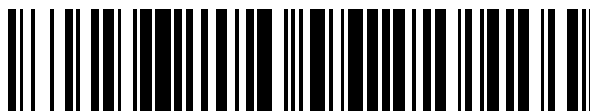


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 845**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2008 E 12169572 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2514436**

54 Título: **IL-22 para su uso en el tratamiento de trastornos microbianos**

30 Prioridad:

07.11.2007 US 986170 P

13.12.2007 US 13620 P

20.12.2007 US 15620 P

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

10.04.2018

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

ABBAS, ALEXANDER, R.;

DANILENKO, DIMITRY, M.;

DE SAUVAGE, FREDERIC, J.;

GHILARDI, NICO, P.;

MODRUSAN, ZORA;

OUYANG, WENJUN;

VALDEZ, PATRICIA, A. y

ZHENG, YAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 662 845 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

IL-22 para su uso en el tratamiento de trastornos microbianos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al tratamiento de trastornos microbianos mediante la modulación de la respuesta inmunitaria del huésped.

10 **Antecedentes**

La infección por patógenos microbianos representa una de las principales causas de muerte en todo el mundo y sigue representando una grave amenaza para la salud mundial (OMS, El Informe Mundial de la Salud (2004)). Por ejemplo, los agentes patógenos bacterianos de adhesión y borrado (A/E), tales como *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) y *E. coli* enteropatogénica (EPEC) se encuentran entre las bacterias que causan diarrea, morbilidad y mortalidad, especialmente entre lactantes y niños en el mundo en desarrollo (2). *E. coli* O157:H7, una de las cepas de ECEH, produjo la hospitalización de muchas personas y 3 muertes el año pasado en Estados Unidos (MMWR Morb Mortal Wkly Rep 55, 1045 (Sep 29, 2006)). También se cree que más del 90 % de todos los casos de síndrome urémico hemolítico (SUH) posdiarrea en los países industrializados se debió a la infección producida por *E. coli* O157:H7 (R. L. Siegler, *Pediatr Clin North Am* 42, 1505 (Dec, 1995)). Otras cepas de EPEC, tal como *E. coli* O55: H7, también causa enfermedades intestinales entre los lactantes en todo el mundo (T. S. Whittam et al., *Infect Immun* 61, 1619 (May, 1993)). Gran parte de nuestro conocimiento sobre cómo los huéspedes controlan la infección de los patógenos A/E proviene del estudio de la infección por *Citrobacter rodentium*, un patógeno natural en ratones (L. Eckmann, *Ann NY Acad Sci* 1072, 28 (August 1, 2006)). Similar a la patogenia de EHEC o EHEC en seres humanos, que unen íntimamente adjunta de *C. rodentium* a las células epiteliales colónicas murinas da como resultado el borramiento de las microvellosidades del borde en cepillo, denominadas lesiones de adhesión y borrado (A/E) e hiperplasia colónica (D. B. Schauer, S. Falkow, *Infect Immun* 61, 2486 (Jun, 1993)).

Tanto las células epiteliales intestinales como las inmunes desempeñan papeles cruciales en la defensa del huésped contra los patógenos A/E. Las uniones estrechas de las células epiteliales intestinales presentan la primera barrera para evitar que los microbios abandonen la luz intestinal (T. T. MacDonald, G. Monteleone, *Science* 307, 1920 (March 25, 2005)). Adicionalmente, las células epiteliales secretan péptidos antimicrobianos para controlar los patógenos en el tracto gastrointestinal (GI) (A. Takahashi et al., *FEBS Lett* 508, 484 (Nov 23, 2001)). Estudios con cepas de ratones inmunodeficientes durante la infección por *C. rodentium* infección establecieron que los linfocitos T CD4+, los linfocitos B y las respuestas de anticuerpos específicos frente a *C. rodentium* son todos componentes esenciales de la inmunidad adaptativa para contener y erradicar la infección (L. Bry, M. B. Brenner, *J Immunol* 172, 433 (January 1, 2004)). Muchas citocinas producidas por los linfocitos durante la infección pueden mejorar las respuestas inmunitarias innatas de las células epiteliales. Las funciones específicas de estas citocinas, sin embargo, no están claras durante la infección por patógenos A/E.

La IL -22, una citocina de la familia de la IL-10, es producida por linfocitos, particularmente las células Th17 (Y. Zheng et al., *Nature* 445, 648 (Feb 8, 2007)). Las células Th17 pertenecen a una subpoblación de linfocitos T CD4+ colaboradores recientemente descubierta que también produce IL-17. La IL-17 tiene funciones importantes en el control de infecciones bacterianas extracelulares (K. I. Happel et al., *J. Exp. Med.* 202, 761 (19 de septiembre de 2005)). El papel de la IL-22, sin embargo, en la defensa del huésped aún se desconoce en gran medida. Las proteínas relacionadas con el factor de necrosis tumoral (TNF) se reconocen en la técnica como una gran familia de proteínas que tienen diversas actividades que varían desde la defensa del huésped hasta la regulación inmune hasta la apoptosis. El TNF se identificó por primera vez como un factor derivado del suero que era citotóxico para varias líneas celulares transformadas *in vitro* y causó la necrosis de ciertos tumores *in vivo*. Un factor similar en la superfamilia se identificó y se denominó linfotóxina ("LT"). Debido a las similitudes observadas entre TNF y LT a principios de la década de 1980, se propuso que el TNF y la LT se denominaran TNF- α y TNF- β , respectivamente. Por tanto, la literatura científica hace referencia a ambas nomenclaturas. Tal como se usa en la presente solicitud, el término "TNF" se refiere a TNF- α . La investigación posterior reveló dos formas de linfotóxina, denominadas LT α y LT β . El documento US 2005-0129614 describe otro miembro polipeptídico de la superfamilia del ligando de TNF basado en similitudes estructurales y biológicas, denominado TL-5. Los miembros de la familia de proteínas TNF existen en formas unidas a la membrana que actúan localmente a través del contacto célula-célula, o como proteínas secretadas. Una familia de receptores relacionados con TNF reacciona con estas proteínas y desencadena diversas de señalización que incluyen muerte celular o apoptosis, proliferación celular, diferenciación tisular y respuestas proinflamatorias. El TNF- α en sí mismo ha estado implicado en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, neoplasias malignas y/o enfermedades neurodegenerativas y es un objetivo útil para la terapia biológica específica en enfermedades tales como AR y enfermedad de Crohn.

65 **Sumario de la invención**

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. En particular, la invención proporciona un

polipéptido que comprende IL-22 para su uso en un método para tratar un trastorno microbiano en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del polipéptido, en el que el trastorno microbiano es enfermedad inflamatoria intestinal (EII). La invención proporciona además un agonista de IL-22 que aumenta la actividad de la IL-22 para su uso en un método para tratar un trastorno microbiano en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del agonista de IL-22, en el que el trastorno microbiano es EII y en el que el agonista de IL-22 se selecciona del grupo:

- (a) un polipéptido de fusión IL-22-Fc
- (b) un ácido nucleico de IL-22;
- (c) un polipéptido de fusión de IL-22;
- (d) un anticuerpo o fragmento biológicamente activo del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento se une a IL-22, IL-22R o IL-22BP;
- (e) un anticuerpo monoclonal que se une a IL-22, IL-22R o IL-22BP; y
- (f) un anticuerpo humanizado que se une a IL-22, IL-22R o IL-22BP.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** representa datos que demuestran la defensa del huésped contra la infección por *C. rodentium*. La figura 1 (A) representa los resultados de un análisis de RT-PCR en tiempo real en subunidades de receptor para IL-22 en la pista de GI de ratón de tipo silvestre no infectado; La figura 1 (B-F) representa un análisis de RT-PCR en tiempo real sobre diversas expresiones de citocinas en colon de ratón de infección por *C. rodentium*; La figura 1(G) representa la supervivencia de ratones C57B1/6 (n = 5), IL-23p40^{-/-} (n=5) e IL-6^{-/-} (n=5) tras la infección por *C. rodentium*; y la figura 1(H) representa un análisis de RT-PCR en tiempo real sobre expresiones de IL-22 e IL-17 en colon de ratón C57B1/6, IL- 23p40^{-/-}, e IL-6^{-/-} tras la infección por *C. rodentium*. Para la infección por *C. rodentium*, se inoculó a los ratones por vía oral 2x10⁹ UFC de bacterias. Todos los datos anteriores son representativos de dos experimentos independientes.

La **figura 2** representa datos que demuestran que la deficiencia de IL-22 hace que los ratones sean susceptibles a infección por *C. rodentium*. A ratones IL-22^{-/-} (Fig. 2(A-C)), IL-17RC^{-/-} (D), IL-20Rβ^{-/-} de 6-7 semanas de edad (Fig. 2(F)) o ratones de tipo silvestre (Fig. 2(A-C, E)) se inoculó por vía oral 2x10⁹ UFC de *C. rodentium* y se pesaron en los puntos de tiempo indicados. El análisis histológico de los colon de ratones IL-22^{-/-} y de tipo silvestre 8 días después de la inoculación usando tinción con hematoxilina-eosina (H & E) (Figura 2 (B y C)). Las flechas indican inflamación submucosa (Figura 2 (B)) e invasión bacteriana en las glándulas de la mucosa (Figura 2 (C)). Se muestran los datos representativos (barras = 100 μm para la figura 2 (B) y barras = 25 μm para la figura 2 (C)). Los ratones C57B1/6 de tipo silvestre recibieron 150 μg de mAb anti-IL-22 o mAb IgG1 de control de isotipo por vía intraperitoneal, en días alternos, comenzando el día 0 o el día 8 después de la inoculación (Figura 2 (E)). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **figura 3** representa datos que demuestran el efecto de la deficiencia de IL-22 en ratones durante la infección por *C. rodentium*. Se inoculó a ratones C57B1/6 mice (Fig. 3(A, B y F)), IL-22^{-/-} y de tipo silvestre (Fig. 3(C-E, and G)) por vía oral 2x10⁹ UFC DE *C. rodentium*. Los ratones recibieron 150 μg de mAb anti-IL22 o mAb IgG1 de control de isotipo por vía intraperitoneal en días alternos comenzando el mismo día que la inoculación de *C. rodentium* (Figura 3 (A y B)). El día 10, se fotografiaron los colon y se midió la longitud del colon individual (Figura 3 (A)). El análisis histológico de los colon se realizó usando tinción con hematoxilina-eosina (H & E) (Figura 3 (B)). El análisis histológico de los colon y los hígados (día 8) de ratones IL-22a^{-/-} y fe tipo silvestre infectados se realizó usando tinción H y E (Figura 3 (C y E)). Las flechas en la Figura 3 (C) indican inflamación y ulceración transmural colónica. La Figura 3 (E) representa un microabsceso séptico hepático en el ratón IL-22^{-/-}. Los datos representativos se muestran en la Figura 3 (C), en la que las barras = 500 μm para los paneles superiores y las barras = 100 μm para los paneles inferiores. En la Fig.3(E), las barras = 25 μm. La Fig. 3(D) represente el log₁₀ de las UFC de *C. rodentium* en colon, hígado, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos. La Fig. 3(F-G) representa los niveles séricos de IgG anti-*C. rodentium* mediante ELISA. *p < 0,05. Todos los datos anteriores son representativos de dos experimentos independientes.

La **figura 4** representa datos que demuestran que la IL-22 induce la expresión de la proteína de la familia RegIII antimicrobiana tras la infección por *C. rodentium*. Los cultivos in vitro de colon de ratón C57B1/6 se trataron con 10 μg de IL-22 durante 24 horas, se aislaron los ARN y se usaron para análisis de micromatrices (Figura 4 (A)) y análisis RT-PCR en tiempo real (Figura 4 (B)). En la Fig 4 (C), a los ratones IL-22^{-/-} y compañeros de camada de tipo silvestre se inoculó por vía oral 2x10⁹ UFC de *C. rodentium* y se realizó RT-PCR en tiempo real en ARN aislado de colon de ratón individual recogido en los puntos de tiempo indicados. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **figura 5** representa datos que demuestran la rotura dirigida del gen IL-17RC murino. La Figura 5 (A) representa la estrategia para la generación de ratones defectiv en IL-17RC. Los exones 1-5 (cuadros abiertos) que abarcan la secuencia de codificación de IL-17RC se reemplazaron por un casete de resistencia a la neomicina. La Figura 5 (B) representa el genotipado de la descendencia de ratones de tipo silvestre (WT) y defectivos (KO) usando los conjuntos de cebadores indicados (PI, P2 y P3). Se generaron fibroblastos de la punta de la cola de ratones WT y KO y se estimularon con diversas concentraciones de IL-17A e IL-17F in vitro durante 24 horas, y el sobrenadante del cultivo se recogió para el ELISA de IL-6 (Figura 5 (C)).

La **figura 6** representa los datos de un análisis de RT-PCR en tiempo real sobre la expresión de IL-19, IL-20 e IL-

24 en colon de ratón de tipo silvestre tras la infección por *C. rodentium*, con el tiempo. se inoculó a los ratones C57B1/6 por vía oral 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. Los colon se recogieron en los puntos de tiempo indicados y se usaron ARN aislados para el análisis de RT-PCR en tiempo real.

La **figura 7** representa datos que demuestran la expresión de IL-20R α e IL-20R β en el tracto GI. Análisis de RT-PCR en tiempo real en las subunidades de receptor para IL-19, IL-20 e IL-24 en el tracto GI de ratón de tipo silvestre no infectado.

La **figura 8** representa datos que demuestran la rotura dirigida del gen *IL - 20R β* murino. La Figura 8 (A) representa la estrategia para la generación de ratones defectivos en IL - 20R β . El exón 1 (cuadros abiertos) se reemplazó por un casete de resistencia a la neomicina. La Figura 8 (B) representa el fenotipado de la descendencia de ratones de tipo silvestre (TS), heterocigotos (HET) y defectivos (KO) usando los conjuntos de cebadores indicados (p1, p2 y p3). Figura 8 (C) Las orejas de ratón WT y KO se inyectaron por vía intradérmica con 500 ng de IL-20 recombinante en 20 μ l de PBS o con 20 μ l de PBS solo. Después de 24 horas, se recogieron orejas de ratón para aislamiento de ARN. Se usaron ARN aislados para el análisis de RT-PCR en tiempo real para genes que se sabe que están regulados por aumento tras la señalización de IL-20.

La **figura 9** representa datos de un análisis histológico de colon de ratón de ratones de tipo silvestre tratados con mAb anti-IL-22 inoculados con *C. rodentium*. Se inoculó a los ratones C57B1/6 por vía oral 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. Los ratones también recibieron 150 μ g de mAb anti-IL22 o mAb IgG1 de control de isotipo por vía intraperitoneal en días alternos comenzando el mismo día que la inoculación de *C. rodentium*. El día 10, se realizó el análisis histológico de rutina de los colon usando tinción con hematoxilina-eosina (H & E). Las flechas indican ulceración de la mucosa con inflamación transmural. Se muestran las imágenes representativas, las barras = 500 μ m para los paneles superiores y las barras = 250 μ m para los paneles inferiores.

