activa de IL-33. Schmitz et al. (2005) Immunity 23: 479-490.

“ST2” como se utiliza en el presente documento es sinónimo de proteína T1/ST2, y también se conoce como IL-1RL1, DER-4, IL-1R4, Fit-1 e IL-1RL1. El ST2 se describe adicionalmente en el OMIM con la entrada 601203 e ID Genético N° 9173. El “ST2 soluble” (sST2) se refiere a una variante extracelular de la forma unida a la membrana de ST2 (ST2L). Las secuencias de origen natural a modo de ejemplo de sST2 humano se encuentran con los N° de registro en el GenBank NM_003856.2 (SEQ ID NO: 7) / NP_003847 (SEQ ID NO: 8), y secuencias de origen natural a modo de ejemplo del ST2L humano se encuentran como NM_016232.4 (SEQ ID NO: 9) / NP_057316 (SEQ ID NO: 10), todos los cuales están disponibles a través del sitio de internet del NCBI. Como es evidente por la comparación de las SEQ ID NO: 8 y 10, sST2 que comprende los restos 1-323 de ST2L y cinco restos de aminoácidos (SKECF) adicionales en el extremo C.

“IL-1RAcP” significa la proteína accesoria del receptor de interleucina-1, también conocida como IL-1R3 e IL-1RAP. La IL-1RAcP se describe adicionalmente en internet en el OMIM con la entrada 602626 e ID Genético N° 3556, y las secuencias de origen natural para la IL-1RAcP humana se encuentra con los N° de registro en el GenBank NM_134470.2 (SEQ ID NO: 1) / NP_608273 (SEQ ID NO: 2), y NM_002182.2 (SEQ ID NO: 3) / NP_002173 (SEQ ID NO: 4), los cuales están disponibles en el sitio de internet del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

II. Tratamiento de enfermedades fibróticas con antagonistas de IL-33

La IL-33 es el miembro descubierto más recientemente de la familia de citocinas IL-1. Schmitz et al. (2005) Immunity 23:479-490. La IL-33 se expresa constitutivamente en los tejidos barrera tales como la piel donde se encuentra localizada preferentemente en el núcleo de las células epiteliales o endoteliales. Baekkevold et al. (2003) Am. J. Pathol. 163:69-79; Carriere et al. (2007) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 104:282-287; Kuchler et al. (2008) Am. J. Pathol. 173:1229-1242; Moussion et al. (2008) PLoS ONE 3:e3331. El receptor de la IL-33 está compuesto por dos subunidades, IL-1RAcP y ST2. Schmitz et al. (2005) Immunity 23:479-490; Chackerian et al. (2007) J Immunol 179:2551-2555; Pat. de EE. UU. N° 7.560.530.

La IL-1RAcP es expresa ampliamente, mientras que la expresión de ST2 se restringe a los tipos celulares que incluyen células Th2, eosinófilos, basófilos, células T NK y mastocitos. Schmitz et al. (2005) Immunity 23:479-490; Lohning et al. (1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 95:6930-6935; Suzukawa et al. (2008) Lab. Invest. 88:1245-1253; Kondo et al. (2008) Int. Immunol. 20:791-800; Cherry et al. (2008) J. Allergy Clin. Immunol. 121:1484-1490; Smithgall (2008) Int. Immunol. 20:1019-1030. Consistente con la expresión de ST2 por los tipos celulares asociados con Th2, la administración sistémica *in vivo* de IL-33 recombinante induce la producción de citocinas Th2, eosinofilia e hipersecreción mucosa en el pulmón y el intestino. Schmitz et al. (2005) Immunity 23:479-490; Kondo et al. (2008) International Immunology 20:791-800. La IL-33 se libera por las células que sufren muerte celular necrótica y a este respecto se cree que la IL-33 funciona como un patrón molecular asociado al daño (DAMP). Cayrol y Girard (2009) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 106:9021-9026; Haraldsen et al. (2009) Trends Immunol. 30:227-233; Lüthi et al. (2009) Immunity 31: 84.

Estudios recientes han revelado una asociación entre la ST2 y el desarrollo de múltiples enfermedades. Se descubrió un único polimorfismo nucleotídico en el promotor del gen de ST2 que se asocia con dermatitis atópica. Shimizu et al. (2005) Hum. Mol. Genet. 14:2919-2927. Además, los sueros obtenidos de pacientes con esclerosis sistémica y pacientes con fibrosis pulmonar idiopática que presentan una exacerbación aguda contenían niveles elevados de sST2. Kuroiwa et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Comm. 284:1104-1108; Tajima et al. (2003) Chest 124:1206-1214. La expresión de ST2 (ARNm) también se descubrió que estaba aumentada significativamente en el tejido hepático fibroso. Marvie et al. (2010) J. Cell. Mol. Med. 14(6b): 1726. Sorprendentemente, la administración de

una proteína de fusión sST2-Fc exacerbaba las manifestaciones de enfermedad en un modelo de fibrosis hepática en el ratón. Amatucci et al. (2007) J. Leukocyte Biol. 82:124; WO 2007/140205.

La IL-44 se ha asociado con enfermedades fibróticas. El aumento de expresión de mensaje de IL-33 se observó en lesiones fibróticas y cirróticas adyacentes a las masas tumorales hepáticas. Marvie et al. (2010) J. Cell. Mol. Med. 14(6b): 1726. Además, la administración de IL-33 limitaba el desarrollo de fibrosis cardíaca en un modelo de hipertrofia cardíaca en el ratón (Sanada et al. (2007) J. Clin. Invest. 117:1538-1549), sugiriendo que la IL-33 se podría utilizar para tratar la fibrosis cardíaca (Pub. Sol. Pat. EE. UU. N° 2008/0003199). Los anticuerpos anti-IL-33, o variantes de los mismos, también se han propuesto para el tratamiento de trastornos inflamatorios, tales como el asma. Documento WO 2008/144610.

A pesar de estas observaciones, las consecuencias de la actividad sostenida de IL-33 en la piel no se habían comunicado anteriormente. Para determinar los efectos de la señalización mal regulada en la piel, se administró IL-33 repetidamente por vía subcutánea y se controlaron los efectos en el sitio de inyección.

Los resultados que se presentan en el presente documento demuestran que la inyección subcutánea de rIL-33 puede inducir la acumulación de la matriz extracelular (colágeno) y abundante inflamación comprendida principalmente por eosinófilos, macrófagos y células T. Véase el Ejemplo 3 y las FIG. 1A-1D. Estos efectos mediados por IL-33 eran dependientes de ST2 e IL-1RAcP (Ejemplo 4 y FIG. 2), consistente con un mecanismo en el que la acumulación de ECM e inflamación resulta de la señalización de IL-33 mediante su receptor.

Los cambios patológicos inducidos por la IL-33 se asociaron con la expresión alterada de los genes de la ECM en las familias del colágeno, MMP, TIMP, y BMP. Véase el Ejemplo 5 y las FIG. 3A-3D y 4. En particular los niveles de expresión del colágeno VIa y colágeno IIIa aumentaban significativamente en las muestras de piel obtenidas de ratones inyectados con IL-33 sugiriendo que estos subtipos de colágeno pueden contribuir al aumento de la deposición de colágeno en la piel tratada con IL-33. La expresión de TIMP-1 y TIMP -2 también aumentaba con el tratamiento de IL-33. Los miembros de la familia TIMP pueden inhibir la actividad de collagenasa mediada por MMP, que puede promover la acumulación de colágeno inducida por IL-33 disminuyendo el remplazo de colágeno. Lambert et al. (2004) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 49:187-198.

Los datos adicionales indican que la IL-33 regula la expresión de estos genes mediante una ruta dependiente de IL-13. Véase el Ejemplo 6 y FIG. 5A-5F. De manera interesante, la expresión de fibronectina-1 aumentaba independientemente de IL-13 en las muestras de piel inyectadas con IL-33, sugiriendo que la expresión de algunos componentes de la ECM puede que se regulen directamente mediante la IL-33 u otros mediadores independientes, corriente abajo, de IL-13. La FIG. 5E. Los datos totales de los inventores resaltan alteraciones mediadas por IL-33 en los niveles de expresión de distintos subtipos de colágeno así como enzimas que se sabe que afectan el remodelado de la ECM.

Los resultados de los experimentos presentados en el presente documento establecen que la IL-33 induce fibrosis cutánea e intensa inflamación, e identifican que la IL-33 es un nuevo factor suficiente para inducir fibrosis cutánea. Estos efectos profibróticos se observaron por primera vez en la piel de ratones que recibían múltiples inyecciones subcutáneas de IL-33, en los que la piel en el sitio de la inyección se engrosaba en los animales tratados con IL-33 pero no en los controles. Los experimentos presentados en el presente documento se llevaron a cabo entonces para investigar adicionalmente los efectos de la señalización mal regulada de la IL-33 en la piel. Se administró por vía subcutánea IL-33 y se controlaron sus efectos en el sitio de la inyección. La administración de IL-33 resultaba en una acumulación de eosinófilos, linfocitos CD3⁺, células mononucleares F4/80⁺ dependientes de IL-33R, que aumentaba la expresión de ARNm de IL-13, y el desarrollo de fibrosis cutánea. Esta fibrosis cutánea e inflamación era dependiente de ST2. Consistente con la remodelación tisular cutánea extensa, la IL-33 daba como resultado la modulación significativa de varios genes asociados con la matriz extracelular, incluyendo los del Colágeno VI, Colágeno III y TIMP1. La dependencia de la fibrosis inducida por IL-33 tanto de IL-13 como de eosinófilos se estableció utilizando ratones deficientes genéticamente. Los datos indican que los eosinófilos derivados de médula ósea secretan IL-13 en respuesta a la estimulación con IL-33, sugiriendo que esta IL-13 derivada de eosinófilos puede promover la fibrosis cutánea inducida por la IL-33, es decir, que a IL-13 es un mediador corriente abajo crítico de la fibrosis cutánea inducida por IL-33. En conjunto, estos resultados identifican la IL-33 como un mediador profibrótico no reconocido previamente y resalta las rutas celulares y moleculares por las que se desarrolla esta patología. Los datos también sugieren que la IL-33 puede funcionar como un DAMP endógeno implicado en el inicio de la enfermedad fibrótica. Véase Rankin et al. (2010) J. Immunol. 184:1526.

La IL-13 es una citocina profibrótica que es suficiente para la inducción de fibrosis en la piel y el pulmón. Zheng et al. (2009) J. Invest. Dermatol. 129:742-751; Zhou et al. (1999) J. Clin. Invest. 103:779-788. Además, la IL-13 es necesaria para el desarrollo de fibrosis en algunos modelos animales. Aliprantis et al. (2007) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 104:2827-2830; Liu et al. (2004) J. Immunol. 173:3425-3431; Kolodnick et al. (2004) J. Immunol. 172:4068-4076; Chiaramonte et al. (1999) J. Clin. Invest. 104:777-785. La IL-13 han demostrado que modulan directamente la expresión de Colágeno VIa, Colágeno III y TIMP-1 en estudios previos. Syed et al. (2005) Resp. Res. 6:9; Leonardi et al. (2003) Invest. Ophthalmol. & Visual Sci. 44:183-189. Los resultados presentados en el presente documento muestran que la fibrosis inducida por IL-33 necesita la IL-13.

La acumulación anormal de matriz extracelular es una característica que define las enfermedades fibróticas. En consecuencia, a la luz de estos resultados, neutralizando la actividad de IL-33, por ejemplo, por bloqueo con anticuerpos, moléculas pequeñas, o el receptor soluble, puede ser eficaz en el tratamiento de las enfermedades fibróticas tales como la esclerodermia y la fibrosis pulmonar idiopática. Además, el reclutamiento prominente de eosinófilos a los sitios de inyección de IL-33 sugiere que las enfermedades ricas en eosinófilos, tales como la esofagitis eosinofílica y los síndromes hipereosinofílicos pueden beneficiarse del bloqueo de la IL-33. El bloqueo de la actividad de IL-33 en los síndromes tales como la endomiocarditis de Loeffler y la fibrosis endomiocárdica también puede ser eficaz ya que estas enfermedades presentan tanto eosinofilia como fibrosis.