La **figura 10** representa datos que demuestran los niveles de Ig en suero en ratones IL-22 $^{-/-}$ ratones y compañeros de camada de tipo silvestre durante la infección por *C. rodentium*. Se inoculó a los ratones IL-22 $^{-/-}$ y compañeros de camada de tipo silvestre por vía oral 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. En los puntos de tiempo indicados, se extrajo sangre del ratón. Se determinaron los niveles séricos totales de IgM e IgG (Figura 10 (A)) y los niveles séricos de IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3 anti-*C. rodentium* (Fig. 10(B)) mediante ELISA. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **figura 11** representa datos que demuestran un cultivo ex vivo ELISA de colon de IL-22 (figura 11 (A)) e IL-17 (figura 11 (B)) en colon de ratones C57B1/6, IL-23p19 $^{-/-}$ e IL-6 $^{-/-}$ después de la infección por *C. rodentium*. Para la infección por *C. rodentium*, se inoculó a los ratones por vía oral 2×10^9 UFC de bacterias. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **figura 12** representa un análisis FACS de la expresión de IL-22R en ratón IEL aislado, LPMC y células epiteliales colónicas (Figura 12 (A)), y un análisis FACS de la expresión de IL-22R en células epiteliales colónicas humanas primarias (Figura 12 (B)). Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **figura 13** representa datos que demuestran que la IL-22, producida por las células dendríticas (CD), es crucial para las respuestas inmunes innatas contra la infección por *C. rodentium*. En la figura 13(A), se inoculó a los ratones Rag2 $^{-/-}$ y Balb/c de tipo silvestre por vía oral 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. En la Fig 13 (B y C), los ratones también recibieron 150 μ g de mAb IgG1 de control de isotipo o mAb anti-IL-22 por vía intraperitoneal cada dos días comenzando el mismo día que la inoculación de bacterias y se pesaron en los puntos de tiempo indicados.

La Figura 13 (B) representa un análisis de RT-PCR en tiempo real en tiempo real y la Figura (13 (C) representa un cultivo ELISA ex vivo de colon de LA expresión de IL-22 e IL-17 en colon de ratones Balb/c de tipo silvestre y Rag2 $^{-/-}$ tras la infección por *C. rodentium*. Figura 13(D) representa la tinción inmunohistoquímica para IL-22, CD11c y DAPI el día 4 en colon de ratones Rag2 $^{-/-}$ infectados por *C. rodentium*. Aumento: 400x. La Figura 13 (E) representa datos que demuestran que IL-23 induce directamente la producción de IL-22, medida mediante ELISA, de CD CD11c+ murinas aisladas *in vitro*. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **figura 14** representa datos que demuestran que IL-22 puede inducir la activación de STAT3 en líneas de células de colon humano. En la figura 14(A), se inoculó a los ratones IL-22 $^{-/-}$ y compañeros de camada de tipo silvestre por vía oral 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. Un grupo de ratones IL-22 $^{-/-}$ también recibieron la proteína de fusión mRegIII γ -Ig. Se pesaron los animales y se controlaron en los puntos de tiempo indicados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. En la figura 14 (B), IL-23 induce directamente la producción de IL-22 en CD humanas aisladas, medidas mediante ELISA. La Figura 14 (C) representa la expresión de IL-22R mediante FACS en líneas celulares de colon humano. La figura 14(D) representa una transferencia Western que muestra que IL-22 puede inducir la activación de STAT3 en líneas de células de colon humano. La Figura 14(E) representa un análisis de RT-PCR en tiempo real para la expresión de RegIII γ y RegIII β en líneas de células epiteliales de colon humano tratadas con IL-22. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **figura 15** representa la caracterización de mAb anti-IL-22 para inmunohistoquímica. La figura 15 (A) representa secciones de colon del día 4 de ratones IL-22 $^{-/-}$ y de tipo silvestre infectados por *C. rodentium* o ratones de tipo silvestre no infectados, teñidas con anti-IL-22 mAb anti-IL-22 conjugada con Alexa555 (8E11) o control de isotipo. La figura 15 (B) representa sedimentos celulares de células 293 que expresan IL-22 teñidas con mAb anti-IL-22 conjugado con Alexa555 (8E11) o control de isotipo. El aumento es a 200x.

La **figura 16** representa un análisis del curso del tiempo sobre la expresión de RegIII γ y RegIII β en colon de ratones C57B1/6 e IL-23p19 $^{-/-}$ tras la infección por *C. rodentium*. Se inoculó a los ratones C57B1/6 e IL-23p19 $^{-/-}$ por vía oral 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. En los puntos de tiempo indicados, se recogieron los colon de ratón para la extracción de ARN y posteriormente el análisis de RT-PCR en tiempo real en la expresión de RegIII γ y RegIII β de ratón.

La **figura 17** representa un análisis del curso del tiempo sobre la expresión de otros miembros de la familia Reg en colon de ratones IL-22^{-/-} y de tipo silvestre tras la infección por *C. rodentium*. Se inoculó a los ratones compañeros de camada de tipo silvestre e IL-22^{-/-} por vía oral 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. En los puntos de tiempo indicados, se recogieron los colon de ratón para la extracción de ARN y posteriormente el análisis de RT-PCR en tiempo real.

La **figura 18** representa datos que demuestran que la proteína de fusión RegIII recombinante humana puede proteger parcialmente IL-22^{-/-} tras la infección por *C. rodentium*. Se inoculó a los ratones IL-22^{-/-} y compañeros de camada de tipo silvestre por vía oral 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. Un grupo de ratones IL-22^{-/-} también recibió las proteínas de fusión RegIII₁₋₃-cFlag humanas. Se pesaron los animales y se controlaron en los puntos de tiempo indicados. * $p < 0,05$.

La **figura 19 A-C** representa 161 genes expresados diferencialmente en el colon, a partir del tratamiento con IL-22.

La **figura 20** representa el agrupamiento jerárquico en 2D de 161 genes expresados diferencialmente en colon a partir del tratamiento con IL-22, donde los genes seleccionados se agruparon mediante aglomeración iterativa de vectores más altamente vinculados por el coeficiente de correlación de Pearson, con datos para vectores aglomerados resumidos por la unión promedio.

La **figura 21** representa datos que demuestran que tanto LTbRFc como los mAb anti-IL-22 conducen a la mortalidad después de la infección por *C. rodentium*.

La **figura 22** representa datos que demuestran la regulación de la ruta de LT de múltiples aspectos corriente arriba implicados en la producción de IL-22.

La **figura 23** representa datos que demuestran que IL-22 rescata parcialmente los defectos observados en ratones tratados con LTbR.

La **figura 24** representa datos que demuestran que el tratamiento con mAb anti-IL-22 conduce a la reducción de folículos de colon, a una organización B/T comprometida y a una reducción del número de CD, linfocitos T y linfocitos B en el colon.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores descubrieron una nueva ruta de citoquinas que media la respuesta inmunitaria y la resistencia de los mamíferos a patógenos microbianos infecciosos. En particular, los presentes inventores descubrieron que IL-22 es una de las citocinas clave que une la respuesta inmune adaptativa y la defensa epitelial innata durante la infección temprana de un patógeno bacteriano de unión o borrado (A/E).

Como se muestra en el presente documento, las citocinas, tales como IL-22, que son producidas por las células inmunitarias durante las primeras etapas de la infección son necesarias para que las células epiteliales intestinales obtengan una respuesta antimicrobiana completa y una respuesta de curación de heridas para prevenir la invasión sistémica de microbios patogénicos en el huésped. Los estudios en el presente documento muestran que la IL-22 protege la integridad de la barrera epitelial intestinal y previene la invasión bacteriana con diseminación sistémica. Además, los estudios en el presente documento indican que la IL-22 está implicada en la provocación de las respuestas de IgG antibacterianas tempranas y es indispensable para la inducción de lectinas antimicrobianas, tales como RegIII β y RegIII γ , de las células epiteliales colónicas durante la infección bacteriana. La falta de uno o ambos de estos mecanismos puede contribuir a la respuesta de defensa del huésped comprometida con una mayor diseminación sistémica y mortalidad en ratones IL-22^{-/-} durante la infección por *C. rodentium*.

Como se muestra en el presente documento, la inducción de RegIII β y RegIII γ indica que IL-22 puede tener funciones más amplias en el control de diversas infecciones bacterianas. Los estudios en el presente documento respaldan aún más el papel de las células Th_{IL-17} y sus citocinas efectoras en trastornos infecciosos y trastornos autoinmunes. Además, los estudios en el presente documento indican que la IL-22 y sus productos cadena arriba, tales como RegIII β y RegIII γ , pueden ser beneficiosos para el tratamiento de trastornos infecciosos.

TÉCNICAS GENERALES

Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en el presente documento generalmente se comprenden bien y se emplean comúnmente usando metodología convencional por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3^a Edición (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley y Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); RCP: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers,

1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); (Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers (1995); and Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

I. Definiciones

Con el fin de interpretar la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y siempre que sea adecuado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa.

Un "polipéptido antimicrobiano" o "PAM" es un polipéptido que media, o afecta de otra manera, una respuesta inmunitaria antimicrobiana a un patógeno microbiano y abarca un fragmento, variante, análogo, derivado o mimético del mismo que retiene una actividad de PMA, por ejemplo, una actividad antimicrobiana o actividad para modular una respuesta inmunitaria antimicrobiana. Estos métodos se pueden usar para tratar sujetos que están infectados o en riesgo de infección con un patógeno microbiano infeccioso, por ejemplo, un virus o bacteria. La actividad del Pam puede estar modulada o regulada diferencialmente (por ejemplo, regulada por aumento o por disminución) con relación a otro PAM o al mismo PAM.

Un PAM abarca un PAM nativo y formas variantes del mismo (que se definen adicionalmente en el presente documento) y puede aislarse de diversas fuentes, tales como de tejido humano o de otra fuente, o prepararse por métodos recombinantes o de síntesis. Un PAM nativo puede ser de cualquier especie, por ejemplo, murino o humano. Los PAM incluyen, pero sin limitación, LT, IL -6, IL -18, IL -22, IL-23 (incluidos, por ejemplo, IL-23 p19 o IL-23 p40) y proteínas relacionadas con Reg o Reg codificadas por los genes de la super familia Reg. La super familia Reg incluye genes relacionados con Reg y Reg de ser humano, rata y ratón y se agrupan en cuatro subclases, los tipos I, II, III y IV. Por ejemplo, el tipo I incluye *REG 1α* humana, *REG 1β* humana, *RegI* de rata y *RegI* de ratón; el tipo II incluye *RegII* de ratón; el tipo III incluye *REG III* humana, *HIP/PAP* de ser humano (gene expressado en carcinoma hepatocelular-intestino-páncreas/gen que codifica la proteína asociada con la pancreatitis), *PAP/Peptide23* de rata, *RegIII/PAPII* de rata, *PAP III* de rata, *RegIIIA* de ratón, *RegIIIB*, *RegIIIC* de ratón *RegIIID*, e *INGAP* de hámster (proteína asociada a la neogénesis de los islotes). El tipo IV contiene *REG IV* humana. Adicionalmente, la secuencia relacionada con Reg humano (RS) es, según se ha indicado, un pseudogén. En una realización, la proteína REG está codificada por un miembro de la familia de genes REG humanos, que incluye, aunque sin limitación, *REG 1α*, *REG 1β*, *HIP/PAP*, *REG III*, *REG IV* y la secuencia relacionada con Reg (RS).

La linfotoxina (LT) es una citocina trimérica en la familia de la necrosis tumoral; expresado por linfocitos T, B y NK activados; e involucrada en la señalización de la respuesta inflamatoria y la arquitectura del órgano linfode secundario. "Linfotoxina-" o "LT" se define en el presente documento como un polipéptido biológicamente activo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2A de la patente de Estados Unidos n.º 5.824.509. "LT" se define que excluye específicamente el TNFα humano o sus análogos animales naturales (Pennica et al., Nature 312: 20/27: 724 - 729 (1984)) y Aggarwal et al., J. Biol. Chem. 260: 2345-2354 (1985)). Tal como se usa en el presente documento, "LT" se refiere a una o más subunidades de LT, como se describe en el presente documento.

Linfotoxina-α" o "LTα" se define de modo que excluya específicamente la LTβ humana, como se define, por ejemplo, en el documento US 5.661.004. "Trímero de linfotoxina α-3" o "LTα3" se refiere a un homotrímero de monómeros LTα. Este homotrímero está anclado a la superficie de la célula por los dominios LTβ, transmembrana y citoplásmico.

"Linfotoxina αβ" o "LTαβ" o "complejo LTαβ" se refiere a un heterotrímero de LTα con LTβ. Estos heterotrímeros contienen dos subunidades de LTα y una subunidad de LTβ (LTα2β1), o una subunidad de LTα y dos de LTβ (LTα1β2). El término "LTαβ" o "LTαβ", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un heterotrímero compuesto por una subunidad de LTα y dos de LTα (LTα1β2).

El "receptor 1 del factor de necrosis tumoral" o "TNFRI" y "receptor II del factor de necrosis tumoral" o "TNFRII" se refieren a receptores de TNF de superficie celular para el homotrímero LTα3, también conocidos como p55 y p75, respectivamente.

El "receptor de linfotoxina-β" o "LTβ-R" se refiere al receptor al que se unen los heterotrímeros LTαβ.

La secuencia de aminoácidos de un PAM puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del siguiente grupo: SEQ ID NO: 2 (IL-6 humana), SEQ ID NO: 4 (IL-12B humana), SEQ ID NO: 6 (IL-18 humana), SEQ ID NO: 8 (IL-22 humana), SEQ ID NO: 10 (IL-23 p19 o IL-23A humanas), SEQ ID NO: 12 (REG1A humana), SEQ ID NO: 14 (REG1B humana), (SEQ ID NO: 16 (REG3A humana, variante 1), SEQ ID NO: 18 (REG3A humana, variante 2), SEQ ID NO: 20 (REG3A humana, variante 3), SEQ ID NO: 22 (REG3G humana, variante 2), SEQ ID NO: 24 (REG3G humana, variante 1), SEQ ID NO: 26 (REG4 humana), SEQ ID NO: 28 (IL-6 murina), SEQ ID NO: 30 (IL-12B murina), SEQ ID NO: 32 (IL-18 murina), SEQ ID NO: 34 (IL-22 murina), SEQ ID NO: 36 (IL-23 p19 o IL-23A murinas), SEQ ID NO: 38 (PAP murina), SEQ ID NO: 40 (REG1 murina), SEQ ID NO: 42 (REG2 murina), SEQ ID NO: 44 (REG3A murina), SEQ ID NO: 46 (REG3D murina), SEQ ID NO: 48 (REG4 murina), SEQ ID NO: 50 (LTα humana), SEQ ID NO: 52 (LTβ humana), SEQ ID NO: 54 (LTα murina) y SEQ ID NO: 56 (LTβ murina).

La secuencia de ácido nucleico que codifica un AMP puede comprender una secuencia de ácido nucleico seleccionada DE entre el grupo siguiente: SEQ ID NO: 1 (IL-6 humana), SEQ ID NO: 3 (IL-12B humana), SEQ ID NO: 5 (IL-18 humana), SEQ ID NO: 7 (IL-22 humana), SEQ ID NO: 9 (IL-23 p19 o IL-23A humanas), SEQ ID NO: 11 (REG1A humana), SEQ ID NO: 13 (REG1B humana), SEQ ID NO: 15 (REG3A humana, variante 1), SEQ ID NO: 17 (REG3A humana, variante 2), SEQ ID NO: 19 (REG3A humana, variante 3), SEQ ID NO: 21 (REG3G humana, variante 2), SEQ ID NO: 23 (REG3G humana, variante 1), SEQ ID NO: 25 (REG4 humana), SEQ ID NO: 27 (IL-6 murina), SEQ ID NO: 29 (IL-12B murina), SEQ ID NO: 31 (IL-18 murina), SEQ ID NO: 33 (IL-22 murina), SEQ ID NO: 35 (IL-23 p19 o IL-23A murinas), SEQ ID NO: 37 (PAP murina), SEQ ID NO: 39 (REG1 murina), SEQ ID NO: 41 (REG2 murina), SEQ ID NO: 43 (REG3A murina), SEQ ID NO: 45 (REG3D murina), SEQ ID NO: 47 (REG4 murina), SEQ ID NO: 49 (LT α humana), SEQ ID NO: 51 (LT β humana), SEQ ID NO: 53 (LT α murina) y SEQ ID NO: 55 (LT β murina).

Un "polipéptido de PAM de secuencia nativa" o un "polipéptido de PAM de secuencia nativa" se refiere a un polipéptido que comprende la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido de PAM correspondiente derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos de PAM de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir por medios recombinantes o de síntesis. Los términos abarcan específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural del polipéptido PAM específico (por ejemplo, una IL-22 que carece de su péptido señal asociado), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativas) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido. Los polipéptidos de PAM de secuencia nativa desvelados en el presente documento son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa.

Un polipéptido "variante" se refiere a un polipéptido activo que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia polipeptídica nativa de longitud completa. Generalmente, un polipéptido variante tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 82% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 83% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 84% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 86% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 87% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 88% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 89% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 91% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 92% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 93% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 94% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 96% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 97% de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y, como alternativa, al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia polipeptídica nativa madura o de longitud completa.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en una secuencia polipeptídica específica o de referencia, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y no considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando software de ordenador disponible públicamente tal como BLAST, BLAST-2), ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan. Para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un % determinado de identidad de secuencia para, con o frente a una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como pares idénticos por el programa de alineación de secuencia en la alineación del programa de A y B y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A respecto de B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto de A. Como ejemplos de cálculos del % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A usando este método, las tablas 1 y 2 a continuación demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencia

de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada "proteína de referencia" con respecto a la secuencia de aminoácidos designada "IL-22", en la que "IL-22" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-22 de interés, "proteína de referencia" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido frente al cual se compara el polipéptido "IL-22" de interés, y "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes residuos de aminoácidos.

5

Tabla 1

IL-22	XXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de referencia	XXXXXXXXYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos = (el número de restos de aminoácidos idénticamente coincidentes entre las dos secuencias de polipéptidos) dividido por (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido de IL-22) = 5 dividido por 15 = 33,3 %

10

Tabla 2

IL-22	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de referencia	XXXXXXXXYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos = (el número de restos de aminoácidos idénticamente coincidentes entre las dos secuencias de polipéptidos) dividido por (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido de IL-22) = 5 dividido por 10 = 50 %

15

Una molécula biológica "aislada", tal como los diversos polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos desvelados en el presente documento, se refiere a una molécula biológica que se ha identificado y separado y/o recuperado de al menos un componente de su entorno natural.

20 "Activo" o "actividad", con referencia a un polipéptido, se refiere a una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido nativo, en el que la actividad "biológica" se refiere a una función biológica de un polipéptido nativo distinta de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por el polipéptido nativo. Una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido nativo.

25

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido. También están abarcadas en "antagonista" las moléculas que inhiben total o parcialmente la transcripción o traducción del ARNm que codifica el polipéptido. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos fragmentos de anticuerpos antagonistas; fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido nativo; péptidos; oligonucleótidos antisentido; moléculas orgánicas pequeñas; y ácidos nucleicos que codifican antagonistas polipeptídicos o anticuerpos antagonistas. La referencia a "un" antagonista abarca un único antagonista o una combinación de dos o más antagonistas diferentes.

30

35 El término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido, por ejemplo, un AMP nativo. También quedan abarcadas en "agonista" las moléculas que estimulan la transcripción o traducción del ARNm que codifica el polipéptido. Las moléculas agonistas adecuadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos agonistas; un polipéptido nativo; fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido nativo; péptidos; oligonucleótidos antisentido; moléculas orgánicas pequeñas; y ácidos nucleicos que codifican agonistas o anticuerpos de polipéptidos. La referencia a "un" agonista abarca un único agonista o una combinación de dos o más agonistas diferentes.

40

Una "respuesta inmunitaria antimicrobiana" incluye, aunque sin limitación, resistencia o defensa frente a la infección por un patógeno microbiano. Dicha resistencia o defensa puede dar como resultado una inhibición o disminución de la infectividad microbiana, replicación, proliferación u otra actividad de un patógeno microbiano. En particular, el tratamiento que da como resultado una respuesta inmunitaria antimicrobiana puede dar como resultado el alivio de un trastorno microbiano o síntoma de un trastorno microbiano.

45

"Alivio", "aliviar" o equivalentes de los mismos, se refieren tanto a un tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, en el que el objeto es mejorar, prevenir, ralentizar (disminuir), disminuir o inhibir el trastorno microbiano diana o síntoma del mismo. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se quiera prevenir el trastorno.

50

Con referencia al tratamiento de un trastorno microbiano, "tratamiento", "tratar", o equivalentes de los mismos, se refiere a aliviar un trastorno microbiano o un síntoma de un trastorno microbiano, en un sujeto que tiene el trastorno.

55

La administración "crónica" se refiere a la administración de uno o más agentes en un modo continuo en oposición a un modo agudo, a fin de mantener el efecto terapéutico inicial durante un período prolongado de tiempo. La administración "intermitente" es un tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

60

"Mamífero" para los fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, roedores (por ejemplo, ratones y ratas) y monos; animales domésticos y de granja; animales de zoológico, de deportes, de laboratorio o animales de compañía, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. En algunas realizaciones, el mamífero se selecciona de entre un ser humano, roedor o mono. De forma similar, "sujeto" para los fines del tratamiento, se refiere a un sujeto mamífero e incluye tanto sujetos humanos como veterinarios.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

"Vehículos", tal como se usa en el presente documento, incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contra iones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

Los anticuerpos "(Abs) y las "inmunoglobulinas" (Igs) son glucoproteínas que tienen características estructurales similares. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que generalmente carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos de esta última clase se producen, por ejemplo, a niveles bajos en el sistema linfático y a niveles aumentados en los mielomas.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (como se describe con mayor detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

Un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno concreto se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno con una afinidad suficiente, de tal forma que el anticuerpo es útil como agente para diagnóstico y/o terapéutico para su direccionamiento al antígeno. Preferentemente, el alcance de la unión de un anticuerpo tal a un polipéptido no diana es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo al antígeno diana, según se ha medido, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a un antígeno diana tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar "VH" El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar "VL". Estos dominios generalmente son las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión al antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto a su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR), tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan "regiones estructurales" (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de lámina beta, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas muy cerca de las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

En función de la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas; IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de éstos pueden además dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se han descrito generalmente en, por ejemplo, Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4ª ed. (2000). Un anticuerpo puede formar parte de una molécula de fusión más grande formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan de manera indistinta en el presente documento para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente similar, no fragmentos de anticuerpos como se define más adelante. Los términos se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen la región Fc.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, en la que la porción retiene al menos una, y tantas como la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas con esa porción cuando están presentes en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por lo tanto, conserva la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función de CCDA y unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar con facilidad. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y sigue siendo capaz de reticularse con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en una asociación fuerte no covalente. En una especie de Fv de cadena simple (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera se puede unir covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. En esta configuración las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en los que el resto (o los restos) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Generalmente, polipéptido scFv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los scFv véase Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

El término "diacuerpo" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Utilizando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Se describen los diacuerpos más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO93/1161; Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetraacuerpos también se describen en Hudson et al. (2003) Nat. Med 9:129-134.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. De este modo, el modificador "monoclonal" indica que la naturaleza del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos pequeños. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal normalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en la que la secuencia polipeptídica que se une a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a la diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, humanizar la secuencia de unión a la diana, mejorar su producción en cultivo celular, reducir su inmunogenicidad *in vivo*, crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada es también un anticuerpo monoclonal. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas en cuando a que normalmente no están contaminadas con otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden producirse mediante diversas técnicas, que incluyen, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567), tecnologías de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen partes o todos los loci o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento WO98/24893; el documento WO96/34096; el documento WO96/33735; el documento WO91/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de Estados Unidos N.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; Marks et al., *Bio. Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el grupo de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, en tanto que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden efectuar para perfeccionar adicionalmente el funcionamiento de los anticuerpos. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana o todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que ha sido fabricado usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos como se desvela en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda restos de unión a antígeno no humanos.

5 En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de éstas pueden además dividirse en "subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.

10 Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en uno o más HVR del mismo que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones(s). En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se pueden producir mediante procedimientos conocidos en la materia. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad por la mezcla de dominios VII y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos HVR y/o

15 estructurales la describen: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154 (7): 3310-9 (1995); y Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

20 Un anticuerpo "bloqueante", anticuerpo "neutralizante" o anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno al que se une. Tales anticuerpos pueden inhibir sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

25 Un "anticuerpo agonista", tal como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido de interés.

Las "funciones efectoras" del anticuerpo hacen referencia a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia nativa o una región Fc de la variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (CCDA); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

30

"Afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede estar representada en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica,

40 incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En la técnica se conocen diversos procedimientos de medición de la afinidad de unión, cualquiera de los cuales se puede usar. Los enfoques ilustrativos específicos se describen a continuación.

45 En una estrategia, la "Kd" o "valor de Kd" se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe mediante el siguiente ensayo. La afinidad de unión a la solución de Fab por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, capturando

50 después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con 2 · (p/v) de seroalbúmina bovina en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc # 269620), se mezclan

55 antígeno [¹²⁵I] 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). A continuación, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A

60 continuación, la solución se retira y la placa se lava ocho veces con Tween-20 al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/agente de centelleo (MicroScint-20; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual al 20 % de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

65 De acuerdo con otro enfoque, la Kd o el valor de Kd se mide mediante ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™ -2000 o un BIAcore™ -3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips de antígeno

CM5 inmovilizados en ~ 10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chios de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se disuelve el antígeno con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/min para alcanzar aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones serie por dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las constantes de asociación (k_{on}) y las constantes de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo simple de unión de Langmuir de uno a uno (software de evaluación de BIAcore versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en el equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Si la constante de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la constante de asociación puede determinarse utilizando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medido en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de detención (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro de la serie 8000 SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

UNA "constante de asociación," "tasa de asociación," "velocidad de asociación," o " k_{on} " también se puede determinar como se ha descrito anteriormente usando un sistema BIAcore™-2000 o BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) en más de un 95 % en peso de anticuerpo, según se determina mediante el método de Lowry y, lo más preferentemente, en más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en el interior de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La palabra "marcador", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con una molécula (tal como un ácido nucleico, polipéptido o anticuerpo) para generar una molécula "marcada". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato, dando como resultado un producto detectable.

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que puede adherirse una molécula (tal como un ácido nucleico, polipéptido o anticuerpo). Los ejemplos de fases sólidas abarcadas en el presente documento incluyen aquellas formadas parcial o totalmente por vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliácridamidas, poliestireno, alcohol de polivinilo y siliconas. En determinadas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas pequeñas, tales como las descritas en la patente de Estados Unidos N.º 4.275.149.

Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un fármaco (tal como un ácido nucleico, un polipéptido, anticuerpo, agonista o antagonista) a un mamífero. Los componentes del liposoma habitualmente están dispuestos en una formación de bicapa, similar a la disposición lipídica de las membranas biológicas.

Una "molécula pequeña" o "molécula orgánica pequeña" se define en el presente documento como una molécula orgánica que tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Dalton.

Un "oligopéptido" que se une a un polipéptido diana es un oligopéptido que es capaz de unirse al polipéptido diana con una afinidad suficiente, de tal forma que el oligopéptido es útil como agente para diagnóstico y/o terapéutico para su direccionamiento al polipéptido. En determinadas realizaciones, el alcance de la unión de un oligopéptido a un polipéptido no diana no relacionado es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del oligopéptido al polipéptido diana, según se ha medido, por ejemplo, mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En determinadas realizaciones, un oligopéptido se une a un polipéptido diana con una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$.

Una "molécula orgánica" que se une a un polipéptido diana es una molécula orgánica distinta de un oligopéptido o

anticuerpo tal como se define en el presente documento, que es capaz de unirse al polipéptido diana con una afinidad suficiente, de tal forma que la molécula orgánica es útil como agente para diagnóstico y/o terapéutico para su direccionamiento al polipéptido. En determinadas realizaciones, el alcance de la unión de una molécula orgánica a un polipéptido no diana no relacionado es menor de aproximadamente el 10 % de la unión de la molécula orgánica al polipéptido diana, según se ha medido, por ejemplo, mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En determinadas realizaciones, una molécula orgánica se une a un polipéptido diana con una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$.

Un "sistema biológico" es un sistema *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* que comprende células de mamífero que comparten una ruta de señalización común.

"Trastorno microbiano" se refiere a una enfermedad o afección en la que un patógeno microbiano causa, media o contribuye de otro modo a la morbilidad de la enfermedad o afección. También se incluyen las enfermedades en las que la estimulación o la intervención de una respuesta antimicrobiana tiene un efecto paliativo sobre la progresión de la enfermedad. Se incluyen dentro de este término enfermedades o afecciones infecciosas, y enfermedades oportunistas resultantes de la infección primaria por un patógeno microbiano. Ejemplos de tales enfermedades infecciosas, incluyen, pero sin limitación, diarrea causada por ECEH y ECEP, enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y, más particularmente, colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC).