III. Antagonistas de IL-33

En distintas realizaciones, el antagonista de la IL-33 de la presente divulgación es un anticuerpo antagonista (o un fragmento de unión al antígeno del mismo), una molécula pequeña, un polipéptido soluble ST2, o un inhibidor de la expresión de ácido nucleico (tal como un ácido nucleico antisentido o una molécula de ARNip).

En realizaciones basadas en anticuerpos, los anticuerpos anti-IL-33 de la presente divulgación comprende anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión al antígeno tales como, pero sin limitarse a, Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, y diacuerpos. El uso de anticuerpos anti-IL-33 en el tratamiento de distintas enfermedades inflamatorias, tales como el asma, se desvelan en el documento WO 2008/144610.

Se puede utilizar cualquier método adecuado para generar anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, se puede inmunizar un receptor con la IL-33 o un fragmento antigénico de la misma. Se puede utilizar cualquier método adecuado de inmunización. Dichos métodos pueden incluir adyuvantes, otros inmunoestimulantes, inmunizaciones de refuerzo repetidas, y el uso de una o más vías de inmunización. El antígeno producido puede ser un solo epítipo, múltiples epítopos, o solo la proteína completa o en combinación con uno o más agentes potenciadores de la inmunogenicidad conocidos en la técnica.

Se puede utilizar cualquier método adecuado para producir un anticuerpo con la propiedad biológica deseada de inhibición de la actividad de IL-33. Es deseable para preparar anticuerpos monoclonales (mAb) de varios huéspedes mamíferos, tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc. Se pueden encontrar técnicas para la preparación de dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo, en Stites et al. (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4^a 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 (2^a ed.) Academic Press, New York, NY. Por lo tanto, se pueden obtener anticuerpos monoclonales por varias técnicas familiares para los investigadores expertos en la técnica. Normalmente, las células esplénicas de un animal inmunizado con el antígeno deseado se immortalizan, comúnmente mediante la fusión con una célula de mieloma. Véase, Kohler y Milstein (1976) Eur. J. Immunol. 6:511-519. Los métodos alternativos de immortalización incluyen la transformación con el virus de Epstein Barr, oncogenes, o retrovirus, u otros métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Doyle et al. (eds. 1994 y suplementos periódicos) CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley y Sons, New York, NY. Las colonias que aparecen de las células immortalizadas únicas se exploran en cuanto a la producción de anticuerpos con la especificidad deseada y la afinidad por el antígeno, y se puede aumentar el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidas por dichas células mediante distintas técnicas, que incluyen la inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado. De manera alternativa, se pueden aislar secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo explorando una biblioteca de ADN a partir de célula B humanas de acuerdo, por ejemplo, con el protocolo general ideado por Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281.

Otras técnicas adecuadas implican la selección de bibliotecas de anticuerpos en fagos o vectores similares. Véase, por ejemplo, Huse et al. (1989) Science 246:1275; y Ward et al. (1989) Nature 341:544. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente divulgación se pueden utilizar con o sin modificación, incluyendo los anticuerpos quiméricos o humanizados. También se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes, véase Cabilly Pat. de EE. UU. N° 4.816.567; y Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033; o producidos en ratones transgénicos, véase Mendez et al. (1997) Nature Genetics 15:146-156; véase también las tecnologías Abgenix y Medarex®.

También se contemplan los anticuerpos quiméricos. Como se ha señalado anteriormente, los anticuerpos quiméricos típicos comprenden un parte de cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga con secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, a condición de que presenten la actividad biológica deseada (Pat. de EE. UU. N° 4.816.567; y Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

Los antagonistas de la señalización de IL-33 también incluyen moléculas de ácido nucleico antisentido y de interferencia, tales como moléculas de ARNip. Las moléculas antisentido y de ARNip que reducen la expresión de IL-33 se pueden diseñar basándose en la secuencia codificante para la IL-33, como se desvela en el presente

documento en la SEQ ID NO: 5. Los métodos para producir y utilizar el ARNip se desvelan, por ejemplo, en las Pat. de EE. UU. Nº 6.506.559 (WO 99/32619); 6.673.611 (WO 99/054459); 7.078.196 (WO 01/75164); 7.071.311 y las publicaciones PCT WO 03/70914; WO 03/70918; WO 03/70966; WO 03/74654; WO 04/14312; WO 04/13280; WO 04/13355; WO 04/58940; WO 04/93788; WO 05/19453; WO 05/44981; WO 03/78097 (las patentes de EE. UU. se enumeran con las publicaciones PCR relacionadas). Los métodos a modo de ejemplo de utilización del ARNip en silenciamiento genético y tratamiento terapéutico se desvelan en las publicaciones PCT WO 02/096927 (VEGF y receptor de VEGF); WO 03/70742 (telomerasa); WO 03/70886 (proteína tirosina fosfatasa tipo IVA (Prl3)); WO 03/70888 (Chk1); WO 03/70895 y WO 05/03350 (enfermedad de Alzheimer); WO 03/70983 (proteína cinasa C alfa); WO 03/72590 (Map cinasas); WO 03/72705 (ciclina D); WO 05/45034 (enfermedad de Parkinson). Los experimentos a modo de ejemplo relacionados con los usos terapéuticos del ARNip también se han desvelado en Zender et al. (2003) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 100:7797; Paddison et al. (2002) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 99:1443; y Sah (2006) Life Sci. 79:1773. Las moléculas de ARNip también se han utilizado en ensayos clínicos, por ejemplo, de leucemia mieloide crónica (CML) (Clin-icalTrials.gov Identificador: NCT00257647) y degeneración macular relacionado con la edad (AMD) (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00363714).

Aunque el término "ARNip" se utiliza en el presente documento para referirse a moléculas que se utilizan para inducir el silenciamiento genético mediante la ruta de interferencia de ARN (Fire et al. (1998) Nature 391:806), dichas moléculas de ARNip no necesitan ser estrictamente polirribonucleótidos, sino que pueden contener a su vez una o más modificaciones del ácido nucleico para mejorar sus propiedades como agente terapéutico. Ocasionalmente, se hace referencia a dichos agentes como "ANip" para los ácidos nucleicos de interferencia cortos. Aunque dichos cambios pueden mover formalmente la molécula fuera de la definición de "ribo"nucleótido, no obstante se hace referencia a dichas moléculas como "ARNip" en el presente documento. Por ejemplo, algunos dúplex de ARNip comprenden dos cadenas de 19-25 nt (por ejemplo, 21 nt) que se emparejan para formar un polirribonucleótido dúplex de 17-23 pares de bases (por ejemplo, 19 pares de bases) con protuberancias TT (desoxirribonucleótido) 3' en cada cadena. Se utilizan otras variantes de ácidos nucleicos para inducir un silenciamiento genético mediante la ruta de interferencia de ARN incluyen los ARN horquillados cortos ("ARNhc"), por ejemplo, como se desvela en la Publicación de Sol. de Pat. de EE. UU. Nº 2006/0115453.

Se cree que el ST2 soluble se une a IL-33 en solución, y por lo tanto actúa como un antagonista natural de la IL-33 bloqueando la unión al receptor de IL-33 de las superficies celulares. Chackerian et al. (2007) J Immunol 179:2551-2555; Leung et al. (2004) J. Immunol. 173:145-150. El sST2 humano comprende la secuencia de restos de aminoácidos 19-328 de la SEQ ID NO: 8. El uso de una proteína de fusión sST2-Fc en el tratamiento de la fibrosis pulmonar se desvela en el documento WO 2007/140205.

El amplio alcance de la presente invención se comprende mejor en referencia a los siguientes ejemplos, que no tienen la intención de limitar las invenciones a las realizaciones específicas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos generales

Se describen los métodos convencionales de biología molecular. Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) Recombinant DNA, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA. También aparecen métodos convencionales en Ausbel et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley y Sons, Inc. New York, NY, que describe la clonación en células bacterianas y mutagénesis de ADN (Vol. 1), la clonación en células de mamífero y levaduras (Vol. 2), glicoconjugados y expresión de proteínas (Vol. 3), y bioinformática (Vol. 4).

Se han descrito los métodos para la purificación proteica incluyen la inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización. Coligan et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley y Sons, Inc., New York. Se han descrito el análisis químico, modificación química, modificación post-traducciona, producción de proteínas de fusión glicosilación de proteínas. Véase, por ejemplo, Coligan et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 2, John Wiley y Sons, Inc., New York; Ausubel et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 3, John Wiley y Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) Products for Life Science Research, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) BioDirectory, Piscataway, N.J., pp. 384-391. Se han descrito la producción, purificación, y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Coligan et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 1, John Wiley y Sons, Inc., New York; Harlow y Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow y Lane, *supra*. Las técnicas convencionales para la caracterización de las interacciones ligando/receptor están disponibles. Véase, por ejemplo, Coligan et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York.

Los métodos de citometría de flujo, incluyendo los sistemas de detección por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS®), están disponibles. Véase, por ejemplo, Owens et al. (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley y Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2ª ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley y Sons, Hoboken, NJ. Los reactivos fluorescentes adecuados para modificar ácidos nucleicos, incluyendo los cebadores de ácido nucleico y las sondas, polipéptidos, y anticuerpo, para su uso, por ejemplo como reactivos de diagnóstico, están disponibles. Molecular Probes (2003) *Catalog*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalog*, St. Louis, MO.

Los métodos convencionales de histología del sistema inmunitario se han descrito. Véase, por ejemplo, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, et al. (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, y Wilkins, Phila., PA; Louis, et al. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY.

Se pueden llevar a cabo análisis estadísticos utilizando un software disponible en el mercado, incluyendo pero sin limitarse a JMP® Statistical Discovery Software, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.

Los medios de crecimiento y los métodos se han proporcionado, por ejemplo, en Int'l. Pub. Sol. Pat. N° WO 90/03430 y Pat. de EE. UU. N° 5.830.761.

Ejemplo 2

Métodos relacionados específicamente con los experimentos descritos en el presente documento

Los animales y experimentos con animales eran los siguientes. B6/129.IL-1RAcP^{-/-}, B6.IL-1R1^{-/-}, B6.RAG^{-/-} y 129S6.IL-13^{-/-} los ratones se alojaron en condiciones libres de patógenos específicos en Schering-Plough Biopharma de acuerdo con las directrices del IACUC. Cullinan (1998) *J. Immunol.* 161:5614-5620; Mombaerts et al. (1992) *Cell* 68:869-877; Glaccum et al. (1997) *J. Immunol.* 159:3364-3371; McKenzie et al. (1998) *Curr. Biol.* 8:339-342. Los ratones B6.ST2^{-/-} fueron un amable regalo del Neurath lab, University of Mainz; Hoshino et al. (1999) *J. Exp. Med.* 190:1541-1547. Los ratones BALB/c.ΔdblGATA, WB/B6F1.cKit^{W^v}, B6.IL-4^{-/-} y los de control apropiados se obtuvieron de los Jackson laboratories. Yu et al. (2002) *J. Exp. Med.* 195:1387-1395; Metwali et al. (1996) *J. Immunol.* 157:4546-4553. Los ratones B6/129 se obtuvieron de los Jackson laboratories. Los ratones C57B1/6 y 129S6 se obtuvieron en Taconic. La edad y sexo de los ratones coincidentes de 8 a 16 semanas de edad se utilizaron para los experimentos descritos.

Se inyectó a los ratones por vía subcutánea diariamente durante 7 días con 5 mg de MSA o mL-33 recombinante. La IL-33 recombinante (AA1122-270) se produjo en *E. coli* por Aragen Biosciences y contenía < 0,5 QUE/ml de endotoxina. Veinticuatro horas después de la inyección final, se recolectó el sitio de la inyección para los análisis. Los protocolos experimentales se aprobaron por el Schering-Plough Biopharma IACUC.