La expresión "enfermedad mediada por linfocitos T" significa una enfermedad en la que los linfocitos T intervienen directa o indirectamente o contribuyen de otro modo a una morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por linfocitos T puede estar asociada con efectos mediados por células, efectos mediados por linfocinas, etc., e incluso efectos asociados con los linfocitos B si los linfocitos B son estimulados, por ejemplo, por las linfocinas secretadas por los linfocitos T.

Un "trastorno autoinmune" o "autoinmunidad" se refiere a cualquier afección en la que se genera una respuesta inmunitaria humoral o mediada por células contra el propio tejido del cuerpo. Un "trastorno autoinmune mediado por la IL-23" es cualquier trastorno autoinmune que está causado, mantenido o exacerbado por la actividad de la IL-23.

"Inflamación" se refiere a la acumulación de leucocitos y a la dilatación de los vasos sanguíneos en un lugar de lesión o infección, que normalmente causa dolor, hinchazón y enrojecimiento,

"Inflamación crónica" se refiere a la inflamación en la que la causa de la inflamación persiste y es difícil o imposible de eliminar.

"Inflamación autoinmune" se refiere a la inflamación asociada con un trastorno autoinmune.

"Inflamación artrítica" se refiere a la inflamación asociada con la artritis.

"Enfermedad inflamatoria intestinal" o "EII" se refiere a un trastorno crónico caracterizado por la inflamación del tracto gastrointestinal. La EII abarca la colitis ulcerosa, que afecta al intestino grueso y/o el recto, y la enfermedad de Crohn, que puede afectar a todo el sistema gastrointestinal, pero afecta con mayor frecuencia al intestino delgado (íleon) y, posiblemente, al intestino grueso.

La expresión "cantidad eficaz" es una concentración o cantidad de una molécula (por ejemplo, un ácido nucleico, un polipéptido, agonista o antagonista), que da como resultado el logro de una finalidad específica determinada. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una concentración o cantidad de molécula que es eficaz para lograr un efecto terapéutico establecido. Esta cantidad también puede determinarse empíricamente.

La expresión "agente citotóxico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. Con el término se pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula que sobreexpresa cualquiera de un gen, ya sea *in vitro* o *in vivo*. De este modo, un agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan tales genes en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes de la fase M clásicos incluyen los agentes de la vinca (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores de la topo II, tales como doxorrubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen la G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and

antineoplastic drugs" de Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la página 13.

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra población celular como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas del crecimiento, tal como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana con N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas, tales como la hormona estimulante del foliculo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factores α y β de necrosis tumoral; linfotóxina α y β , sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento neural, tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF), tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón- α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-6, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando de kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "células inflamatorias" designa células que potencian la respuesta inflamatoria, tales como células mononucleares, eosinófilos, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares (PMN).

II. Composiciones y procedimientos

A. Polipéptidos antimicrobianos (PAM) y moduladores de los mismos

Los polipéptidos antimicrobianos (PAM) son polipéptidos que median, o de otro modo provocan, una respuesta inmunitaria antimicrobiana a un patógeno microbiano. Los PAM incluyen, pero sin limitación, LT, IL-6, IL-22, IL-23 (incluidos, por ejemplo, IL-23 p19 o IL-23 p40) y proteínas relacionadas con Reg o Reg codificadas por los genes de la super familia Reg. La super familia Reg incluye genes relacionados con Reg y Reg de ser humano, rata y ratón y se agrupan en cuatro subclases, los tipos I, II, III y IV. Por ejemplo, el tipo I incluye *REG 1 α* humana, *REG 1 β* humana, *RegI* de rata y *RegI* de ratón; el tipo II incluye *RegII* de ratón, el tipo III incluye *REG III* humana, *HIP/PAP* de ser humano (gene expresado en carcinoma hepatocelular-intestino-páncreas/gen que codifica la proteína asociada con la pancreatitis), *PAP/Péptido 23 de rata*, *RegIII/PAPII de rata*, *PAP III de rata*, *RegIII α de ratón*, *RegIII β* , *RegIII γ* , *RegIII δ de ratón* e *INGAP* de hámster (proteína asociada a la neogénesis de los islotes). El tipo IV contiene *REG IV* humana. Adicionalmente, la secuencia relacionada con Reg humano (RS) es, según se ha indicado, un pseudogén. En un ejemplo, la proteína REG está codificada por un miembro de la familia de genes REG humanos, que incluye, aunque sin limitación, *REG 1 α* , *REG 1 β* , *HIP/PAP*, *REG III*, *REG IV* y la secuencia relacionada con Reg (RS).

En algunos aspectos, la secuencia de aminoácidos de un PAM comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del siguiente grupo: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 56.

En otros aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica un PAM comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo siguiente: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 55.

Una actividad de un PAM se puede aumentar o disminuir y/o se puede regular de forma diferencial en relación con la actividad de otro PAM o del mismo PAM. Los ejemplos de una actividad de un PAM incluyen, aunque sin limitación, expresión de PAM, transducción de señales, unión a un compañero de unión, respuesta antimicrobiana u otra actividad biológica o inmunológica del mismo.

Un aumento en la actividad de uno o más PAM da como resultado una respuesta inmunitaria antimicrobiana potenciada o inducida en un sujeto.

Los PAM incluyen, pero sin limitación, polipéptidos que interaccionan directa o indirectamente con la IL-22, por ejemplo, polipéptidos que están corriente arriba o corriente abajo de una ruta de transducción de señales de la IL-22

que media la resistencia del huésped a la infección por un patógeno microbiano (por ejemplo, bacteria o virus). Ejemplos de tales PAM incluyen, pero sin limitación, LT, IL-6, IL-18 e IL-23 (incluyendo, por ejemplo, IL-23 p19 o IL-23 p40).

5 Los moduladores incluyen, pero sin limitación, polipéptidos y moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADN o molécula de ARN) que modulan directa o indirectamente una actividad de un PAM. Ejemplos de tal modulación incluyen, pero sin limitación, un aumento, reducción, inducción o activación, inhibición o regulación (por ejemplo, regulación por aumento o por disminución) de una actividad de un PAM.

10 En una realización particular, el modulador modula indirectamente la actividad de la IL-22 disminuyendo o inhibiendo la actividad de la proteína de unión a IL-22 (BP) y, por lo tanto, aumentando la actividad de la IL-22. En una realización adicional, el modulador disminuye o inhibe la unión de BP de IL-22 a la IL-22 y, por lo tanto, aumenta la actividad de la IL-22.

15 El modulador puede ser un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido que se une o interacciona de otro modo con un PAM para aumentar, inducir o regular una actividad de un PAM. En un enfoque, el modulador es un polipéptido de fusión que modula una actividad de un PAM.

20 En un enfoque, el modulador es un anticuerpo que se une a un PAM. En un enfoque particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otro enfoque, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, or (Fab')₂. En otro enfoque, el anticuerpo es un polipéptido de fusión (por ejemplo, un polipéptido de fusión Fc). En otro enfoque, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En un enfoque particular, el anticuerpo está humanizado. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otro enfoque, el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado de un ser humano, primate humano, no humano u otro mamífero (por ejemplo, cerdo, oveja, conejo, marmota, rata o ratón).

En un enfoque particular, el modulador es una molécula de PAM recombinante o de ácido nucleico que codifica un PAM (por ejemplo, una molécula de ADN o ARN).

30 En otro enfoque en particular, el modulador es un PAM recombinante o molécula de ácido nucleico que codifica un PAM (por ejemplo, una molécula de ADN o ARN) que se puede expresar en una célula.

Los PAM abarcan PAM nativos de longitud completa o maduros, así como variantes de los mismos. Las variantes de PAM pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN que codifica un PAM y/o mediante la síntesis del polipéptido antimicrobiano deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar el procesamiento postraducciona de un polipéptido, tal como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación o alterar las características de anclaje a la membrana.

40 Las variaciones en los PAM nativos o en varios dominios del PAM, como se describe en el presente documento, se pueden realizar, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y pautas para mutaciones conservadoras y no conservadoras establecidas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, eliminación o inserción de uno o más codones que codifican el PAM, que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos del PAM en comparación con un PAM de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación se realiza mediante la sustitución de al menos un aminoácido por otro aminoácido en uno o más de los dominios del PAM. Guías para determinar qué residuo de aminoácidos se puede insertar, sustituir o delecionar sin afectar de forma adversa a la actividad deseada se pueden encontrar comparando la secuencia del PAM con la de las moléculas proteicas homólogas conocidas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de homología alta. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos. Opcionalmente, las inserciones o las delecciones pueden estar en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo, sistemáticamente, inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y analizando las variantes resultantes para la actividad exhibida por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

55 En realizaciones particulares, las sustituciones conservadoras de interés se muestran en la Tabla 3, bajo el encabezado de sustituciones preferentes. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, se introducen cambios más sustanciales, denominados sustituciones de ejemplo en la Tabla 6, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y se seleccionan los productos.

60

Tabla 3

Resto original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferentes
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys

Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se logran modificaciones sustanciales en la función y la identidad inmuno­lógica del polipéptido PAM seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen sobre la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservadores o, más preferentemente, en los sitios restantes (no conservados).

Las variaciones se pueden realizar usando métodos conocidos en la materia, tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), exploración con alanina y mutagénesis por PCR. Se puede realizar mutagénesis dirigida al sitio [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagénesis por casete [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], rmutagénesis de selección de restricción [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas con ADN clonado para producir un ADN que codifica una variante de PMA.

Los fragmentos de un PAM u otros polipéptidos también se proporcionan en el presente documento. Tales fragmentos pueden truncarse en el extremo N o el extremo C, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada de un PAM o polipéptido. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, un fragmento de un PAM u otro polipéptido es biológicamente activo. En determinadas realizaciones, un fragmento de PAM de longitud completa carece de la secuencia del péptido señal N-terminal. En determinadas realizaciones, un fragmento de PAM de longitud completa es una forma soluble de un PAM unido a membrana. Por ejemplo, una forma soluble de PAM puede carecer de la totalidad o una parte sustancial del dominio transmembrana.

Las modificaciones covalentes de los PAM u otros polipéptidos están incluidas dentro del alcance de la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos diana de un polipéptido con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N o C terminales del polipéptido. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular el polipéptido a una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su uso en el método para purificar anticuerpos para el polipéptido, y viceversa. Los agentes de reticulación de uso habitual incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres de ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo, tales como 3,3'-

ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de los restos de glutaminilo y asparaginilo a los restos correspondientes de glutamilo y aspartilo, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de los grupos hidroxilo de los restos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)], acetilación de la amina del extremo N, y amidación de los grupos carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente de un polipéptido comprende alterar el patrón de glicosilación nativo del polipéptido. "Alterar el patrón de glicosilación nativo" pretende significar para los fines del presente documento la delección de uno o más restos de carbohidrato encontrados en la secuencia nativa de un polipéptido (bien eliminando el sitio de glucosilación subyacente o bien eliminando la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa del polipéptido. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que implican un cambio en la naturaleza y las proporciones de los diversos restos de carbohidratos presentes.

Un polipéptido también se puede modificar de una manera para formar moléculas quiméricas que comprenden el polipéptido fusionado con otro, polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. En una realización, una molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido con un polipéptido marcador que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-marcador. El marcador de epítipo generalmente se coloca en el extremo amino o carboxilo del polipéptido. La presencia de tales formas marcadas con epítipo del polipéptido se puede detectar usando un anticuerpo contra el polipéptido marcado. Además, la provisión del marcador de epítipo permite que el PAM se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-marcador u otro tipo de matriz de afinidad que se une a el marcador de epítipo. Diversos polipéptidos marcadores y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en la materia. Entre los ejemplos se incluyen marcadores de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido marcador HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; el marcador c-myc tag y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; y la glicoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo [Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3 (6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos marcadores incluyen el péptido Flag [Hopp et al., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)]; un péptido de epítipo de alfa-tubulina [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; y el marcador peptídico de la proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

En otra realización, una molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen, preferentemente, la sustitución de una forma soluble de un polipéptido (por ejemplo, un PAM o modulador polipeptídico del mismo) en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas ver también la patente de Estados Unidos n.º 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

1. Preparación de polipéptidos

Los polipéptidos para su uso en la presente invención se pueden preparar mediante métodos recombinantes de rutina, por ejemplo, cultivar células transformadas o transfectadas con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica un PAM o un modulador de polipéptido del mismo. Se proporcionan las células huésped que comprenden cualquiera de estos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, *E. coli* o levaduras. Se proporciona además un procedimiento para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

Se pueden emplear procedimientos alternativos, que son bien conocidos en la materia, para preparar un polipéptido. Por ejemplo, una secuencia que codifica un polipéptido o una porción del mismo se puede producir mediante síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) usiendo las instrucciones del fabricante. Varias porciones de un polipéptido o una porción del mismo pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido de longitud completa o una porción del mismo.

Los polipéptidos expresados de forma recombinante pueden recuperarse del medio de cultivo o de lisados de células huésped. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante

fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación en etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación en sulfato amónico; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A Sepharose para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas de metalización para unir formas de un polipéptido marcadas con epítipo. Se pueden emplear varios procedimientos de purificación proteica y tales procedimientos se conocen y se describen en la materia en, por ejemplo, Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción utilizado y del polipéptido particular producido. Los polipéptidos LT pueden purificarse expresando un polipéptido LT marcado, tal como, por ejemplo, un polipéptido marcado con LT α (SEQ ID NO:61).

2. Detección de la expresión génica

La expresión de un gen que codifica un polipéptido se puede detectar mediante diversos procedimientos en la materia, por ejemplo, detectando la expresión del ARNm que codifica el polipéptido. Tal como se usa en el presente documento, el término "detección" abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Al detectar la expresión génica de un polipéptido, se pueden identificar, por ejemplo, los tejidos que expresan este gen. La expresión génica se puede medir usando determinados métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, transferencia Northern, (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 [1980]); PCR cuantitativa; o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Como alternativa, la expresión génica puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de muestra abarcan cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. De manera conveniente, los anticuerpos se pueden preparar contra una secuencia nativa que codifica, por ejemplo, un PAM contra un péptido sintético que comprende un fragmento de la secuencia de PAM; o contra una secuencia exógena fusionada al polipéptido PAM o fragmento del mismo (que incluye un péptido sintético).

B. Anticuerpos

Se describen anticuerpos que se unen a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o más adelante. En una realización, un anticuerpo aislado que se une a un PAM y de ese modo modula la actividad de PAM, por ejemplo, aumentando una actividad del PAM. Los ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, humanos, biespecíficos y heteroconjugados. Un anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En una realización, se emplea un anticuerpo aislado que se une a una IL-22.