Se llevó a cabo una RT-PCR de la siguiente manera. Se llevó a cabo el aislamiento de ARN por técnicas convencionales y se calculó la expresión genética utilizando el método Δ-ΔCt (utilizando el valor medio del umbral de ciclo para ubiquitina y el gen de interés de cada muestra). Se obtuvieron los cebadores en el mercado en Applied Biosystems (Foster City, CA) o se diseñaron utilizando un Primer Express (PE Biosystems, Foster City, CA). La ecuación $1,8e^{(Ct \text{ ubiquitina} - Ct \text{ gen de interés})} \times 10^4$ se utilizó para obtener los valores normalizados.

Se llevó a cabo la histología de la siguiente manera. Las muestras de piel del sitio de la inyección se recolectaron y se fijaron en formalina durante 24 horas. Las muestras se embebieron entonces en parafina y se cortó en secciones de 5 mm. Las secciones se tiñeron con H-E, tricrómica de Masson, o azul astra y violeta rojo según las directrices del fabricante (American MasterTech). Para cuantificar la infiltración con mastocitos y eosinófilos de la piel, las secciones teñidas con azul astra y violeta rojo se exploraron utilizando un escáner de portaobjetos Mirax Midi (Zeiss). Los mastocitos se identificaron basándose en las características de la tinción con astra azul de los gránulos de los mastocitos y la presencia de un núcleo único, mientras que los eosinófilos se identificaron por la tinción citoplasmática violeta rojo co-localizada con un núcleo bilobulado. Se seleccionó aleatoriamente un área mínima de 0,5 mm² de piel por ratón y se vigiló para obtener cuentos celulares manuales. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de campo brillante (Olympus Modelo BX51) con una cámara digital acoplada (Q Imaging Model Retiga 2000R) y con equilibrado de blancos utilizando Adobe Photoshop Elements (v.2.0)

Se llevó a cabo la inmunohistoquímica (IHC) de la siguiente manera. Los estudios inmunohistoquímicos se llevaron a cabo en secciones de tejido fijados con formalina y embebidos en parafina utilizando un anticuerpo policlonal de conejo contra la anti-CD3 humano (n° de Catálogo A0452, Dalo Corp., dilución 1:200) y un anticuerpo monoclonal de rata contra anti-F4/80 humano (Clon BM8, eBioscience, dilución 1:400). Los tejidos embebidos en parafina se seccionaron con 5 mm de grosor, se desparafinaron y se templó con peróxido de hidrógeno durante 10 minutos. los portaobjetos se recuperaron por calor con tampón citrato a un pH 5,1 (n° Cat. S1699, Dako Corp.) durante 4 minutos a 123 °C utilizando una cámara Biocare Decloaker, después se enfrió durante 15 minutos seguido por un aclarado en agua corriente del gripo. Los portaobjetos se montaron en un DAKO Autostainer y se cubrieron con TBS recién preparado para evitar el secado de las secciones. Las secciones se incubaron entonces con los anticuerpos anti-

CD3 o anti-F4/80 a temperatura ambiente durante 60 minutos y se aclararon con TBS. Las secciones CD3 teñidas se incubaron durante 30 minutos en Rabbit Envision-Plus (nº de Catálogo K4011, Dako Corp.). Las secciones con F4/80 teñido se incubaron durante 30 minutos con Rat Probe y después con Rat Polymer-HRP (nº de Catálogo RT517L, Biocare Medical). Los portaobjetos se aclararon con TBS y se desarrollaron con DAB-Plus (Dako Corp.), se contra-teñieron en Hematoxilina modificada de Mayer y azulado en 0,3 de agua amoniacada seguido por un aclarado en agua del grifo. Las células CD3⁺ y F4/80⁺ se contaron como se ha descrito anteriormente.

El colágeno se cuantificó de la siguiente manera. Los niveles de colágeno soluble de la piel se cuantificaron utilizando el Ensayo Sricol™ de acuerdo con las directrices del fabricante (BioColor Ltd.). En resumen, se aisló una biopsia de punción de 6 mm del sitio de inyección y se retiró la grasa subcutánea. Las muestras se homogeneizaron en 3 ml de 0,5 M de ácido acético suplementado con inhibidores de proteasa Complete™ (Roche). Después de una noche de extracción a 4 °C, las muestras se centrifugaron y se ensayaron 0,2 ml del extracto para determinar el contenido de colágeno. Los resultados se presentan como los microgramos totales de colágeno extraído de 6 mm de biopsias dérmicas por punción.

Se llevó a cabo el análisis estadístico de la siguiente manera. Los análisis estadísticos para comparar el contenido de colágeno en la piel y el número de células entre los grupos experimental y de control se llevaron utilizando el ensayo t de Student, considerando los valores de $p \leq 0,05$ como significativos. Se analizaron los estudios que utilizaban los análisis de TAQman para comparar los niveles de expresión genética entre los grupos de control y experimental utilizando el ensayo U de Mann-Whitney. Se consideraba que los valores de $p \leq 0,05$ como significativos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el GraphPad Prism versión 4.02 para Windows (Software GraphPad).

Ejemplo 3

Inducción de fibrosis cutánea e inflamación mediada por IL-33

Para evaluar las consecuencias de la liberación de IL-33 mal regulada en la piel, se inyectó IL-33 o proteína de control (MSA) por vía subcutánea cada día durante 7 días. Los ratones inyectados con IL-33 y MSA no presentaban cambios discernibles en el comportamiento durante el curso de la serie de inyección (por ejemplo, prurito) ni se observó ninguna patología cutánea evidente. No obstante, el análisis histológico de la piel de los ratones inyectados con IL-33 pero no en los inyectados con MSA revelaba una inflamación y edema prominentes en el sitio de inyección (FIG. 1A) y el desarrollo de una fibrosis subcuticular como se demostraba por la tinción tricrómica de Masson (no mostrado). Los niveles de colágeno solubles estaban aumentados aproximadamente 4 veces en las biopsias cutáneas por punción obtenidas de los ratones inyectados con IL-33 (FIG. 1B). La mayoría de los leucocitos infiltrados consistía en leucocitos granulocitos con agrupamientos densos de estas células ocasionalmente observados en el tejido adiposo subcutáneo (FIG. 1A). La tinción histoquímica revelaba que la mayoría de los leucocitos infiltrados eran eosinófilos y que la inyección subcutánea de IL-33 producía una acumulación significativa de estas células en comparación con la piel inyectada con MSA (FIG. 1C). Los niveles de expresión de proteína básica principal de eosinófilo en la piel de los ratones tratados con IL-33 y con el control MSA producían un patrón similar de resultados (datos no mostrados). Las células mononucleares CD3⁺ también aumentaban significativamente en la piel obtenida de los ratones inyectados con IL-33 (FIG. 1D) mientras que los mastocitos y células B220⁺ estaban presentes en cantidades similares en las secciones de piel obtenidas de ratones inyectados con IL-33 o MSA (datos no mostrados). No se observaron cambios patológicos en las secciones de piel adyacentes al sitio de inyección (datos no mostrados).

Ejemplo 4

El papel de ST2 e IL-1RAcP en la patología de piel inducida por IL-33

Para determinar si la inflamación inducida por IL-33 es dependiente de la señalización mediante el receptor IL-33, es está comprendido por ST2 e IL-1RAcP, se inyectaron ratones ST2^{-/-} e IL-1RAcP^{-/-} por vía subcutánea con IL-33. Ni los ratones IL-1RAcP^{-/-} ni los ST2^{-/-} presentaban signos histológicos de inflamación ni fibrosis subcuticular después de recibir las inyecciones de IL-33 (FIG. 2). La IL-1RAcP es una subunidad compartida de la IL-33 que también se empareja con IL-1R1 para formar el receptor heteromérico para IL-1 α e IL- β . Cullinan (1998) J. Immunol. 161:5614-5620. Para determinar si la señalización mediante IL-1R1 es necesaria para el desarrollo de fibrosis cutánea e inflamación inducida por IL-33 los inventores trataron ratones IL-1R1^{-/-} por vía subcutánea con IL-33. Los ratones IL-1R1^{-/-} inyectados con IL-33 desarrollaron inflamación y fibrosis subcuticular de una manera que era indistinguible de los ratones de control, indicando que la señalización de IL-1 α / β no es necesaria para la patología cutánea inducida por IL-33 (datos no mostrados). Colectivamente, esos resultados demuestran que la administración subcutánea repetida de IL-33 induce una inflamación y fibrosis cutánea dependiente de ST2/ IL-1RAcP.

Ejemplo 5

Modulación de Th2 inducida por IL-33 y expresión genética asociada con la matriz extracelular

Se examinó la expresión genética en la piel obtenida de los ratones inyectados con IL-33. Los ratones inyectados con IL-33 tenían una expresión significativamente aumentada de citocinas Th2 IL-4, IL-5 e IL-13 (FIG. 3A), mientras que la expresión de citocinas asociadas con Th1 y Th17, IFN- γ e IL-17, respectivamente, permanecían sin cambios (datos no mostrados). Como la inyección repetida de IL-33 inducía el desarrollo de fibrosis subcuticular localmente, los inventores también examinaron la expresión de un panel de los genes asociados con la matriz extracelular (ECM) (FIG. 4). La piel inyectada con IL-33 presentaba un aumento sustancial de la expresión de distintos componentes de la ECM, tal como el colágeno VIa, colágeno IIIa y fibronectina-1 (FIG. 3B y 4). Además, la expresión de componentes de modificación de la ECM, tal como TIMP-1, MMP-12 Y MMP-13 también estaban significativamente elevados (FIG. 3C). De manera interesante, el tratamiento IL-33 también daba como resultado una reducción significativa de la expresión de varias isoformas de colágeno, incluyendo los colágenos II, IV, XI, XIII, XVI y XVIII (FIG. 4). Por lo tanto, estos resultados resaltan la nueva observación de que IL-33 puede modular la expresión de genes asociados a la ECM en la piel.

El TGF- β e IL-13 son dos citocinas conocidas por que tienen un papel crítico en la promoción de la enfermedad fibróticas en múltiples modelos animales. Wynn (2008) J. Pathol. 214:199-210. La piel aislada de ratones inyectados con IL-33 expresaban niveles de TGF- β que eran similares a los observados en las muestras de piel inyectadas con MSA (FIG. 3D). Debido a la expresión de IL-13 (FIG. 3A), pero no el TGF- β (FIG. 3D), estaba aumentada significativamente en las muestras de piel inyectadas con IL-33, parece que la fibrosis inducida por IL-33 puede desarrollarse de manera dependiente de la IL-13.

Ejemplo 6

Papel de IL-13 en la actividad de IL-33

Para determinar si la patología cutánea inducida por IL-33 necesita IL-13. Se inyectaron ratones IL-13^{-/-} con IL-33 por vía subcutánea diariamente durante 7 días, se examinaron las muestras cutáneas histológicamente (FIG. 5A) y se cuantificó el contenido de colágeno. Las secciones cutáneas preparadas a partir de ratones IL-13^{-/-} inyectados con IL-33 revelaban solo una tinción tricrómica menor en el subcutis (resultados no mostrados), y se descubrió que el contenido de colágeno en la piel obtenida de los ratones IL-13^{-/-} inyectados con IL-33 estaba significativamente reducido en comparación con los animales de tipo silvestre tratados con IL-33 (FIG. 5B) Sorprendentemente, el contenido de colágeno soluble en la piel obtenida de los ratones IL-13^{-/-} inyectados con IL-33 era similar a los niveles observados en los animales tratados con la proteína de control, indicando colectivamente que la IL-13 actúa como mediador crítico de la fibrosis cutánea inducida por IL-33. Los niveles de expresión de Colágeno VIa, Colágeno IIIa, MMP12, MMP13 y TIMP1 estaban reducidos en la piel obtenida en ratones IL-13^{-/-} inyectados con IL-33 en comparación con los ratones de tipo silvestre (FIG. 5C y 5D), mientras que la expresión de fibronectina estaba inducida de manera similar por IL-33 en ratones de tipo silvestre e IL-13^{-/-} (FIG. 5E), indicando que la expresión de fibronectina dependiente de IL-33 se producía mediante un mecanismo independiente de IL-13.

Además, los ratones IL-13^{-/-} inyectados con IL-33 presentaban una tendencia no significativa a reducir los infiltrados eosinofílicos en comparación con los ratones de tipo silvestre inyectados con IL-33 (FIG. 5F).

La Tabla 1 proporciona una breve descripción de las secuencias del listado de secuencias.

Tabla 1

Identificadores de secuencia	
SEQ ID NO:	Descripción
1	isoforma de IL-1RAcP 2 ácido nucleico
2	Isoforma de IL-1RAcP 2 polipéptido
3	Isoforma de IL-1RAcP 1 ácido nucleico
4	Isoforma de IL-1RAcP 1 polipéptido
5	ácido nucleico de IL-33
6	IL-33 polipéptido
7	Isoforma de ST2 2 ácido nucleico
8	Isoforma de ST2 2 polipéptido
9	Isoforma de ST2 1 ácido nucleico
10	ST2 isoforma 1 polipéptido

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Schering Corporation Rankin, Andrew L. Pflanz, Stefan Mumm, John

5 <120> USO DE ANTAGONISTAS DE LA IL-33 PARA TRATAR UNA ENFERMEDAD FIBRÓTICA

<130> BP2009.7052

10 <150> 61/241.324
<151> 10-09-2009

<160> 10

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2063

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

tgccggggtc	caggtctccg	gggtccgctt	tggccagagg	cgcggaagga	agcagtgcc	60
ggcgacactg	cacccatccc	ggctgctttt	gctgcgcctt	ctcagcttcc	caagaaaggc	120
atcgtcatgt	gatcatcacc	taagaactag	aacatcagca	ggccctagaa	gcctcactct	180
tgccccctcc	tttaatatct	caaaggatga	cacttctgtg	gtgtgtagtg	agtctctact	240
tttatggaat	cctgcaaagt	gatgcctcag	aacgctgcga	tgactgggga	ctagacacca	300
tgaggcaaat	ccaagtgttt	gaagatgagc	cagctcgcac	caagtgccca	ctctttgaac	360
acttcttgaa	attcaactac	agcacagccc	attcagctgg	ccttactctg	atctggtatt	420
ggactaggca	ggaccgggac	cttgaggagc	caattaactt	ccgcctcccc	gagaaccgca	480
ttagtaagga	gaaagatgtg	ctgtggttcc	ggccactctt	cctcaatgac	actggcaact	540
atacctgcat	gttaaggaac	actacatatt	gcagcaaagt	tgcatttccc	ttggaagttg	600
ttcaaaaaga	cagctgtttc	aattccccca	tgaaactccc	agtgcataaa	ctgtatatag	660
aatatggcat	tcagaggatc	acttgtccaa	atgtagatgg	atattttcct	tccagtgtca	720
aaccgactat	cacttggtat	atgggctgtt	ataaaataca	gaattttaat	aatgtaatac	780
ccgaaggat	gaacttgagt	ttcctcattg	ccttaatttc	aaataatgga	aattacacat	840
gtgttggtac	atatccagaa	aatggacgta	cgtttcatct	caccaggact	ctgactgtaa	900
aggtagtagg	ctctccaaaa	aatgcagtgc	cccctgtgat	ccattcacct	aatgatcatg	960
tggtctatga	gaaagaacca	ggagaggagc	tactcattcc	ctgtacggtc	tatttttagtt	1020
ttctgatgga	ttctcgcaat	gaggtttggg	ggaccattga	tggaaaaaaa	cctgatgaca	1080
tcactattga	tgtcaccatt	aacgaaagta	taagtcatag	tagaacagaa	gatgaaacaa	1140
gaactcagat	tttgagcatc	aagaaagtta	cctctgagga	tctcaagcgc	agctatgtct	1200
gtcatgctag	aagtgccaaa	ggcgaagttg	ccaaagcagc	caaggtgaag	cagaaaggta	1260

```

atagatgogg tcagtgatga atctctcagc tccaaattaa cattgtggtg aataaggaca      1320
aaaggagaga ttgagaacaa gagagctcca gcacctagcc cgacggcatc taacccatag      1380
taatgaatca aacttaaagt aaaaatatga aagttttcat ctatgtaaga tactcaaaat      1440
attgtttctg atattgttag taccgtaatg cccaaatgta gctaaaaaaa tgcacgtgag      1500
tacagtgaga cacaattttg tgtctgtaca attatgaaaa attaaaaaca aagaaaatat      1560
tcaaagctac caaagataga aaaaactggt agagccacat attgttggtg aattattaag      1620
acccttttaa aaatcattca tggtagagtt taagagtcac aaaaaagatt gcatcatctg      1680
acctaagact ttcggaattt ttctgaaca aataacagaa agggaattat ataccttta      1740
atattattag aagcattatc tgtagttgta aaacattatt aatagcagcc atccaattgt      1800
atgcaactaa ttaaggtatt gaatgtttat ttccaaaaa tgcataatta taatattatt      1860
ttaaacacta tgtatcaata ttaagcagg ttataatat accagcagcc acaattgcta      1920
aatgaaaat catttaaatt atgattttaa atggtataaa catgatttct atgttgatag      1980
tactatatta ttotacaata aatggaaatt ataaagcctt cttgtcagaa gtgctgctcc      2040
taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa                                           2063

```

<210> 2
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 2

```

Met Thr Leu Leu Trp Cys Val Val Ser Leu Tyr Phe Tyr Gly Ile Leu
1           5           10           15

Gln Ser Asp Ala Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met
          20           25           30

Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro
          35           40           45

Leu Phe Glu His Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala
          50           55           60

Gly Leu Thr Leu Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu
65           70           75           80

Glu Pro Ile Asn Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys
          85           90           95

Asp Val Leu Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr
          100          105          110

```

Thr Cys Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro
 115 120 125
 Leu Glu Val Val Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu
 130 135 140
 Pro Val His Lys Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys
 145 150 155 160
 Pro Asn Val Asp Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr
 165 170 175
 Trp Tyr Met Gly Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro
 180 185 190
 Glu Gly Met Asn Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly
 195 200 205
 Asn Tyr Thr Cys Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His
 210 215 220
 Leu Thr Arg Thr Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Val Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys
 245 250 255
 Glu Pro Gly Glu Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe
 260 265 270
 Leu Met Asp Ser Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys
 275 280 285
 Pro Asp Asp Ile Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His
 290 295 300
 Ser Arg Thr Glu Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys
 305 310 315 320
 Val Thr Ser Glu Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala Arg Ser
 325 330 335
 Ala Lys Gly Glu Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Gly Asn
 340 345 350
 Arg Cys Gly Gln
 355

5

<210> 3
<211> 4726
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

tgccgggato caggtctccg gggtcogctt tggccagagg cgcggaagga agcagtgcc	60
ggcgacactg caccatccc ggctgctttt gctgogccct ctcagcttcc caagaaaggc	120
atcgatcatgt gatcatcacc taagaactag aacatcagca ggccctagaa gcctcactct	180
tgccctccc tttaatatct caaaggatga cacttctgtg gtgtgtagtg agtctctact	240
tttatggaat cctgcaaagt gatgcctcag aacgctgcga tgactgggga ctagacacca	300
tgaggcaaat ccaagtgttt gaagatgagc cagctcgcat caagtgccca ctctttgaac	360
acttcttgaa attcaactac agcacagccc attcagctgg ccttactctg atctggtatt	420
ggactaggca ggacoggac cttgaggagc caattaactt cgcctcccc gagaaccgca	480
ttagtaagga gaaagatgtg ctgtggttcc ggccactct cctcaatgac actggcaact	540
atacctgcat gttaaggaac actacatatt gcagcaaagt tgcatttccc ttggaagttg	600
ttcaaaaaga cagctgttcc aattccccca tgaaactccc agtgcataaa ctgtatatag	660
aatatggcat tcagaggatc acttgtccaa atgtagatgg atattttcct tccagtgtca	720
aacogactat cacttggtat atgggctgtt ataaaataca gaattttaat aatgtaatac	780
ccgaaggat gaacttgagt ttctcattg ccttaatttc aaataatgga aattacacat	840
gtgttggtac atatccagaa aatggacgta cgtttcatct caccaggact ctgactgtaa	900
aggtagtagg ctctccaaaa aatgcagtg cccctgtgat ccattcacct aatgatcatg	960
tggctctatga gaaagaacca ggagaggagc tactcattcc ctgtacggtc tatttttagtt	1020
ttctgatgga ttctcgcaat gaggtttggt ggaccattga tggaaaaaaa cctgatgaca	1080
tcactattga tgtcaccatt aacgaaagta taagtcatag tagaacagaa gatgaaacaa	1140
gaactcagat tttagacatc aagaaagtta cctctgagga tctcaagcgc agctatgtct	1200
gtcatgctag aagtgccaaa ggogaagttg ccaaagcagc caaggtgaag cagaaagtgc	1260
cagctccaag atacacagtg gaactggctt gtggttttgg agccacagtc ctgctagtgg	1320
tgattctcat tgttggttac catgtttact ggctagagat ggctctattt taccgggctc	1380
attttggaac agatgaaacc attttagatg gaaaagagta tgatatttat gtatcctatg	1440
caaggaatgc ggaagaagaa gaatttgtat tactgacct cctggagtt ttggagaatg	1500
aatttgata caagctgtgc atctttgacc gagacagtct gcctggggga attgtcacag	1560
atgagacttt gagcttcatt cagaaaagca gacgcctcct ggttggttcta agccccaact	1620
acgtgctcca gggaacccaa gccctcctgg agctcaaggc tggcctagaa aatatggcct	1680
ctgggggcaa catcaacgtc attttagtac agtaciaaagc tgtgaaggaa acgaaggtga	1740
aagagctgaa gagggctaag acggtgctca cggtcattaa atggaaaggg gaaaaatcca	1800