Los anticuerpos monoclonales de ejemplo que se unen a un PAM se describen en el presente documento. Estos anticuerpos incluyen los anticuerpos anti-IL-22 designados 3F11.3 ("3F11"), 11H4.4 ("11H4"), y 8E11.9 ("8E11"), y los anticuerpos anti-IL-22R designados como 7E9.10.8 ("7E9"), 8A12.32 (8A12), 8H11.32.28 ("8H11") y 12H5, también anticuerpos monoclonales que compiten con h 3F11.3, 11H4.4, o 8E11.9 por la unión a IL-22, anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítipo que 3F11.3, 11H4.4 o 8E11.9, anticuerpos monoclonales que compiten con 7E9, 8A12, 8H11, o 12H5 por la unión a IL-22R y anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítipo que 7E9, 8A12, 8H11 o 12H5. a continuación se proporcionan diversas realizaciones de anticuerpos:

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden generar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. De manera típica, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido de interés o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, entre otros, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que se pueden emplear incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintética). Un experto en la materia puede seleccionar el protocolo de inmunización sin excesiva experimentación.

2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos pueden, como alternativa, ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, se inmuniza normalmente con un agente inmunizante para producir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá, normalmente, el polipéptido de interés o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, si se desean células de origen humano se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") o si se desean fuentes de mamíferos no humanos se usan células esplénicas o células de ganglios linfáticos. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular immortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pág. 59-103]. Las líneas celulares immortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Normalmente, se emplean líneas de células de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contenga, preferentemente, una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de células immortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares immortalizadas preferentes son aquellas que se fusionan de forma eficaz, mantienen estable el nivel de expresión elevado del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares immortalizadas son las líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pág. 51-63].

El medio de cultivo en que se cultivan las células de hibridoma se puede analizar para la detección de la presencia de anticuerpos monoclonales que se unen al polipéptido de interés. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En la materia se conocen dichas técnicas. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante un análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución límite y cultivarse por procedimientos convencionales [Goding, anteriormente citado]. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido ascítico, mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando bibliotecas combinatorias para detectar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen diversos procedimientos en la materia para generar bibliotecas de presentación en fagos y seleccionar dichas bibliotecas para detectar anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Tales procedimientos se describen generalmente en Hoogenboom et al. (2001) en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ), y en ciertas realizaciones, en Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093.

En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante el cribado de bibliotecas de fagos que contienen fagos que expresan diversos fragmentos de la región variable del anticuerpo (Fv) fusionada a la proteína de la cubierta del fago. Dichas bibliotecas de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y, por lo tanto, se separan de los clones que no se unen en la biblioteca. A continuación, los clones de unión se eluyen del antígeno y se pueden enriquecer adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Se puede obtener cualquiera de los anticuerpos diseñando un procedimiento de cribado de antígeno adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa usando las secuencias Fv del clon del fago de interés y la región constante adecuada (Fc) descritas en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Publicación del NIH 91-3242, Bethesda MD(1991), vols. 1-3.

Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como las descritas en la patente de Estados Unidos N.º 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los

dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en el lugar de las secuencias murinas homólogas [patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison et al., citado anteriormente] o mediante la unión covalente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no inmunoglobulina. Dicho polipéptido no de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

3. Anticuerpos monovalentes

También se proporcionan anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar el entrecruzamiento de la cadena pesada. Como alternativa, los restos relevantes de cisteína se sustituyen con otro resto de aminoácido o se delecionan para evitar el entrecruzamiento.

Los procedimientos también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, se puede lograr usando técnicas rutinarias conocidas en la materia.

4. Fragmentos de anticuerpo

También se proporcionan fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden generar por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias, existen ventajas derivadas del uso de fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos. Para una revisión de algunos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse y secretarse en E. coli, lo que permite la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos citadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse directamente fragmentos F(ab')₂ de cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con una semivida *in vivo* incrementada que comprenden restos de epítomos de unión a receptor de rescate se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia. En determinadas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena simple (scFv). Véase el documento WO 93/16185; las patentes de Estados Unidos N.º 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por tanto, pueden ser adecuados para la unión inespecífica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un scFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, anteriormente citado. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos humanizados

También se proporcionan anticuerpos humanizados. En la materia se conocen diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en la que donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y, posiblemente algunos restos de la FR, están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligero como pesado, que se usan para fabricar los anticuerpos humanizados puede ser muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se examina respecto

toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humano conocidas. Por tanto, la secuencia humana más parecida a la del ratón se acepta como la estructura humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otro procedimiento usa una estructura concreta derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligera o pesada. La misma estructura se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et. al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89/4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623.

Además, generalmente es deseable que los anticuerpos se humanicen con la retención de una afinidad elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, de acuerdo con un procedimiento, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles habitualmente y son familiares para aquellos expertos en la materia. Se dispone de programas de ordenador que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales en tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias consenso importadas para conseguir la característica deseada en el anticuerpo, tal como la afinidad aumentada para el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente, y más sustancialmente, implicados en la influencia de la unión a antígeno.

6. Anticuerpos humanos

También se proporcionan anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos pueden construirse combinando secuencia o secuencias de dominio variable del clon de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fagos derivadas de ser humano con secuencia o secuencias de dominio constante humano conocidas, tal como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos también se han descrito, por ejemplo, en Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica de la región de unión (JH) de cadena pesada de anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal tendrá como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993).

La mezcla de genes también se puede usar para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo de roedor, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se denomina "impresión de epítipo", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación en fagos como se describe en el presente documento se reemplaza por un repertorio de genes de dominio V humano, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana o no humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión al antígeno destruido al eliminar la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, es decir, el epítipo dirige (impresiona) la elección del socio de la cadena humana. Cuando se repite el proceso para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de FR o CDR de origen no humano.

7. Anticuerpos biespecíficos

También se proporcionan anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es para un polipéptido de interés y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de un polipéptido de interés. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un polipéptido de interés, tal como un polipéptido de superficie celular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TAT226 y un brazo que se une a un agente citotóxico, tales como, por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloides de la vinca,

la cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos de $F(ab')_2$).

5 Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la expresión simultánea de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milsteiny Cuello, *Nature*, 305:537 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las
10 cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es demasiado complicada y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares están descritos en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

15 De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En determinadas realizaciones, la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera está
20 presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan simultáneamente en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos
25 óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son de significancia particular.

En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están ompuestos por una cadena pesada de la
30 inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este
35 enfoque se divulga en el documento WO/94/04690. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos, véanse, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz comprende al
40 menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera moléculas de anticuerpo son sustituidas por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un
45 mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos "heteroconjugados" o reticulados. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han
50 propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas (patente de Estados Unidos n.º. 4,676,980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la materia y se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º. 4,676,980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

55 Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Brennan et al, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los
60 derivados de Fab' -TNB se reconvierte a continuación en Fab' -tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

65 El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, que puede estar

químicamente acoplado para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' fue secretado por separado de E. coli y sometido a acoplamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y las linfocitos T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumores de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los anticuerpos homodiméricos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

8. Anticuerpos multivalentes

También se proporcionan anticuerpos multivalentes. Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En determinadas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminal a la región Fc. En determinadas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho sitios de unión a antígeno. En una de tales realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en el que la o las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la o las cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en el que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: cadena VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender además al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

9. Anticuerpos de dominio único

También se proporcionan anticuerpos de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena polipeptídica única que comprende la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.248.516 B1). En una realización, un anticuerpo de dominio único consiste en la totalidad o una parte del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

10. Variantes de anticuerpos

En algunas realizaciones, se contemplan la modificación o modificaciones de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden prepararse introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos en las

secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede emplearse cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para obtener la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se realiza la secuencia.

5 Un procedimiento útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este caso, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyeron por un aminoácido neutro o
10 cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) que influye sobre la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. De este modo, aunque se predetermine el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita determinarse. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación
15 en un sitio dado, se llevó a cabo el barrido de ala o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se seleccionaron para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo-terminales que varían en cuanto a su longitud desde un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones
20 intrasecuencia de uno solo o múltiples restos de aminoácido. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

25 En determinadas realizaciones, un anticuerpo se altera para aumentar o disminuir el grado en que el anticuerpo está glicosilado. Normalmente, la glicosilación de polipéptidos está unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión de un resto hidrocarburo a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la
30 presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glucosilación unida al átomo de O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

35 La adición o delección de sitios de glicosilación al anticuerpo se lleva a cabo convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se crean o eliminan una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración puede realizarse también mediante la adición, delección o sustitución de uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

40 Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a esta. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina
45 bisecante (GlcNAc) en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. y la patente de Estados Unidos n.º 6.602.684, Umana et al. Los anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se notifican en el documento WO 1997/30087, Patel et al. Véase, también, el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.) con respecto a anticuerpos con carbohidratos alterados unidos a la región Fc de los mismos.
50 Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana et al.) sobre moléculas de unión a antígeno con glucosilación modificada.

En determinadas realizaciones, una variante de glicosilación comprende una región Fc, en la que una estructura de hidrato de carbono unida a la región Fc carecen de fucosa. Tales variantes tienen una función de CCDA mejorada.
55 Opcionalmente, la región Fc comprende adicionalmente una o más sustituciones de aminoácidos en la misma que mejoran adicionalmente la CCDA, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de restos). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "defucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/01 10282; US 2004/0109865;
60 WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; el documento WO2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 con fucosilación deficiente de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0157108 A1, Presta, L.; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11) y
65 líneas celulares defectivas, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO defectivas (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)).

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto aminoácido en la molécula del anticuerpo sustituido por un resto diferente. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero se contemplan también alteraciones de la región FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 3 anterior bajo el encabezado de "sustituciones preferentes".

5 Si tales sustituciones dan como resultado un cambio deseable en la actividad biológica, se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo" en la Tabla 3, o como se ha descrito adicionalmente anteriormente en referencia a las clases de aminoácidos y seleccionar según las propiedades de unión deseadas.

10 Un tipo particular de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) con respecto al anticuerpo precursor a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad utilizando una biblioteca de expresión en fagos. En
15 resumen, varios sitios en la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) están mutados para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de este modo se muestran a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones a al menos parte de una proteína de la cubierta del fago (por ejemplo, el producto del gen III de M13) empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes expresadas en fagos se seleccionan a continuación para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). A fin de identificar los
20 sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede llevar a cabo mutagénesis de barrido (por ejemplo, barrido de alanina) para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas conocidas en la
25 materia, incluyendo las elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado usando técnicas conocidas en la materia, incluyendo las descritas en el presente documento, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

30 Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante diversos procedimientos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis mediante PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada inicialmente o una versión no variante del
35 anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los anticuerpos, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una
40 modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos, incluyendo la de una cisteína en la bisagra.

De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que, en algunas realizaciones, un anticuerpo puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo de homólogo de tipo
45 silvestre, por ejemplo, en la región Fc. Sin embargo, estos anticuerpos conservarían sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar ciertas alteraciones en la región Fc que resultarían en una unión a C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter Nature 322:738-40 (1988); la patente de
50 Estados Unidos n.º 5.648.260; la patente de Estados Unidos n.º 5.624.821; y el documento WO94/29351 concerniente a otros ejemplos de variantes de la región Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con unión a FcR mejorada o disminuida. Véase, también, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et
55 al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Las variantes polipeptídicas con alteración en las secuencias de aminoácidos de la región Fc y mayor o menor capacidad de unión a C1q se describen en la patente de Estados Unidos n.º 6.194.551 B1, el documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184
60 (2000).

En una realización, la invención emplea anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfaz de los polipéptidos Fc que comprenden la región Fc, en la que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido
65 de Fe y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, en la que la protuberancia se puede colocar en la cavidad para promover la formación de complejos del primer y segundo polipéptidos de Fc. Los procedimientos para generar

anticuerpos con estas modificaciones son conocidos en la materia, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.731.168.

11. Derivados de anticuerpos

Los anticuerpos pueden modificarse adicionalmente para que contengan restos no proteináceos adicionales que son conocidos en la materia y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli (n-vinilpirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se unen más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteináceo que pueden calentarse selectivamente por exposición a la radiación. En una realización, el resto no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, aunque sin limitación, longitudes de onda que no dañan las células ordinarias, pero que calientan el resto no proteináceo a una temperatura a la que las células proximales al resto anticuerpo-no proteináceo mueren.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo puede marcarse y/o puede inmovilizarse sobre un soporte sólido.

12. Anticuerpos heteroconjugados

También se proporcionan anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirijan las células del sistema inmune a células no deseadas (patente de Estados Unidos n.º. 4,676,980], y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 4.676.980.

13. Ingeniería de funciones efectoras

Puede ser deseable modificar un anticuerpo con respecto a la función efectora, para aumentar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de un trastorno microbiano. Por ejemplo, pueden introducirse restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con una actividad antiantimicrobiana mejorada usando reticuladores heterobifuncionales. Como alternativa, se puede modificar por ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y, por lo tanto, puede tener actividad potenciada.

14. Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo, en un enfoque, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para una clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y se secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula huésped que se utilizará. Generalmente, las células huésped son de origen procariota o eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que tales regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

a) Generación de anticuerpos usando células huésped procariotas:

(1) Construcción de vectores

Las secuencias polinucleotídicas que codifican los componentes polipeptídicos de un anticuerpo se pueden obtener

usando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar a partir de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Como alternativa, los polinucleótidos pueden sintetizarse usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicarse y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procariotas. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la materia se pueden usar para el propósito de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se insertarán en el vector y de la célula huésped particular que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene varios componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión al ribosoma (RBS), una secuencia de señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, pueden usarse vectores plasmídicos que contienen replicón y secuencias de control que derivan de especies compatibles con la célula huésped en conexión con estos huéspedes. El vector normalmente lleva un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, por lo tanto, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que puede usar el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen con detalle en Carter et al., la Patente de los Estados Unidos n.º 5.648.237.

Además, los vectores de fagos que contienen replicón y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo huésped pueden usarse como vectores de transformación en conexión con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago, tal como λ GEMTM-11, para hacer un vector recombinante que se puede usar para transformar células huésped susceptibles tales como *E. coli* LE392.

Un vector de expresión puede comprender dos o más pares promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida situada corriente arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas normalmente se dividen en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de la transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Se conoce bien un gran número de promotores, reconocidos por diversas células huésped potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente al ADN de cistrón que codifica la cadena ligera o pesada mediante la eliminación del promotor del ADN fuente a través de la digestión con enzimas de restricción y la inserción de la secuencia promotora aislada en el vector. Tanto la secuencia del promotor nativo como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se usan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

Los promotores adecuados para usar con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o fagos conocidos) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, lo que permite a un trabajador experto operativamente ligarlas a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Sicbenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269) utilizando enlazadores o adaptadores para suministrar los sitios de restricción requeridos.