agtatccaca	gggcaggttc	tggaagcagc	tgcaggtggc	catgccagt	aagaaaagtc	1860
ccaggcggtc	tagcagtgat	gagcagggcc	tctcgtattc	atctttgaaa	aatgtatgaa	1920
aggaataatg	aaaagggtaa	aaagaacaag	gggtgctcca	ggaagaaaaga	gtccccccag	1980
tcttcattcg	cagtttatgg	tttcataggc	aaaaataatg	gtctaagcct	cccaataggg	2040
ataaatttag	ggtgactgtg	tggctgacta	ttctgcttcc	tcaggcaaca	ctaaagttta	2100
gaaagatata	atcaacgttc	tgtcaccagt	ctctgatgcc	actatgttct	ttgcaggcaa	2160
agacttgttc	aatgcgaatt	tccccttcta	cattgtctat	cctgtttttt	atatgtctcc	2220
attcttttta	aaatcttaac	atatggagca	gcctttccta	tgaatttaaa	tatgccttta	2280
aaataagtca	ctgttgacag	ggtcatgagt	ttccgagtat	agttttcttt	ttatcttatt	2340
tttactcgtc	cgttgaaaag	ataatcaagg	cctacatttt	agctgaggat	aatgaacttt	2400
tttcttcatt	cggctgtata	atacataacc	acagcaagac	tgacatccac	ttaggatgat	2460
acaaagcagt	gtaactgaaa	atgtttcttt	taattgattt	aaaggacttg	tcttctatac	2520
cacccttgtc	ctcatctcag	gtaatttatg	aaatctatgt	aaacttgaaa	aatatttctt	2580
aatttttggt	tttgcctcag	tcaattctctg	attatccaca	ggtcaaccca	cattttttca	2640
ttccttctcc	ctatctgctt	atatcgcat	gtcatttag	agtttgacag	aggctccata	2700
ctaggttcag	tctgaaagaa	atctccta	ggtgctatag	agagggaggt	aacagaaaga	2760
ctcttttagg	gcatttttct	gactcatgaa	aagagcacag	aaaaggatgt	ttggcaattt	2820
gtcttttaag	tcttaacott	gctaattgtga	atactgggaa	agtgattttt	tctcactcgt	2880
ttttgttgc	ccattgtaaa	ggcgggaggt	cagtcttagt	ggccttgaga	gttgcttttg	2940
gcattaatat	tctaagagaa	ttaactgtat	ttcctgtcac	ctattcacta	gtgcaggaaa	3000
tatacttgct	ccaaataagt	cagtatgaga	agtcactgtc	aatgaaagtt	gttttgtttg	3060
ttttcagtaa	tattttgctg	tttttaagac	ttggaaaact	aagtgcagag	tttacagagt	3120
ggtaaatata	tatgttacat	gtagattata	catatatata	cacacgtgta	tatgagatat	3180
atatcttata	tctccacaaa	cacaaattat	atatatacat	atccacacac	atacattaca	3240
tatatctgtg	tataataatc	cacatgcaca	tgaaatatat	atatatatat	aatttgtgtg	3300
tgtgtatgtg	tatgtatatg	actttaaata	gctatgggta	caatattaaa	aaccactgga	3360
actcttgctc	agtttttaaa	ttatgttttt	actggaatgt	ttttgtgtca	gtgttttctg	3420
tacatattat	ttgttaattc	acagctcaca	gagtgatagt	tgtcatagtt	cttgcccttc	3480
ctaagtttat	ataaataact	taagtattgc	tacagtttat	ctaggttgca	gtggcatctg	3540
ctgtgcacag	agcttccatg	gtcactgcta	agcagtagcc	agccatcggg	cattaattga	3600
tttctacta	tattcccagc	agacacattt	agaaactaag	ctatgttaac	ctcagtgtct	3660
aactatttga	actgttgagt	gataaaggaa	acaaatataa	ctgtaaatga	atcttgggtat	3720
cctgtgaaac	agaataattc	gtaatttaag	aaagccctta	tcccggtaac	atgaatgttg	3780

```

atgaacaaat gtaaaattat atcctatatt taagtaccca taataaatca tttccctcta 3840
taagtgttat tgattatatt aaattgaaaa aagtttcaact tggatgaaaa aagtagaaaa 3900
gtaggtcatt cttggatcta ctttttttta gccttattaa tatttttccc tattagaaac 3960
cacaattact ccctctatta acccttcaact tactagacca gaaaagaact tattccagat 4020
aagctttgaa tatcaattct tacataaact ttaggcaaac agggaaatag ctagtaccca 4080
aaggaccatt ctcttgccaa tgctgcattc cttttgcaact tttggattcc atatttatcc 4140
caaatgctgt tgggcacccc tagaaatacc ttgatgtttt ttctatttat atgcctgcct 4200
ttggtactta attttacaaa tgctgtaata taaagcatat caagtttatg tgatacgtat 4260
cattgcaaga gaatttgttt caagattttt ttttaatggt ccagaagatg gccaatagag 4320
aacattcaag ggaaatgggg aaacataatt tagagaacaa gaacaaacca tgtctcaaat 4380
ttttttaaaa aaaattaatg gttttaaata tatgctatag ggacgttcca tgcccaggtt 4440
aacaagaac tgtgatatat agagtgtcta attacaaaat catatacgat ttatttaatt 4500
ctcttctgta ttgtaactta gatgattccc aaggactcta ataaaaaatc acttcattgt 4560
atttggaac aaaaacatca ttcattaatt acttattttc tttccatagg ttttaatatt 4620
ttgagagtgt cttttttatt tcattcatga acttttgtat ttttcatttt tcatttgatt 4680
tgtaaattta cttatgttaa aaataaacca tttattttca gctttg 4726

```

<210> 4
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

```

Met Thr Leu Leu Trp Cys Val Val Ser Leu Tyr Phe Tyr Gly Ile Leu
1           5           10           15

Gln Ser Asp Ala Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met
          20           25           30

Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro
          35           40           45

Leu Phe Glu His Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala
          50           55           60

Gly Leu Thr Leu Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu
65           70           75           80

Glu Pro Ile Asn Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys
          85           90           95

```

Asp Val Leu Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110

Thr Cys Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro
 115 120 125

Leu Glu Val Val Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu
 130 135 140

Pro Val His Lys Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys
 145 150 155 160

Pro Asn Val Asp Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr
 165 170 175

Trp Tyr Met Gly Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro
 180 185 190

Glu Gly Met Asn Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly
 195 200 205

Asn Tyr Thr Cys Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His
 210 215 220

Leu Thr Arg Thr Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala
 225 230 235 240

Val Pro Pro Val Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys
 245 250 255

Glu Pro Gly Glu Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe
 260 265 270

Leu Met Asp Ser Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys
 275 280 285

Pro Asp Asp Ile Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His
 290 295 300

Ser Arg Thr Glu Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys
 305 310 315 320

Val Thr Ser Glu Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala Arg Ser
 325 330 335

Ala Lys Gly Glu Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Pro
 340 345 350

Ala Pro Arg Tyr Thr Val Glu Leu Ala Cys Gly Phe Gly Ala Thr Val

355	360	365
Leu Val Val Ile Leu Ile Val Val Tyr His Val Tyr Trp Leu Glu		
370	375	380
Met Val Leu Phe Tyr Arg Ala His Phe Gly Thr Asp Glu Thr Ile Leu		
385	390	395
Asp Gly Lys Glu Tyr Asp Ile Tyr Val Ser Tyr Ala Arg Asn Ala Glu		
405	410	415
Glu Glu Glu Phe Val Leu Leu Thr Leu Arg Gly Val Leu Glu Asn Glu		
420	425	430
Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Asp Arg Asp Ser Leu Pro Gly Gly		
435	440	445
Ile Val Thr Asp Glu Thr Leu Ser Phe Ile Gln Lys Ser Arg Arg Leu		
450	455	460
Leu Val Val Leu Ser Pro Asn Tyr Val Leu Gln Gly Thr Gln Ala Leu		
465	470	475
Leu Glu Leu Lys Ala Gly Leu Glu Asn Met Ala Ser Arg Gly Asn Ile		
485	490	495
Asn Val Ile Leu Val Gln Tyr Lys Ala Val Lys Glu Thr Lys Val Lys		
500	505	510
Glu Leu Lys Arg Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly		
515	520	525
Glu Lys Ser Lys Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val		
530	535	540
Ala Met Pro Val Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln		
545	550	555
Gly Leu Ser Tyr Ser Ser Leu Lys Asn Val		
565	570	

<210> 5
 <211> 2644
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 655 079 T3

caacagaata ctgaaaaatg aagcctaaaa tgaagtattc aaccaacaaa atttccacag	60
caaagtggaa gaacacagca agcaaagcct tgtgtttcaa gctgggaaaa toccaacaga	120

aggccaaaga agtttgcccc atgtacttta tgaagctccg ctctggcctt atgataaaaa	180
aggaggcctg ttacttttagg agagaaacca ccaaaaggcc ttactgaaa acaggtagaa	240
agcacaaaag acatctggta ctgctgcct gtcaacagca gtctactgtg gagtgccttg	300
cctttggtat atcaggggtc cagaaatata ctagagcact tcatgattca agtatcacag	360
gaatttcacc tattacagag tatcttgctt ctctaagcac atacaatgat caatccatta	420
cttttgcttt ggaggatgaa agttatgaga tatatgttga agacttgaaa aaagatgaaa	480
agaaagataa ggtgttactg agttactatg agtctcaaca cccctcaaat gaatcagggtg	540
acgggtgttga tggtgaagatg ttaatggtaa cctgagtc taaaaagac ttctgggtgc	600
atgccaaaca caaggaacac tctgtggagc tcataagtg tgaaaaacca ctgccagacc	660
aggccttctt tgtccttcat aatatgcact ccaactgtgt ttcatTTgaa tgcaagactg	720
atcctggagt gtttataggt gtaaaggata atcatcttgc tctgattaaa gtagactctt	780
ctgagaattt gtgtactgaa aatatcttgt ttaagctctc tgaaacttag ttgatggaaa	840
cctgtgagtc ttgggttgag taccctaatg ctaccactgg agaaggaatg agagataaag	900
aaagagacag gtgacatcta agggaaatga agagtgtta gcatgtgtgg aatgttttcc	960
atattatgta taaaaatatt ttttctaac ctccagttat tcttttattt cctctgtat	1020
aactgcatct tcaatacaag tatcagtata ttaaataggg tattggtaaa gaaacggta	1080
acattotaaa gagatacagt ctgacctta cttttctcta gtttcagtc agaaagaact	1140
tcatatttag agctaaggcc actgaggaaa gagccatagc ttaagtctct atgtagacag	1200
ggatccattt taaagagcta cttagagaaa taattttcca cagttccaaa cgataggtc	1260
aaacactaga gctgctagta aaaagaagac cagatgcttc acagaattat cattttttca	1320
actggaataa aacaccaggt ttgtttgtag atgtcttagg caacactcag agcagatctc	1380
ccttactgtc aggggatatg gaacttcaaa ggccacatg gcaagccagg taacataaat	1440
gtgtgaaaaa gtaaagataa ctaaaaaatt tagaaaaata aatccagtat ttgtaaagtg	1500
aataacttca tttotaattg ttttaattttt aaaattctga tttttatata ttgagtttaa	1560
gcaaggcatt cttacacgag gaagtgaagt aaattttagt tcagacataa aatttcactt	1620
attaggaata tgtaacatgc taaaactttt ttttttttaa agagtactga gtcacaacat	1680
gttttagagc atccaagtac catataatcc aactatcatg gtaaggccag aaatcttcta	1740
acctaccaga gcctagatga gacaccgaat taacattaaa atttcagtaa ctgactgtcc	1800
ctcatgtcca tggcctacca tcccttctga cctggcttc caggaccta tgtcttttaa	1860
tactcaactgt cacattgggc aaagttgctt ctaatcctta tttcccatgt gcacaagtct	1920
ttttgtattc cagcttctg ataacactgc ttactgtgga atattcattt gacatctgtc	1980
tcttttcatt tcttttaact acctgacct tgatatatct tttgcacctg ctgaacttca	2040
tttctgtatc acctgacctc tggatgcaa aacgtttatt ctgctttgtc tgtttagtaa	2100

```

ttttagataa agctattaat ggcaatattt ttttgctaaa cgtttttggt ttttactgtc      2160
actagggcaa taaaatttat actcaaccat ataataacat tttttaacta ctaaaggagt      2220
agttttttatt ttaaagtctt agcaatttct attacaactt ttcttagact taacacttat      2280
gataaatgac taacatagta acagaatctt tatgaaatat gaccttttct gaaaatacat      2340
actttttacat ttctacttta ttgagaccta ttagatgtaa gtgctagtag aatataagat      2400
aaaagaggct gagaattacc atacaagggt attacaactg taaaacaatt tatctttggt      2460
tcattgttct gtcaataatt gttaccaaaag agataaaaat aaaagcagaa tgtatatcat      2520
cccatctgaa aaacactaat tattgacatg tgcattctgta caataaactt aaaatgatta      2580
ttaaataatc aaatatatct actacattgt ttatattatt gaataaagta tattttccaa      2640
atgt                                                                2644

```

<210> 6

<211> 270

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```

Met Lys Pro Lys Met Lys Tyr Ser Thr Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys
1           5           10           15

Trp Lys Asn Thr Ala Ser Lys Ala Leu Cys Phe Lys Leu Gly Lys Ser
          20           25           30

Gln Gln Lys Ala Lys Glu Val Cys Pro Met Tyr Phe Met Lys Leu Arg
          35           40           45

Ser Gly Leu Met Ile Lys Lys Glu Ala Cys Tyr Phe Arg Arg Glu Thr
          50           55           60

Thr Lys Arg Pro Ser Leu Lys Thr Gly Arg Lys His Lys Arg His Leu
65           70           75           80

Val Leu Ala Ala Cys Gln Gln Gln Ser Thr Val Glu Cys Phe Ala Phe
          85           90           95

Gly Ile Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser
          100          105          110

Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr
          115          120          125

Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu
          130          135          140

```

5

10

Ile	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Lys	Asp	Lys	Val	Leu
145					150					155					160
Leu	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gln	His	Pro	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly	Asp	Gly
				165					170					175	
Val	Asp	Gly	Lys	Met	Leu	Met	Val	Thr	Leu	Ser	Pro	Thr	Lys	Asp	Phe
			180					185					190		
Trp	Leu	His	Ala	Asn	Asn	Lys	Glu	His	Ser	Val	Glu	Leu	His	Lys	Cys
		195					200					205			
Glu	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Gln	Ala	Phe	Phe	Val	Leu	His	Asn	Met	His
	210					215					220				
Ser	Asn	Cys	Val	Ser	Phe	Glu	Cys	Lys	Thr	Asp	Pro	Gly	Val	Phe	Ile
225					230					235					240
Gly	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Val	Asp	Ser	Ser	Glu
				245					250					255	
Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Leu	Ser	Glu	Thr		
			260					265					270		

<210> 7
 <211> 2542
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 7

gaggagggac ctacaaagac tggaactat tcttagctcc gtcactgact ccaagttcat	60
ccccctctgtc ttccagtttg gttgagatat aggctactct tcccaactca gtcttgaaga	120
gtatcaccaa ctgcctcatg tgtggtgacc ttcactgtcg tatgccagtg actcatctgg	180
agtaatctca acaacgagtt accaatactt gctcttgatt gataaacaga atgggggtttt	240
ggatcttagc aattctcaca attctcatgt attccacagc agcaaagttt agtaaacaat	300
catgggggct ggaaaatgag gctttaattg taagatgtcc tagacaagga aaacctagtt	360
acaccgtgga ttggtattac tcacaaacaa acaaaagtat tccactcag gaaagaaatc	420
gtgtgtttgc ctcaggccaa cttctgaagt ttctaccagc tgcagttgct gattctggta	480
tttataacctg tattgtcaga agtcccacat tcaataggac tggatatgcg aatgtcacca	540
tatataaaaa acaatcagat tgcaatgttc cagattatct gatgtattca acagtatctg	600
gatcagaaaa aaattccaaa atttattgtc ctaccattga cctctacaac tggacagcac	660
ctcttgagtg gtttaagaat tgtcaggctc ttcaaggatc aaggtacagg gcgcacaagt	720
catttttggt cattgataat gtgatgactg aggacgcagg tgattacacc tgtaaattta	780
tacacaatga aaatggagcc aattatagtg tgacggcgac caggtccttc acggtcaagg	840

```

atgagcaagg cttttctctg tttccagtaa tgggagcccc tgcacaaaat gaaataaagg      900
aagtggaaat tggaaaaaac gcaaacctaa cttgctctgc ttgttttgga aaaggcactc      960
agttcttggc tgccgtcctg tggcagctta atggaacaaa aattacagac tttggtgaac     1020
caagaattca acaagaggaa gggcaaaatc aaagtttcag caatgggctg gcttgtctag     1080
acatggtttt aagaatagct gacgtgaagg aagaggattt attgctgcag tacgactgtc     1140
tggccctgaa tttgcatggc ttgagaaggc acaccgtaag actaagtagg aaaaatccaa     1200
gtaaggagtg tttctgagac tttgatcacc tgaactttct ctagcaagtg taagcagaat     1260
ggagtgtggt tccaagagat ccatcaagac aatgggaatg gcctgtgcc aaaaatgtgc     1320
ttctcttctt cgggatgttg tttgctgtct gatctttgta gactgttcct gtttgcctggg     1380
agcttctctg ctgcttaaat tgttcgtcct cccccactcc ctccatcgt tggtttgcct     1440
agaacactca gctgcttctt tggtcacact tgttttctaa ctttatgaac tccctctgtg     1500
tactgtatg tgaaaggaaa tgcaccaaca accgtaaact gaacgtgttc ttttgcctc     1560
ttttataact tgcattacat gttgtaagca tgggtcgttc tatacctttt tctggtcata     1620
atgaacactc attttgtag cgagggtggt aaagtgaaca aaaaggggaa gtatcaaact     1680
actgccattt cagtgagaaa atcctaggtg ctactttata ataagacatt tgttaggcca     1740
ttcttgcatg gatataaaga aatacctgag actgggtgat ttatatgaaa agagggttaa     1800
ttggctcaca gttctgcagg ctgtatggga agcatggcgg catctgcttc tggggacacc     1860
tcaggagctt tactcatggc agaaggcaaa gcaaaggcag gcacttcaca cagtaaaagc     1920
aggagcgaga gagagggtgc aactgaaac agccagatct catgagaagt cactcactat     1980
tgcaaggaca gcatcaaaga gatggtgcta aaccattcat gatgaactca ccccatgat     2040
ccaatcacct cccaccaggc tccacctcga atactgggga ttaccattca gcatgagatt     2100
tgggcaggaa cacagaccca aaccatacca cacacattat cattgttaaa ctttgtaaag     2160
tatttaaggt acatggaaca cacgggaagt ctggtagctc agcccatthc tttattgcat     2220
ctgttattca ccatgtaatt cagggtaccac gtattccagg gagcctttct tggccctcag     2280
tttgagctat acacactthc caagtactct tgtagcatcc tgtttgtatc atagcactgg     2340
tcacattgcc ttacctaaat ctgtttgaca gtctgtcaa cagactgca agctccatga     2400
gggcagggac atcatctctt ccatctttgg gtccttagtg caatacctgg cagctagcca     2460
gtgctcagct aaatatttgt tgactgaata aatgaatgca caacaaaaaa aaaaaaaaaa     2520
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa                                     2542

```

<210> 8
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<200>
 <221> SEÑAL

5 <222> (1)..(18)
 <200>
 <221> CADENA
 <222> (19)..(328)

 <400> 8

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

Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly
225 230 235 240

Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
245 250 255

Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
260 265 270

Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
275 280 285

Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
290 295 300

Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
305 310 315 320

Lys Asn Pro Ser Lys Glu Cys Phe
325

<210> 9

<211> 2058

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

```

aaagagagggc tggctgttgt atttagtaaa gctataaagc tgtaagagaa attggctttc      60
tgagttgtga aactgtgggc agaaagttga ggaagaaaga actcaagtac aaccaatga      120
ggttgagata taggtactc ttcccaactc agtcttgaag agtatcacca actgctcat      180
gtgtggtgac cttcactgtc gtatgccagt gactcatctg gagtaatctc aacaacgagt      240
taccaatact tgctcttgat tgataaacag aatggggttt tggatcttag caattctcac      300
aattctcatg tattccacag cagcaaagtt tagtaaacaa tcatggggcc tggaaaatga      360
ggctttaatt gtaagatgtc ctagacaagg aaaacctagt tacaccgtgg attggtatta      420
ctcacaaaca aacaaaagta ttcccaactc ggaaagaaat cgtgtgtttg cctcaggcca      480
acttctgaag tttctaccag ctgcagttgc tgattctggt atttataoct gtattgtcag      540
aagtcocaca ttcaatagga ctggatatgc gaatgtcacc atatataaaa aacaatcaga      600
ttgcaatggt ccagattatt tgatgtattc aacagtatct ggatcagaaa aaaattccaa      660
aatttattgt cctaccattg acctctacaa ctggacagca cctcttgagt ggtttaagaa      720
ttgtcaggct cttcaaggat caaggtacag ggcgcacaag tcatttttgg tcattgataa      780
tgtgatgact gaggacgcag gtgattacac ctgtaaattt atacacaatg aaaatggagc      840
caattatagt gtgaaggcga ccaggtcctt cacggtcaag gatgagcaag gcttttctct      900

```

```

gtttccagta atcggagccc ctgcacaaaa tgaaataaag gaagtggaaa ttggaaaaaa 960
cgcaaacctt acttgctctg cttgttttgg aaaaggcact cagttcttgg ctgccgtcct 1020
gtggcagctt aatggaacaa aaattacaga ctttgggtgaa ccaagaattc aacaagagga 1080
agggcaaaat caaagtttca gcaatgggct ggcttgtcta gacatggttt taagaatagc 1140
tgacgtgaag gaagaggatt tattgctgca gtaogactgt ctggccctga atttgcattg 1200
cttgagaagg cacaccgtaa gactaagtag gaaaaatcca attgatcatc atagcatcta 1260
ctgcataatt gcagtatgta gtgtattttt aatgctaata aatgtcctgg ttatcatcct 1320
aaaaatgttc tggattgagg ccactctgct ctggagagac atagctaaac ottacaagac 1380
taggaatgat ggaaagctct atgatgctta tgttgtctac ccacggaact acaaatccag 1440
tacagatggg gccagtcgtg tagagcactt tgttcaccag attctgcctg atgttcttga 1500
aaataaatgt ggctatacct tatgcattta tgggagagat atgctacctg gagaagatgt 1560
agtcactgca gtggaaacca acatacgaag gagcaggcgg cacattttca tcttgacccc 1620
tcagatcact cacaataagg agtttgctta cgagcaggag gttgccctgc actgtgcctt 1680
catccagaac gacgccaagg tgatacttat tgagatggag gctctgagcg agctggacat 1740
gctgcaggct gaggcgcttc aggactccct ccagcatcct atgaaagtac aggggaacct 1800
caagtggagg gaggaccaca ttgccaataa aaggctcctg aattctaaat tctggaagca 1860
cgtgaggtac caaatgcctg tgccaagcaa aattcccaga aaggcctcta gtttgactcc 1920
cttggtgccc cagaagcaat agtgctgct gtgatgtgca aaggcatctg agtttgaagc 1980
tttcctgact tctcctagct ggcttatgcc cctgcactga agtgtgagga gcaggaatat 2040
taaagggatt caggcctc 2058

```

<210> 10
 <211> 556
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<200>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(18)

<200>
 <221> CADENA
 <222> (19)..(556)

<400> 10

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
 1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
 20 25 30

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

Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
290 295 300

Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
305 310 315 320

Lys Asn Pro Ile Asp His His Ser Ile Tyr Cys Ile Ile Ala Val Cys
325 330 335

Ser Val Phe Leu Met Leu Ile Asn Val Leu Val Ile Ile Leu Lys Met
340 345 350

Phe Trp Ile Glu Ala Thr Leu Leu Trp Arg Asp Ile Ala Lys Pro Tyr
355 360 365

Lys Thr Arg Asn Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Val Tyr Pro
370 375 380

Arg Asn Tyr Lys Ser Ser Thr Asp Gly Ala Ser Arg Val Glu His Phe
385 390 395 400

Val His Gln Ile Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Cys Gly Tyr Thr
405 410 415

Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Met Leu Pro Gly Glu Asp Val Val Thr
420 425 430

Ala Val Glu Thr Asn Ile Arg Lys Ser Arg Arg His Ile Phe Ile Leu
435 440 445

Thr Pro Gln Ile Thr His Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Val
450 455 460

Ala Leu His Cys Ala Leu Ile Gln Asn Asp Ala Lys Val Ile Leu Ile
465 470 475 480

Glu Met Glu Ala Leu Ser Glu Leu Asp Met Leu Gln Ala Glu Ala Leu
485 490 495

Gln Asp Ser Leu Gln His Leu Met Lys Val Gln Gly Thr Ile Lys Trp
500 505 510

Arg Glu Asp His Ile Ala Asn Lys Arg Ser Leu Asn Ser Lys Phe Trp
515 520 525

Lys His Val Arg Tyr Gln Met Pro Val Pro Ser Lys Ile Pro Arg Lys
530 535 540

Ala Ser Ser Leu Thr Pro Leu Ala Ala Gln Lys Gln
545 550 555

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de IL-33 para su uso en el tratamiento de la escleroderma en un sujeto, en donde dicho antagonista se selecciona de entre:
5 un anticuerpo antagonista, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-33 (SEQ ID NO: 6);
 un polipéptido ST2 soluble;
10 un ácido nucleico antisentido que bloquee específicamente la producción de IL-33 (SEQ ID NO: 6); y
 un ARNip que bloquee específicamente la producción de IL-33 (SEQ ID NO: 6).
2. El antagonista para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, que es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se unen específicamente a la IL-33 (SEQ ID NO: 6).