En un enfoque, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de la secuencia de señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el propósito de esta invención debe ser una que sea reconocida y procesada (es decir escindida por una señal peptidasa) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, penicilinasa, *lpp* o líderes estables de enterotoxina II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En un enfoque, las secuencias señal utilizadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal de STII o variantes de las mismas.

En otro enfoque, la producción de las inmunoglobulinas puede producirse en el citoplasma de la célula huésped y, por lo tanto, no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. En ese sentido, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina se expresan, se pliegan y ensamblan para formar inmunoglobulinas

funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas huésped (por ejemplo, las cepas de *E. coli* trxB) proporcionan condiciones en el citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, de este modo, permitiendo de ese modo el plegamiento y ensamblaje adecuados de las subunidades proteicas expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Los anticuerpos también se pueden producir usando un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de los componentes polipeptídicos expresados puede modularse para maximizar el rendimiento de los anticuerpos secretados y ensamblados adecuadamente. Dicha modulación se logra al menos en parte modulando simultáneamente las resistencias de traducción para los componentes del polipéptido.

Una técnica para modular la fuerza de la traducción se describe en Simmons et al., la patente de los Estados Unidos n.º 5.840.523. Utiliza variantes de la región de iniciación de la traducción (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, se pueden crear una serie de variantes de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos con un rango de intensidades de traducción, proporcionando de este modo un medio conveniente por el cual ajustar este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de TIR se pueden generar mediante técnicas de mutagénesis convencionales que dan como resultado cambios en los codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos. En determinadas realizaciones, los cambios en la secuencia de nucleótidos son silenciosos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o separación de las secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia de la señal. Un procedimiento para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" al comienzo de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto se puede lograr cambiando la tercera posición de nucleótido de cada codón; además, algunos aminoácidos, como leucina, serina y arginina, tienen varias posiciones primera y segunda que pueden agregar complejidad al hacer el banco. Este procedimiento de mutagénesis se describe con detalle en Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:15 1-158.

En una realización, se genera un conjunto de vectores con un intervalo de fuerzas de TIR para cada cistrón en la misma. Este conjunto limitado proporciona una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo diversas combinaciones de resistencia TIR. Estas concentraciones se pueden determinar cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe con detalle en Simmons et al. patente de Estados Unidos n.º 5.840.523. Basándose en la comparación de la fuerza de traducción, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinarse en las construcciones del vector de expresión.

Las células huésped procariotas adecuadas para expresar anticuerpos incluyen Archacbacteria y Eubacteria, tales como organismos gramnegativos o grampositivos. Ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacteria, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una realización, se usan células gramnegativas. En una realización, las células de *E. coli* se usan como huéspedes. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; depósito en la ATCC n.º 27,325) y derivados de los mismos, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ fhua (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (patente de Estados Unidos n.º 5.639.635). También son adecuadas otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes. Los procedimientos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos se conocen en la materia y se describen en, por ejemplo, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, *E. coli*, *Serratia* o especies de *Salmonella* se pueden usar adecuadamente como huéspedes cuando se usan plásmidos bien conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Normalmente, la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y se pueden incorporar, deseablemente, inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

(2) Producción de anticuerpos

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios con nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, se seleccionan los transformantes o amplifican los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en el huésped procariótico para que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o por un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio generalmente se usa para células bacterianas que contienen barreras sustanciales de pared celular. Otro procedimiento para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Sin embargo, otra técnica utilizada es la electroporación.

Las células procariotas utilizadas para producir los polipéptidos se cultivan en medios conocidos en la materia y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de luria (LB) más suplementos nutricionales necesarios. En algunas realizaciones, los medios también contienen un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se agrega ampicilina a los medios para el crecimiento de células que expresan un gen resistente a ampicilina.

Cualquier complemento necesario además de carbono, nitrógeno y fuentes de fosfato inorgánico también puede incluirse en concentraciones apropiadas, introducidos solos o como una mezcla con otro suplemento o medio tal como una fuente de nitrógeno complejo. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioneitol y ditioneitol.

Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. En determinadas realizaciones, para el crecimiento de *E. coli*, las temperaturas de crecimiento varían de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C; de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37 °C; o aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. En determinadas realizaciones, para *E. coli*, el pH es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, o aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en la expresión del vector de expresión, se induce la expresión en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un enfoque, los promotores PhoA se usan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. En determinadas realizaciones, el medio limitante de fosfato es medio C.R.A. P (véase, por ejemplo, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Se pueden usar diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como es conocido en la materia.

En un enfoque, los polipéptidos expresados se secretan y recuperan del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas normalmente implica la alteración del microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se rompen, los restos celulares o las células enteras pueden eliminarse mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse a los medios de cultivo y aislarse en ellas. Las células se pueden eliminar del cultivo y el sobrenadante del cultivo se puede filtrar y concentrar para la purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente usando procedimientos comúnmente conocidos, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western.

En un enfoque, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Varios procedimientos de fermentación por lotes alimentados a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1.000 litros de capacidad y, en ciertas realizaciones, de aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores agitadores para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferente de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más que aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica y puede variar desde aproximadamente 1 litro hasta aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas normalmente se inicia después de que las células se hayan cultivado en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo por ejemplo, una DO_{550} de aproximadamente 180-220, en cuyo estadio las células están en la fase estacionaria temprana. Se pueden usar diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la materia y se ha descrito anteriormente. Las células pueden crecer durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células generalmente se inducen durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede usar un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos, se pueden modificar diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento adecuados de los polipéptidos de anticuerpos secretados, vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DDsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis, trans-isomerasa con actividad de chaperona) se pueden usar para co-transformar las células procariotas huésped. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad adecuados de las proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:19601-19605; Georgiou et al., la patente de Estados Unidos n.º 6.083.715; Georgiou et al., la patente de Estados Unidos n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000). *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son

proteolíticamente sensibles), se pueden usar ciertas cepas huésped deficientes para enzimas proteolíticas. Por ejemplo, las cepas de células huésped pueden modificarse para efectuar mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas de *E. coli* deficientes en proteasa están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), *citado anteriormente*; Georgiou et al., la patente de Estados Unidos n.º 5.264.365; Georgiou et al., la patente de Estados Unidos n.º 5.508.192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En un enfoque, las cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas se usan como células huésped en el sistema de expresión.

(3) Purificación de anticuerpos

En un enfoque, un anticuerpo producido en el presente documento se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Se pueden emplear procedimientos estándar de purificación de proteínas conocidos en la materia. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en inmunoafinidad o columnas de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatografía, SDS-PAGE, filtración en gel usando y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un enfoque, la proteína A inmovilizada en una fase sólida se usa para la purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpo. La proteína A es una proteína de pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. La fase sólida a la que se inmoviliza la proteína A puede ser una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, o una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna está recubierta con reactivos, tal como glicerol, para evitar posiblemente la adherencia inespecífica de contaminantes.

Como primera etapa de la purificación, se puede aplicar una preparación derivada del cultivo celular como se ha descrito anteriormente sobre una fase sólida inmovilizada de proteína A para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. La fase sólida se lavó después para eliminar contaminantes no específicamente ligados a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

b) Generación de anticuerpos usando células huésped eucariotas:

Un vector para su uso en una célula huésped eucariota generalmente incluye uno o más de los siguientes componentes no limitantes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(1) Componente de secuencias de señal

Un vector para su uso en una célula huésped eucariótica también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada puede ser una que se reconoce y procesa (es decir, escindida por una señal peptidasa) por la célula huésped. En la expresión en células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora se liga en marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(2) Origen de la replicación

Generalmente, no se necesita un componente de origen de replicación para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse normalmente solo porque contiene el promotor temprano.

(3) Componente del gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sea relevante, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Esas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a los fármacos y, por lo tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicho uso de selección dominante usan los medicamentos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para absorber el ácido nucleico del anticuerpo, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de la metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En algunas realizaciones, se usa una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ACC CRL-9096).

Como alternativa, se pueden seleccionar células huésped (particularmente huésped de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la Patente de Estados Unidos n.º 4.965.199.

(4) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación usualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente unido a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo). Las secuencias promotoras son conocidas por eucariotas. Por ejemplo, casi todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. En determinadas realizaciones, cualquiera o todas estas secuencias pueden insertarse adecuadamente en vectores de expresión eucarióticos.

La transcripción a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, con la condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación del virus SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos que usan el virus del papiloma bovino como vector se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.601.978. Véase también Reyes et al., Nature 297: 598 - 601 (1982)), que describe la expresión de ADN de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, se puede utilizar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous usado como promotor.

(5) Componente del elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica un anticuerpo por eucariotas superiores a menudo se incrementa al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). De manera típica, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariótica. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del polio en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982)) que describe elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede sufrir corte y empalme en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el polipéptido del anticuerpo, pero generalmente se localiza en un sitio 5' del promotor.

(6) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en las células huésped eucariotas también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', no traducidas de ADN o ADN eucariota o viral. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión

descrito en el presente documento.

(7) Selección y transformación de células huésped

- 5 Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente invención incluyen células de eucariotas superiores descritas en el presente documento, que incluyen células huésped de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Otros ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC, CCL10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO), Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC, CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MCR 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).
- 10
- 15
- 20 Las células huésped se transforman con la expresión o los vectores de clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, se seleccionan los transformantes o amplifican los genes que codifican las secuencias deseadas.

25 *(8) Cultivo de las células huésped*

- Las células huésped utilizadas para producir un anticuerpo pueden cultivarse en diversos medios. Los medios comercialmente disponibles tales como de Ham F10 (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma). RPMI-1640 (Sigma), medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped.
- 30 Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), las patentes de Estados Unidos N.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; o patente de Estados Unidos 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede completarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir otros suplementos a concentraciones apropiadas que conocerían los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.
- 35
- 40

(9) Purificación de anticuerpos

- 45 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisadas, pueden eliminarse, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se pueden concentrar primero usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.
- 50

- La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una técnica conveniente. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos basados en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark et al., J. Immunol. Methods 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que está unido el ligando de afinidad puede ser agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tal como el vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de
- 55
- 60
- 65

amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a purificación adicional, por ejemplo, mediante cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente realizado a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, ensayo y uso clínico están bien establecidas en la materia, de acuerdo con las metodologías descritas anteriormente y/o según lo considere apropiado un experto en la materia para un anticuerpo particular de interés.

C. Agonistas y antagonistas

Un polipéptido que comprende IL-22 o un agonista de IL-22 que aumenta la actividad de IL-22 puede emplearse en la presente invención como se reivindica. La referencia a un agonista de un PAM debe interpretarse en consecuencia.

En una realización, un agonista de un PAM es un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo frente IL-22 o un anticuerpo anti-IL-22R. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-IL-22 es un anticuerpo agonista que promueve la interacción de IL-22 con IL-22R. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-IL-22R se une al dominio de unión al ligando extracelular de un IL-22R. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22R se une al dominio de unión al ligando extracelular de un IL-22R, que se encuentra en la SEQ ID NO:3 de aproximadamente 18-228 aminoácidos.

En una realización particular, un agonista de IL-22 es un anticuerpo que se une a IL-22BP y bloquea o inhibe la unión de IL-22BP a IL-22 y, de ese modo, induce o aumenta una actividad de IL-22 (por ejemplo, unión a IL-22R).

En otra realización, un agonista de un PAM es un oligopéptido que se une al PAM. En una realización,

un oligopéptido se une al dominio de unión al ligando extracelular de IL-22R. Los oligopéptidos pueden sintetizarse químicamente usando la metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Dichos oligopéptidos suelen tener al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 aminoácidos de longitud. Dichos oligopéptidos se pueden identificar sin experimentación excesiva usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se observa que las técnicas para seleccionar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un objetivo polipeptídico son bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º. 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; las publicaciones PCT n.º WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:178-182 (1985); Geysen et al., en Synthetic Peptides as Antigen, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222/581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

En otro enfoque en particular, un agonista de un PAM es una molécula orgánica que se une al PAM, diferente de un oligopéptido o anticuerpo como se describe en el presente documento. Una molécula orgánica puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña. En una realización, una molécula orgánica se une al dominio extracelular de un IL-22R. Una molécula orgánica que se une a un PAM puede identificarse y sintetizarse químicamente usando metodología conocida (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT n.º WO00/00823 y WO00/39585). Dichas moléculas orgánicas son usualmente de menos de aproximadamente 2000 daltons de tamaño, como alternativa, de menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 daltons de tamaño, en la que tales moléculas orgánicas que son capaces de unirse a un PAM pueden identificarse sin excesiva experimentación usando técnicas muy conocidas. A este respecto, se observa que las técnicas para seleccionar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse a un objetivo polipeptídico son bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT n.º WO00/00823 y WO00/39585).

Un agonista de IL-22 puede ser una molécula orgánica que se une a IL-22BP y bloquea o inhibe la unión de IL-22BP a IL-22 y, de ese modo, induce o aumenta una actividad de IL-22 (por ejemplo, unión a IL-22R).

D. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas se preparan para el almacenamiento mezclando un agente que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. [1980]), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y

concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de he:cametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol);

5 polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo

10 complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

También se pueden usar lipofecciones o liposomas para administrar un agente a una célula. Cuando el agente es un fragmento de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente a la proteína

15 diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que retienen la capacidad de unirse a la secuencia de proteína diana. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993]). Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen un anticuerpo se preparan por

20 procedimientos conocidos en la materia, tal como se describe en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc Natl Acad Sci USA, 77: 4030 (1980); y las patentes de Estados Unidos números 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.013.556. Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y

25 fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' de un anticuerpo se pueden conjugar a liposomas como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286 - 288 (1982)) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como doxorrubicina) está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

Un agente puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por

30 polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida de un agente. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de

40 matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrógenos (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como la serie LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como

45 etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden diseñar estrategias racionales para la estabilización según el mecanismo involucrado.

50 Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando restos suifhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz de polímeros específicas.

Una formulación farmacéutica en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando. Por ejemplo, en una realización, una formulación farmacéutica que contiene más de un compuesto activo comprende 1) al menos un agonista de IL-22, por ejemplo, un anticuerpo que se une a IL-22 y/o un anticuerpo que se une a IL-22R; y 2) al menos un anticuerpo que se une a IL-6 o IL-23 (en el que se puede seleccionar cualquier número de los anticuerpos enumerados en 2) en cualquier

60 combinación). En otra realización, una formulación farmacéutica contiene dos o más compuestos activos que tienen actividades complementarias.

E. Procedimientos de tratamiento

La descripción se refiere a procedimientos para tratar un trastorno microbiano.

- 5 La invención proporciona los usos y el kit médicos reivindicados.