- 15 3. El antagonista para su uso de acuerdo con la Reivindicación 2, en el que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, son un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.
4. El antagonista para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, que es un polipéptido ST2 soluble.
- 20 5. El antagonista para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, que es un ácido nucleico antisentido que bloquea específicamente la producción de IL-33 (SEQ ID NO: 6).
6. El antagonista para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, que es un ARNip que bloquea específicamente la producción de IL-33 (SEQ ID NO: 6).
- 25 7. El antagonista para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, que bloquea la unión de IL-33 a su receptor, receptor que comprende ST2 e IL-1RAcP.
8. El antagonista para su uso de acuerdo con cualquier Reivindicación anterior, en donde el sujeto es un ser humano y la IL-33 es la IL-33 humana (SEQ ID NO: 6).
- 30 9. Uso de un antagonista de IL-33 como se define en cualquier reivindicación anterior para la fabricación de un medicamento para tratar la escleroderma.

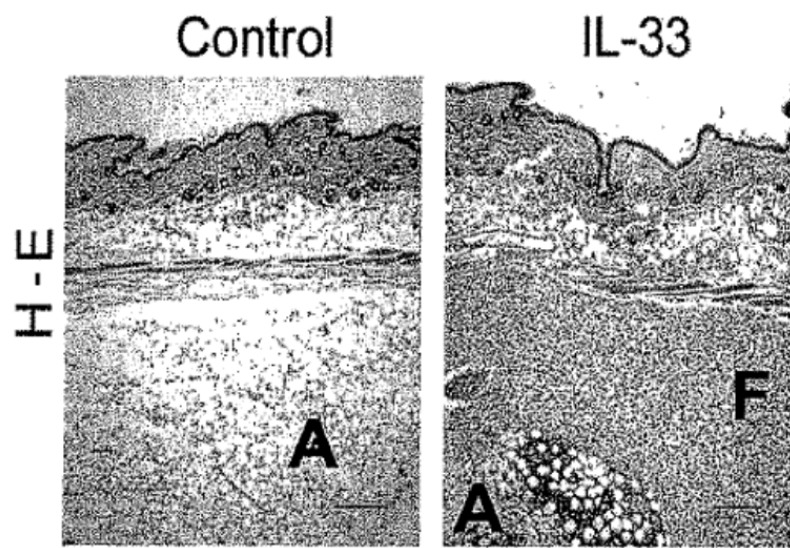


Fig. 1A

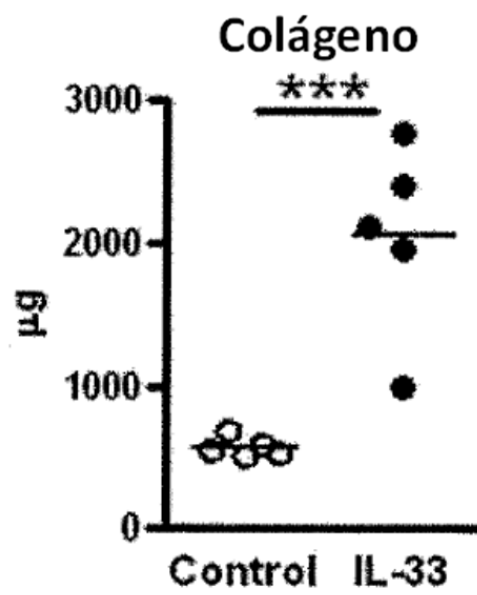


Fig. 1B

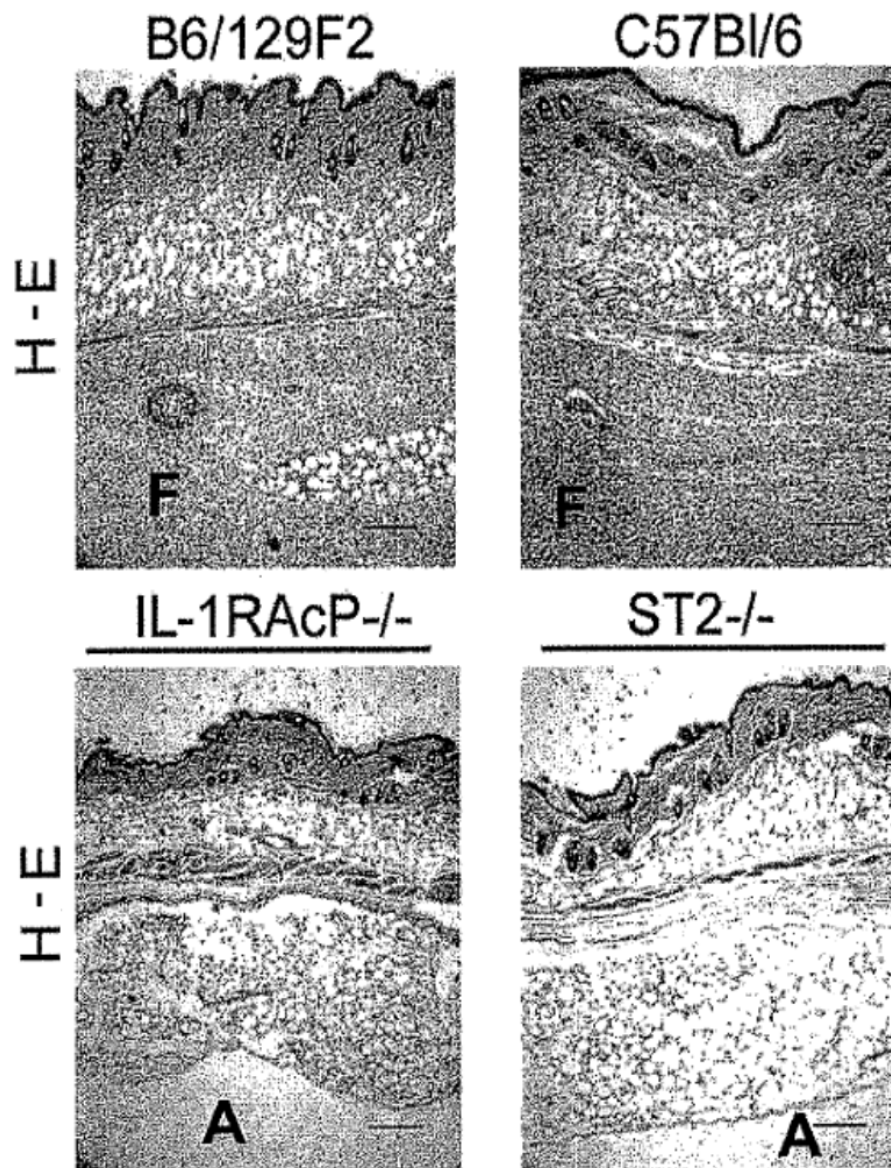


Fig. 2

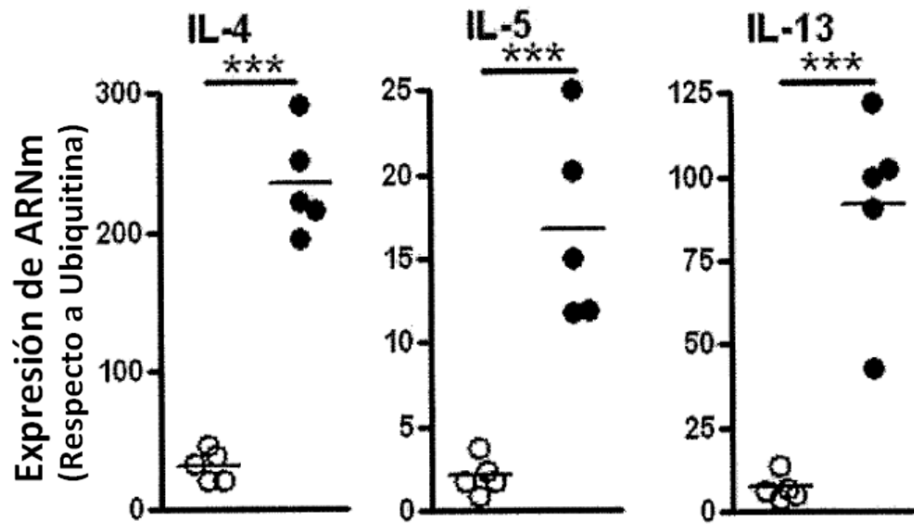


Fig. 3A

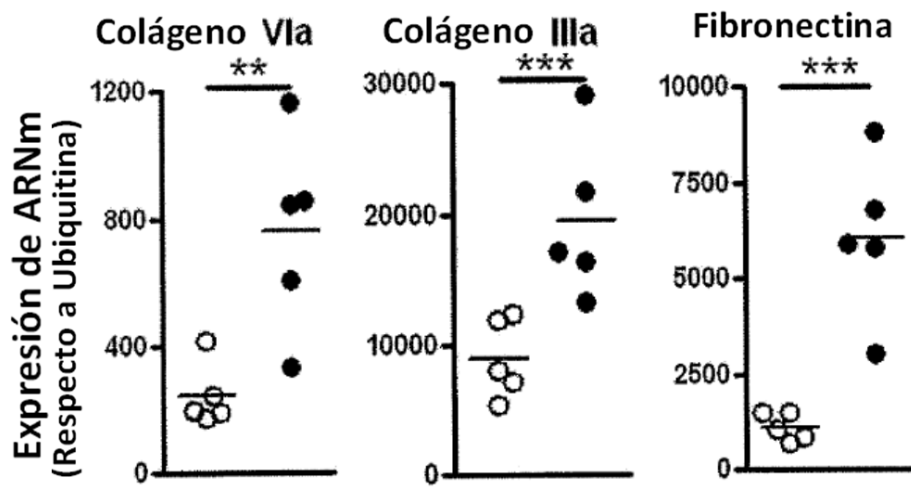


Fig. 3B

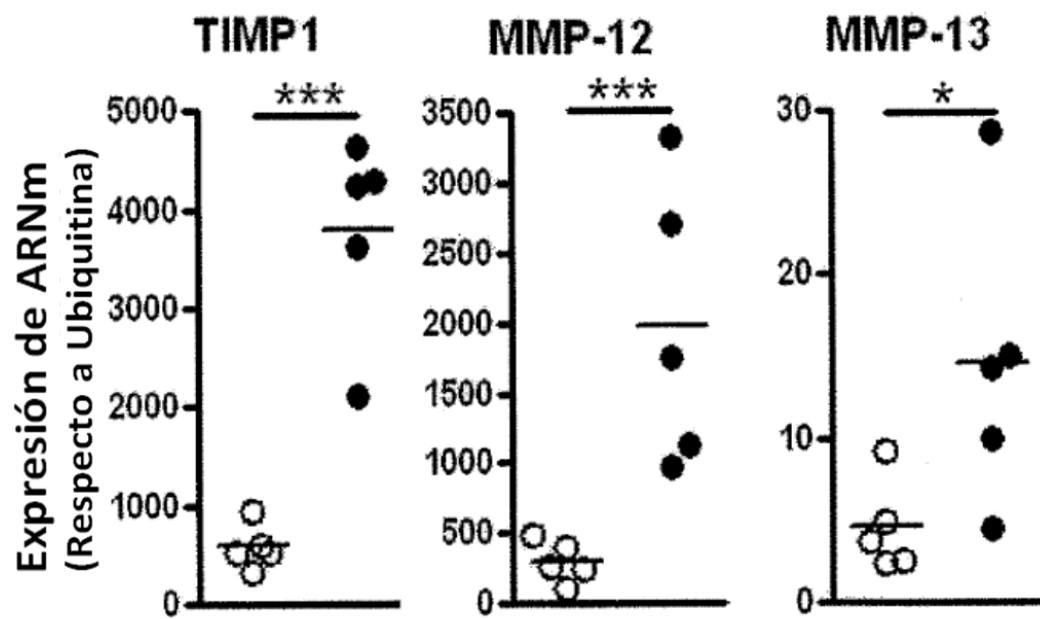


Fig. 3C

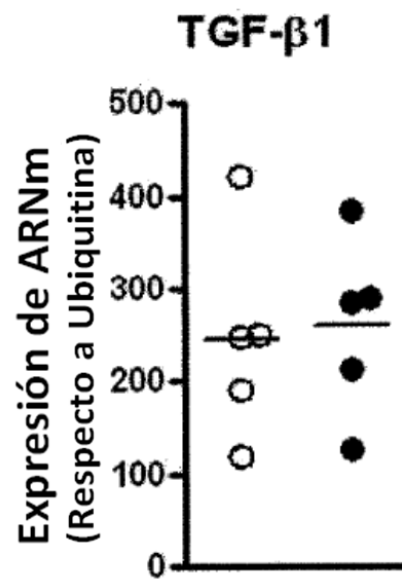


Fig. 3D

	Control		IL-33			
	Media	SEM	Media	SEM	valor p	veces de Δ
COL6A1	243,594	45,174	761,419	139,112	0,016	3,126
COL3A1	8969,726	1354,983	19519,941	2751,498	0,008	2,176
COL1A1	5345,496	763,299	9456,125	1311,370	0,056	1,769
COL14A1	310,316	52,776	515,309	77,970	0,056	1,661
COL4A5	9,013	1,710	10,089	3,260	1,000	1,119
COL10A1	0,182	0,012	0,160	0,010	0,222	0,880
COL9A1	8308,203	1108,035	5783,421	476,333	0,310	0,696
COL12A1	38,128	14,485	21,236	3,117	0,413	0,557
COL15A1	619,720	94,157	312,581	37,011	0,016	0,504
COL8A1	2,310	0,539	1,118	0,245	0,095	0,484
COL17A1	11,060	2,600	5,276	1,064	0,032	0,477
COL7A1	98,811	18,689	46,258	7,447	0,016	0,468
COL19A1	1,317	0,469	0,610	0,143	0,222	0,463
COL16A1	191,405	21,320	87,131	12,663	0,008	0,455
COL4A1	530,664	85,602	223,917	28,342	0,008	0,422
COL2A	3,834	0,469	1,469	0,282	0,008	0,383
COL13A1	20,025	1,732	7,444	0,947	0,016	0,372
COL18A1	139,043	24,400	50,161	7,910	0,008	0,361
COL11A1	39,187	8,464	7,098	0,582	0,008	0,181
MMP-12	297,567	64,715	1980,023	455,073	0,008	6,654
MMP-25	3,361	1,074	16,130	3,561	0,032	4,799
MMP-13	4,570	1,273	14,505	4,027	0,032	3,174
MMP-3	687,659	135,400	1096,785	42,736	0,056	1,595
MMP-23	31,888	7,050	45,692	9,256	0,310	1,433
MMP-10	3,813	1,088	5,017	0,673	0,421	1,316
MMP-7	0,636	0,188	0,827	0,215	0,548	1,301
MMP-19	34,782	7,187	45,029	4,908	0,222	1,295
MMP-24	0,208	0,025	0,237	0,041	0,841	1,142
MMP-2	1750,424	350,882	1896,469	345,731	0,841	1,083
MMP-14	143,894	18,766	151,229	28,160	0,841	1,051
MMP-17	0,410	0,091	0,382	0,076	0,548	0,932
MMP-21	0,182	0,012	0,160	0,010	0,222	0,880
MMP-16	4,264	0,549	3,328	0,476	0,421	0,781
MMP-15	47,117	8,385	32,749	4,185	0,222	0,695
MMP-17	2,467	0,506	1,699	0,233	0,421	0,689
MMP-11	21,142	3,427	10,716	1,825	0,016	0,507
MMP-20	2,268	0,993	0,160	0,010	0,056	0,071
TIMP-1	592,139	102,076	3781,486	446,999	0,008	6,386
TIMP-2	3954,447	366,256	5736,487	226,663	0,016	1,451
TIMP-3	1386,877	216,263	610,602	129,304	0,032	0,440
BMP4	2467,625	213,069	10955,462	1427,708	0,008	4,440
BMP2	1555,782	188,555	1236,423	116,306	0,095	0,795
BMP6	289,015	40,589	141,902	18,181	0,008	0,491

Fig. 4

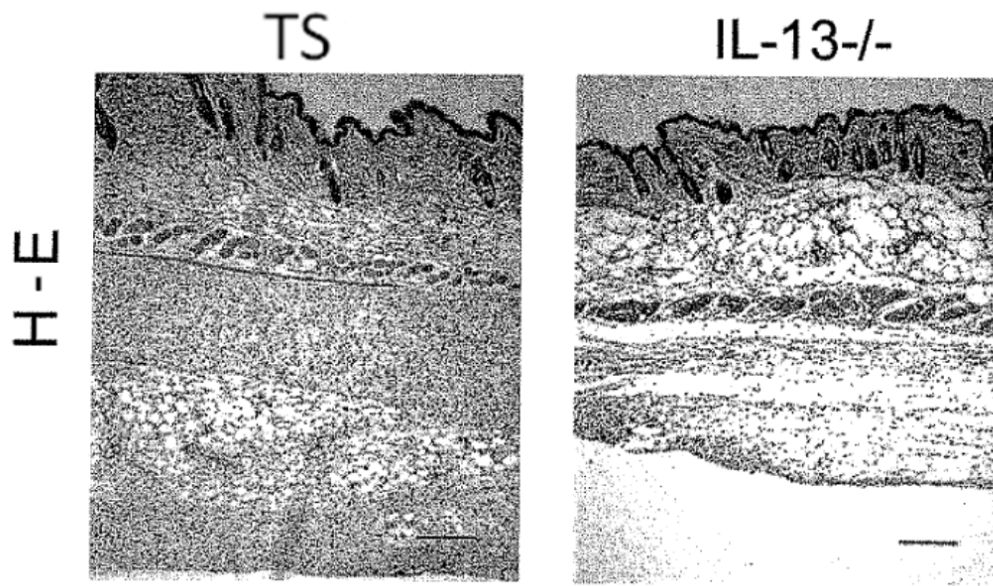


Fig. 5A

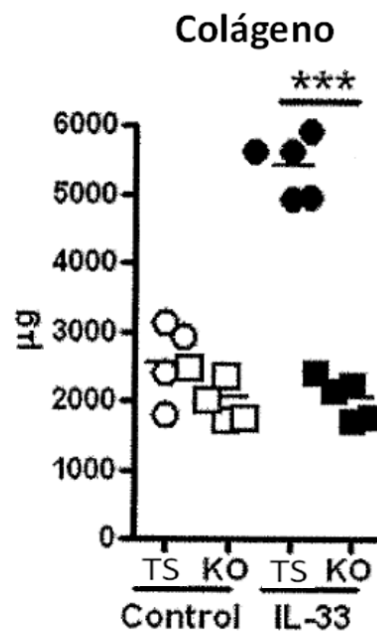


Fig. 5B

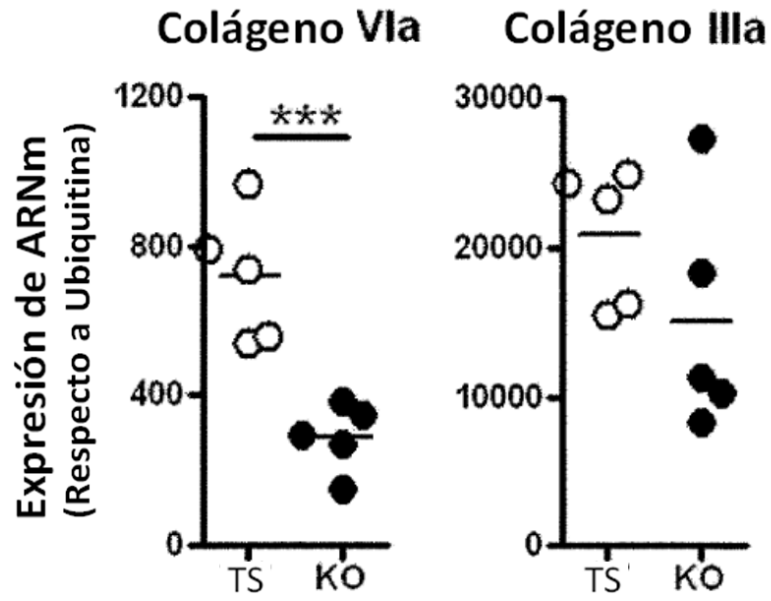


Fig. 5C

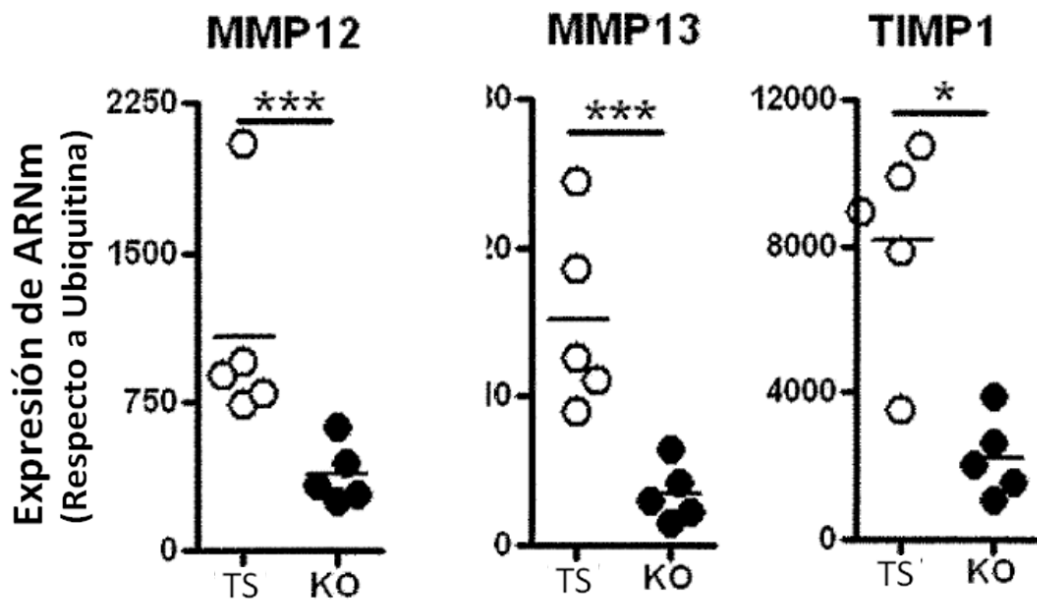


Fig. 5D

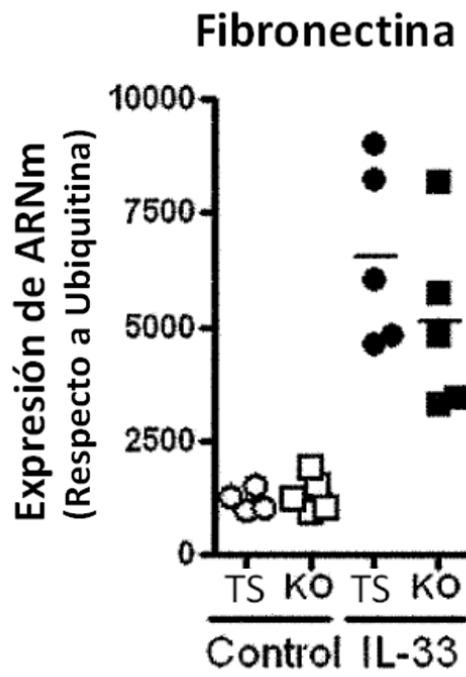


Fig. 5E

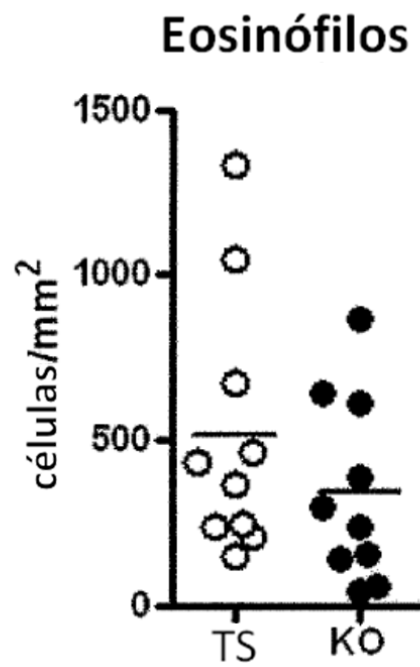


Fig. 5F