Los ejemplos de un patógeno microbiano incluyen, pero sin limitación, una bacteria o virus. En una realización, el patógeno microbiano es una bacteria, por ejemplo, una bacteria gramnegativa o grampositiva. En una realización particular, la bacteria es una bacteria gramnegativa. En otra realización, la bacteria es una bacteria de unión o borrado (A/E) y, más particularmente, una *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) o *E. coli* enteropatógena (EPEC). En una realización, la bacteria es *E. coli* enteropatógena (EHEC) es *E. coli* 0157: 1-7 o *E. coli* 055:H7.

Los procedimientos terapéuticos comprenden una o más composiciones o formulaciones farmacéuticas. Dichos procedimientos incluyen procedimientos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, a menos que se indique lo contrario.

En diversas realizaciones, la presente descripción proporciona procedimientos para modular una respuesta inmune antimicrobiana estimulando o inhibiendo una ruta de señalización mediada por PAM y/o la función celular Th_{IL-17}. Dichos procedimientos son útiles para el tratamiento de trastornos microbianos. Por ejemplo, en una realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para potenciar una respuesta inmune antimicrobiana estimulando una ruta de señalización mediada por PAM, por ejemplo, y la ruta de señalización mediada por IL-22 y/o IL-23. En otra realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para modular una respuesta inmune antimicrobiana estimulando o inhibiendo una ruta de señalización mediada por citocinas. Por ejemplo, en una realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para potenciar una respuesta inmune antimicrobiana estimulando o inhibiendo una ruta de señalización mediada por citocinas, por ejemplo, una ruta de señalización de IL-22 y/o IL-23. Además, la presente divulgación proporciona procedimientos para modular una respuesta inmune antimicrobiana estimulando o inhibiendo una función celular Th_{IL-17}.

En una realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para estimular una ruta de señalización mediada por PAM en un sistema biológico, comprendiendo el procedimiento proporcionar un agonista de PAM al sistema biológico. Los ejemplos de dicho sistema biológico incluyen, pero sin limitación, células de mamífero en un sistema de cultivo celular *in vitro* o en un organismo *in vivo*. En otra realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para inhibir una ruta de señalización mediada por PAM en un sistema biológico, comprendiendo el procedimiento proporcionar un antagonista de PAM al sistema biológico.

En una realización particular, la presente divulgación proporciona un procedimiento para potenciar una respuesta inmune antimicrobiana en un sistema biológico estimulando una ruta de señalización mediada por IL-23 y/o IL-22 en un sistema biológico, comprendiendo el procedimiento proporcionar una IL-22 o un agonista de IL-22 al sistema biológico. En una realización, un agonista de IL-22 es IL-22. En otra realización, el agonista de IL-22 es un anticuerpo que se une a IL-22.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para inhibir una ruta de señalización mediada por IL-23 en un sistema biológico, comprendiendo el procedimiento proporcionar un antagonista de IL-22 al sistema biológico. En una realización, el antagonista de IL-22 es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo neutralizante anti-IL-22 y/o un anticuerpo neutralizante anti-IL-22R.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para estimular una función de células Th_{IL-17}, el procedimiento que comprende exponer una célula Th_{IL-17} a un agonista de un PAM que media la ruta de señalización mediada por IL-23 (por ejemplo, IL-23, IL-6 o IL-22). Dichos procedimientos son útiles para tratar un trastorno microbiano. En una realización, un agonista de IL-22 es IL-22. En otra realización, el agonista de IL-22 es un anticuerpo que se une a IL-22.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para inhibir una función celular Th_{IL-17}, comprendiendo el procedimiento exponer una función celular Th_{IL-17} a un antagonista de un PAM que media la ruta de señalización mediada por IL-23 (por ejemplo, IL-23, IL-6 o IL-22). En una realización, el antagonista es un anticuerpo anti-IL-22, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante.

Las funciones celulares de Th_{IL-17} incluyen, pero sin limitación, estimulación de la inmunidad mediada por células (hipersensibilidad de tipo retardado); reclutamiento de células inmunes innatas, tales como células mieloides (por ejemplo, monocitos y neutrófilos) a sitios de inflamación; y estimulación de la infiltración de células inflamatorias en los tejidos. En una realización, una función celular Th_{IL-17} está mediada por IL-23 y/o IL-22.

Las composiciones se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa en bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intraceroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, vías oral, tópica o inhalación (intranasal, intrapulmonar). Se prefiere la administración intravenosa o inhalada de polipéptidos y anticuerpos.

Para el tratamiento o la reducción de la gravedad de un trastorno microbiano, la dosificación apropiada de una composición dependerá del tipo de trastorno que se va a tratar, como se ha definido anteriormente, de la gravedad y curso de la enfermedad, si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico encargado de la atención. El compuesto se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y gravedad del trastorno, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de un polipéptido o anticuerpo es una dosificación candidata inicia para la administración a un paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría estar en el intervalo de aproximadamente 1 µg/g a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, se continuará el tratamiento hasta que suceda una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

F. Procedimientos de diagnóstico y procedimientos de detección

La divulgación también proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un PAM en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo con el PAM, en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo al PAM y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el PAM.

En una realización, la divulgación proporciona un procedimiento para monitorizar el tratamiento de un trastorno microbiano en un sujeto, en el que el procedimiento comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un PAM en una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas del sujeto que necesita tratamiento y se detecta el nivel de expresión en la muestra de ensayo. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. En una realización, la muestra de ensayo comprende sangre o suero. En una realización, la detección del nivel de expresión de un gen que codifica un PAM comprende (a) poner en contacto un anticuerpo anti-AMP con una muestra de ensayo obtenida del mamífero, y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y un PAM en la muestra de ensayo. El anticuerpo se puede unir a una marcador detectable. La formación del complejo se puede controlar, por ejemplo, mediante microscopia óptica, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en la materia. La muestra de ensayo se puede obtener de un individuo sospechoso de tener un trastorno microbiano.

En una realización, la detección del nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido de PAM comprende detectar el nivel de transcripción de ARNm del gen. Los niveles de transcripción de ARNm pueden detectarse, ya sea cuantitativa o cualitativamente, mediante diversos procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Los niveles de transcripción de ARNm también pueden detectarse directa o indirectamente mediante la detección de niveles de ADNc generado a partir del ARNm. Los procedimientos de ejemplo para detectar niveles de transcripción de ARNm incluyen, pero sin limitación, RT-PCR cuantitativa en tiempo real y ensayos basados en hibridación, incluyendo ensayos basados en micromatrices y ensayos basados en filtro, tales como transferencias Northern.

En otra realización, la divulgación proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un PAM en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo con el PAM, en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo al PAM y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el PAM.

En otra realización, la divulgación se refiere a un kit de diagnóstico que contiene un anti-PAM en un envase adecuado. El kit contiene, preferentemente, instrucciones para usar el anticuerpo para detectar un PAM. En una realización, el kit de diagnóstico es para diagnosticar un trastorno microbiano. En una realización, el kit de diagnóstico es para diagnosticar una infección microbiana.

En otra realización, la divulgación proporciona un kit que comprende uno o más PAM y/o moduladores del mismo. En otra realización, la divulgación proporciona un kit que comprende una o más una o más composiciones farmacéuticas que comprenden cada una un PAM o un modulador del mismo.

G. Ensayos

1. Ensayos basados en células y modelos animales

Los ensayos basados en células y los modelos animales para enfermedades inmunes son útiles en la práctica de ciertas realizaciones. Ciertos ensayos basados en células proporcionados en los ejemplos siguientes son útiles, por ejemplo, para analizar la eficacia de antagonistas o agonistas de IL-22.

Los modelos animales in vivo también son útiles. Los ejemplos de modelos animales también se describen en los ejemplos siguientes. La naturaleza in vivo de tales modelos los hace predictivos de respuestas en pacientes humanos. Los modelos animales de enfermedades relacionadas con el sistema inmune incluyen animales no recombinantes y recombinantes (transgénicos). Los modelos animales no recombinantes incluyen, por ejemplo,

roedores, por ejemplo modelos murinos. Dichos modelos pueden generarse introduciendo células en ratones singénicos usando técnicas estándar, *por ejemplo*, inyecciones subcutáneas, inyección en la vena de la cola, implantación del bazo, implantación intraperitoneal, implantación debajo de la cápsula renal, etc.

- 5 Los modelos de enfermedad de injerto contra huésped proporcionan un medio para evaluar la reactividad de las linfocitos T contra antígenos de MHC y antígenos de trasplante menores. La enfermedad de injerto contra huésped ocurre cuando las células inmunocompetentes se trasplantan en pacientes inmunosuprimidos o tolerantes. Las células del donante reconocen y responden a los antígenos del huésped. La respuesta puede variar desde una inflamación grave potencialmente mortal hasta casos leves de diarrea y pérdida de peso. Un procedimiento
10 adecuado para evaluar la enfermedad de injerto contra huésped se describe con detalle en Current Protocols in Immunology, anteriormente, unidad 4.3.

Un modelo animal para el rechazo de aloinjerto de piel es un medio de analizar la capacidad de los linfocitos T para mediar en la destrucción in vivo de tejido y una medida de su papel en el rechazo de trasplantes. Los modelos más
15 comunes y aceptados usan injertos de piel de cola murinos. Experimentos repetidos han demostrado que el rechazo de aloinjerto de piel está mediado por linfocitos T, linfocitos T auxiliares y linfocitos T efectores citotóxicos, y no anticuerpos. Auchincloss, H. Jr. y Sachs, D.-H., Fundamental Immunology, 2ª ed., W. E. Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992. Un procedimiento adecuado se describe con detalle en Current Protocols in Immunology, anteriormente, unidad 4.4. Otros modelos de rechazo de trasplantes que se pueden usar para probar compuestos
20 son los modelos de trasplantes alogénicos de corazón descritos por Tanabe, M. y col., Transplantation (1994) 58:23 y Tinubu, S. A. et al, J. Immunol. (1994) 4330:4338.

La hipersensibilidad de contacto es un simple ensayo in vivo de la función inmune mediada por células (hipersensibilidad de tipo retardado). En este procedimiento, la exposición cutánea a haptenos exógenos que da
25 lugar a una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado que se mide y cuantifica. La sensibilidad de contacto implica una fase de sensibilización inicial seguida de una fase de provocación. La fase de provocación se produce cuando los linfocitos T encuentran un antígeno con el que han tenido contacto previo. Se produce hinchazón e inflamación, haciendo de este un excelente modelo de dermatitis alérgica de contacto humana. Un procedimiento adecuado se describe con detalle en Current Protocols in Immunology, Eds. J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unidad 4.2. Véase también Grabbe, S. y Schwarz, T, Immun. Today 19(1): 37-44 (1998).
30

Adicionalmente, las composiciones se pueden analizar en modelos animales para enfermedades similares a la psoriasis. Por ejemplo, las composiciones se pueden analizar en el modelo de ratón scid/scid descrito por Schon, M. P. et al, Nat. Med. (1997) 3: 183, en el cual los ratones demuestran lesiones cutáneas histopatológicas parecidas a la psoriasis. Otro modelo adecuado es la quimera de ratón de piel humana/scid preparada como se describe en Nickoloff, B. J. et al, Am. J. Path., (1995) 146:580. Otro modelo adecuado se describe en Boyman et al., J. Exp. Med., (2004) 199(5):731-6, en el que la piel prepsoriásica humana se injerta en ratones AGR129, lo que conduce al desarrollo de lesiones cutáneas psoriásicas.
40

Se pueden construir animales defectivos que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido identificado en el presente documento, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido y una molécula de ADN en la que se ha alterado ese gen. Por ejemplo, el ADNc que codifica un polipéptido particular puede usarse para clonar ADN genómico que codifica ese polipéptido de acuerdo con técnicas establecidas. Una porción del ADN genómico que codifica un polipéptido particular puede eliminarse o reemplazarse por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que puede usarse para controlar la integración. De manera típica, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (ambos en los extremos 5' y 3') en el vector [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN re ha recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno [véase, por ejemplo, Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. Después, las células seleccionadas se inyectan en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pág. 113-152]. Un embrión quimérico puede implantarse después en un animal hembra huésped
50 seudopreñada adecuada y el embrión se lleva a término para crear un animal "defectivo". La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y usar para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales defectivos se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra ciertas afecciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido.
60

2. Ensayos de detección para candidatos a fármacos

Los ensayos de cribado para candidatos a fármacos están diseñados para identificar compuestos que se unen o forman complejos con un polipéptido identificado en el presente documento o un fragmento biológicamente activo del mismo, o interfieren de otro modo con la interacción de un polipéptido con otras proteínas celulares. Tales ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos
65

particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos sintéticos orgánicos o inorgánicos, que incluyen péptidos, preferentemente péptidos solubles, (fusiones de polipéptido-inmunoglobulina y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitaciones, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos antiidiotípicos y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Los ensayos pueden realizarse en varios formatos, que incluyen ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la materia. Todos los ensayos son comunes porque requieren el contacto de un compuesto de ensayo con un polipéptido identificado en el presente documento en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que el polipéptido interaccione con el compuesto de ensayo.

En ensayos de unión, la interacción es unión y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una realización particular, un polipéptido o el compuesto de ensayo se inmoviliza en una fase sólida, *por ejemplo*, en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se lleva a cabo recubriendo la superficie sólida con una solución del polipéptido o compuesto de ensayo y secando. Como alternativa, un anticuerpo inmovilizado, *por ejemplo*, un anticuerpo monoclonal específico para un polipéptido a inmovilizar, puede usarse para anclar el polipéptido a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede marcarse mediante un marcador detectable, al componente inmovilizado, *por ejemplo*, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Una vez completada la reacción, los componentes que no han reaccionado se eliminan, *por ejemplo*, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado porta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se produjo la formación de complejos. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no lleva un marcador, se puede detectar la formación de complejos, *por ejemplo*, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto de ensayo interacciona pero no se une a un polipéptido particular identificado en el presente documento, su interacción con esa proteína puede analizarse mediante procedimientos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, reticulación, coinmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden controlar utilizando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores [Fields y Song, *Nature* (London) 340, 245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582 (1991)] según lo revelado por Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tal como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión al ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levaduras descrito en las publicaciones anteriores (generalmente denominado el "sistema de dos híbridos") aprovecha esta propiedad y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y otro, en el que las proteínas de activación candidatas se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador GAL1-lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos interactuantes se detectan con un sustrato cromogénico para β -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar las interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos está disponible comercialmente en Clontech. Este sistema también se puede extender para mapear dominios de proteínas implicados en interacciones de proteínas específicas, así como para identificar los restos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Para identificar compuestos que interfieren con la interacción de un polipéptido identificado en el presente documento y otros componentes intra o extracelulares, se puede preparar una mezcla de reacción que contenga el polipéptido y el componente en condiciones que permitan la interacción del polipéptido con el componente. Para probar la capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir la interacción, la mezcla de reacción se prepara en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Si hay una disminución en la interacción del polipéptido con el componente en presencia del compuesto de ensayo, se dice que el compuesto de ensayo inhibe la interacción del polipéptido con el componente.

En determinadas realizaciones, los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un PAM comprenden poner en contacto un PAM con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el PAM. Dichas actividades incluyen, pero sin limitación, las descritas en los Ejemplos siguientes.

En una realización, la divulgación proporciona procedimientos para identificar agonistas de un polipéptido de IL-22 que comprende poner en contacto un polipéptido de IL-22 con una molécula agonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido de IL-22. Dichas actividades incluyen, pero sin limitación, las descritas en los Ejemplos siguientes.

3. Ensayos de unión a anticuerpos

Los estudios de unión a anticuerpos se pueden llevar a cabo en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pág.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de ensayo por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos preferentemente están insolubilizados antes o después de la competición, de modo que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos se pueden separar convenientemente del patrón y del analito que permanecen sin unir.

Los ensayos de tipo sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína a detectar. En un ensayo de tipo sándwich, el analito de la muestra de prueba se une a un primer anticuerpo que se inmoviliza en un soporte sólido y a continuación un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo insoluble de tres partes. Véase, *por ejemplo*, la patente de los Estados Unidos n.º 4.376.110. El segundo anticuerpo se puede marcar con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich directos) o se puede medir usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un resto detectable (ensayo de tipo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de tipo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

La inmunohistoquímica también puede usarse para determinar la ubicación celular de un antígeno al que se une un anticuerpo. Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede estar fresca o congelada o puede incrustarse en parafina y fijarse con un conservante tal como formalina, por ejemplo. Divulgación de artículos de fabricación

En otra realización, la divulgación proporciona un artículo de fabricación que comprende composiciones útiles para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos microbianos descritos en el presente documento. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una instrucción. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente incluye una composición que es eficaz para el diagnóstico o tratamiento de la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición generalmente es un polipéptido, un anticuerpo, un agonista o un antagonista. Una instrucción o marcador en, o asociado con, el recipiente indica que la composición se usa para diagnosticar o tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de paquetes con instrucciones de uso.

En una realización, la divulgación proporciona un artículo de fabricación, que comprende:

- (a) una composición de materia que comprende un PAM o un modulador del mismo (por ejemplo, un agonista de IL-22);
- (b) un recipiente que contiene dicha composición; y
- (c) un marcador fijado a dicho recipiente o un prospecto incluido en dicho recipiente, que se refiere al uso de dicho agonista en el tratamiento de un trastorno microbiano. La composición puede comprender una cantidad efectiva del agonista.

50 Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención y se proporcionan en el presente documento para fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras varias realizaciones, dada la descripción general proporcionada en el presente documento.

Los reactivos comercialmente disponibles a los que se hace referencia en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario. La fuente de esas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria descriptiva, por los números de acceso de la ATCC es la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA.

Los datos presentados en el presente documento demuestran por primera vez que IL-22 es una de las citocinas clave que une la respuesta inmune adaptativa y la defensa epitelial innata durante la infección temprana de un patógeno bacteriano A/E. Como se muestra en el presente documento, la inducción de RegIII β y RegIII γ también indica que IL-22 puede tener funciones más amplias en el control de diversas infecciones bacterianas. Los datos apoyan además el papel de los linfocitos Th17 y sus citocinas efectoras en enfermedades infecciosas y

enfermedades autoinmunes. Finalmente, los estudios del presente documento indican que la IL-22 y sus productos cadena abajo, tales como RegIII β y RegIII γ , pueden ser beneficiosos para el tratamiento de ciertas enfermedades infecciosas.

5 EJEMPLO 1: IL-23 es esencial para la regulación de IL-22 durante un proceso de enfermedad infecciosa.

Los datos del presente documento demuestran que la IL-23 es esencial para la regulación de IL-22 durante un proceso de enfermedad infecciosa.

10 Ambos pares de receptores de IL-22, las cadenas de IL-22R y IL-10R β , se expresan en el tracto GI de ratones C57B1/6 de tipo silvestre (Figura 1A). Su expresión en el duodeno, yeyuno, íleon y colon es más alta que en la piel, un tejido donde se ha demostrado que la IL-22 induce hiperplasia. De forma consistente, se ha indicado que tanto las células epiteliales colónicas como los miofibroblastos subepiteliales responden a la IL-22. Durante la infección por *C. rodentium*, se indujo IL-22 en el colon de ratones de tipo silvestre (Figura 1B), al igual que las citocinas que promueven la diferenciación de linfocitos Th17, incluyendo la subunidad p19 y p40 de IL-23 (Figura 1C-D) e IL-6 (Figura 1E). Todas estas citocinas se indujeron rápidamente, con una expresión máxima alrededor del día 4 después de la inoculación. Por el contrario, la inducción de IL-17 tuvo una cinética más lenta y alcanzó su nivel máximo el día 12 después de la inoculación (Figura 1F).

20 Ya que la IL-23 o la IL-6 estimulan la producción de IL-22 a partir de los linfocitos T *in vitro*, los presentes inventores intentaron definir primero su papel en la regulación de la producción de IL-22 durante infección por *C. rodentium*. Al comparar la tasa de supervivencia de los ratones de tipo silvestre, p19^{-/-}, p40^{-/-} e IL-6^{-/-} después de la infección por *C. rodentium*, los inventores encontraron de forma consistente que todos los ratones del grupo p40^{-/-} (Figura 1G) o el grupo p19^{-/-} (datos no mostrados) murieron 10 días después de la inoculación. Curiosamente, el 60 % de mortalidad también se observó en el grupo IL-6^{-/-} alrededor del día 12 (Figura 1G), lo que indica que la IL-6 es necesaria, en cierta medida, para un control total de infección por *C. rodentium*. A continuación, los inventores examinaron la expresión de IL-22 e IL-17 en ambos ratones p19^{-/-} e IL-6^{-/-} (Figura 1H). Mientras, la expresión de IL-17 no se alteró en los ratones p19^{-/-} (15), la inducción de IL-22 disminuyó en ratones p19^{-/-} en comparación con los ratones de tipo silvestre. En ratones IL-6^{-/-}, sin embargo, mientras que el nivel máximo de IL-22 fue comparable al de los ratones de tipo silvestre, su inducción se retrasó significativamente (Figura 1H). Además, en ratones IL-6^{-/-}, la inducción de IL-17 se redujo significativamente, consistente con un papel esencial de IL-6 para la producción de IL-17.

35 Midiendo directamente las proteínas IL-22/IL-17 por ELISA en cultivo de colon ex vivo de ratones infectados confirmó la cinética de la producción de IL-22/IL-17 y la ausencia de inducción de IL-22 de ratones p19^{-/-} durante infección por *C. rodentium* (Figura 11). Estos datos demuestran por primera vez que IL-23 es esencial para la regulación de IL-22 durante un proceso de enfermedad infecciosa.

Estos datos demuestran por primera vez que IL-23 es esencial para la regulación de IL-22 durante un proceso de enfermedad infecciosa.

40 Ejemplo 2: IL-22 es una citocina efector cadena abajo clave que contribuye a la biología de IL-23 en el control de la infección microbiana.

45 La regulación alterada de IL-22 en ratones IL-6^{-/-} y deficientes en IL-23 indicaron que IL-22 puede desempeñar un papel crítico en la defensa del huésped contra la infección por *C. rodentium*. Para evaluar adicionalmente el papel de IL-22, se inoculó a los ratones IL-22^{-/-} *C. rodentium*. Mientras que los compañeros de camada de tipo silvestre perdieron peso transitoriamente, pero pudieron recuperarse por completo después del día 6, los ratones IL-22^{-/-} continuaron perdiendo peso tras la infección por *C. rodentium* (Figura 2A). Aproximadamente el 80 % de los ratones IL-22^{-/-} agonizaron o murieron 12 días después de la inoculación de *C. rodentium* (Figura 2A). El análisis histológico de los colon de los ratones IL-22^{-/-} infectados el día 8 demostró un mayor grosor de la mucosa en comparación con la de los ratones TS (Figura 2B). Coincidentemente, también hubo aumento de la inflamación submucosa (Flecha, Figura 2B). Además, mientras que en ratones de control, la infección por *C. rodentium* fue predominantemente superficial, un gran número de bacterias penetraron profundamente en las criptas del colon en ratones IL-22^{-/-} (flechas, figura 2C). El análisis FACS con un anticuerpo anti-IL-22R (Figura 12) reveló que IL-22R se expresó por células epiteliales colónicas murinas primarias positivas para E-cadherina, pero no por linfocitos CD45+ intraepiteliales (IEL) ni células mononucleares de la lámina propia (LPMC) (Figura 12A). De forma similar, las células epiteliales colónicas humanas primarias también expresaron IL-22R (figura 12B). Estos datos sugieren que las células epiteliales de colon eran el objetivo directo de la IL-22.

60 Estos datos apoyan la importancia de IL-22 en la defensa del huésped contra la infección por *C. rodentium* e indican que la IL-22 puede ser una de las citocinas efectoras clave cadena abajo que contribuyen a la biología de IL-23 en el control de infecciones microbianas.

Ejemplo 3: Las rutas de IL-17A e IL-17F no son necesarias para la defensa del huésped contra la infección por *C. rodentium*.

El deterioro parcial de la defensa del huésped en ratones IL-6^{-/-} contra *C. rodentium* también podría explicarse por la inducción retardada de IL-22 en estos ratones (Figura 1H, panel izquierdo). Sin embargo, también es posible que la letalidad en los ratones IL-6^{-/-} infectado puede haber sido debido a su incapacidad para regular por aumento la IL-17 (Figura 1H, panel derecho). La ruta de la IL-17 es crucial para el control de muchas infecciones bacterianas extracelulares, tal como *Klebsiella pneumoniae*. IL-17 señala a través de IL-17R e IL-17RC (D. Toy et al., J Immunol 177, 36 (July 1, 2006)), e induce respuestas proinflamatorias de muchos tipos celulares, incluidas las células epiteliales (J. Witowski, K. Ksiazek, A. Jorres, Cell Mol Life Sci 61, 567 (Mar, 2004)). Para analizar el papel de la ruta de IL-17 durante la infección por *C. rodentium*, se generaron ratones IL-17RC^{-/-} (Figura 5). En comparación con los compañeros de camada de tipo silvestre, no hubo un defecto obvio en ratones IL-17RC^{-/-} en términos de desarrollo o composición de linfocitos T, linfocitos B y otras células inmunes (datos no mostrados). Sin embargo, los fibroblastos generados a partir de la punta de la cola (figura 5C) o del tejido pulmonar (datos no mostrados) de ratones IL-17RC^{-/-} fueron completamente incapaces de producir IL-6 cuando se estimularon con IL-17A o IL-17F, lo que indica que IL-17RC es un receptor esencial para las funciones mediadas por IL-17A e IL-17F. Tras la inoculación de *C. rodentium*, tanto los ratones IL-17RC^{-/-} como los compañeros de camada de tipo silvestre sobrevivieron al curso de la infección sin pérdida significativa de peso (Figura 2D) o cualquier diferencia histológica en el colon (datos no mostrados).

Estos resultados indican que las rutas de IL-17A e IL-17F no fueron necesarias para la defensa del huésped contra la infección por *C. rodentium*, excluyendo directamente la posibilidad de que la producción defectuosa de IL-17 sea la principal causa de mortalidad observada en ratones IL-6^{-/-}. De este modo, la inducción retardada de IL-22 observada en ratones IL-6^{-/-} podría ser la razón por la cual estos ratones no pudieron sobrevivir a la infección. Otros factores cadena abajo de la IL-6, sin embargo, también pueden ser importantes. Los resultados de ratones IL-6^{-/-} implican que la inducción temprana de IL-22 podría ser crucial para que el huésped monte una respuesta suficiente contra la infección por *C. rodentium* para prevenir la letalidad.

Ejemplo 3: IL-22 desempeña un papel crítico en la etapa temprana de la infección bacteriana.

Para determinar si la inducción temprana de IL-22 es crítica para que el huésped monte una respuesta suficiente contra la infección por *C. rodentium* para prevenir la letalidad, se administró el anticuerpo neutralizante anti-IL-22 cada dos días comenzando el día 0 o el día 8 después de la inoculación de *C. rodentium*. Como se esperaba, los ratones que recibieron mAb anti-IL-22 al mismo tiempo que la inoculación bacteriana continuaron perdiendo peso, y todos agonizaron o murieron 12 días después de la inoculación. Por el contrario, todos los animales tratados con anticuerpo de control de isotipo sobrevivieron (figura 2E). Los ratones que recibieron mAb anti-IL-22 comenzando 8 días después de la inoculación tuvieron un resultado similar al de los ratones tratados con mAb de isotipo, con recuperación completa de la infección.

Por lo tanto, estos datos indican que IL-22 desempeña un papel crucial en la etapa inicial de infección por *C. rodentium*, pero no desempeña ningún papel durante la última fase de la defensa del huésped cuando las bacterias se están erradicando.

Ejemplo 4: IL-19, IL-20 e IL-24 son prescindibles para la defensa del huésped contra la infección bacteriana.

Otras citocinas de la familia de la IL-10, IL-19, IL-20 e IL-24, inducen funciones biológicas similares a las inducidas por IL-22 en los queratinocitos epidérmicos humanos (S. M. Sa et al., J Immunol 178, 2229 (February 15, 2007)). IL-19, IL-20 e IL-24 estaban reguladas por aumento en colon de ratón de tipo silvestre durante la infección por *C. rodentium* (Figura 6). Por lo tanto, pueden desempeñar un papel similar al de la IL-22 durante infección por *C. rodentium*. La IL-19 señala a través de las cadenas IL-20R α y IL-20R β . IL-20 e IL-24 pueden señalizar a través de dos pares de receptores diferentes, IL-20R α /IL-20R β e IL-22R/IL-20R β (J.-C. Renauld, Nature Reviews Immunology 3, 667 (2003)). Por lo tanto, IL-20R β es la cadena de receptor común para estas tres citocinas. En el tracto GI, la expresión de las cadenas de IL-20R α e IL-20R β fue significativamente menor que la expresión de estas cadenas en la piel (Figura 7).

Para abordar críticamente el papel de estas tres citocinas durante la infección por *C. rodentium*, se generaron ratones IL-20R β ^{-/-} (Figura 8). Estos ratones exhibieron un desarrollo normal con una composición y desarrollo de linfocitos similares en todos los órganos linfoides principales cuando se compararon con ratones de tipo silvestre (datos no mostrados). La piel de la oreja de estos ratones no pudo regular por aumento las proteínas de la familia S100 cuando se trataron con IL-20 recombinante, lo que indica un defecto en la señalización de IL-20. in vivo (Figura 8C).

Los ratones IL-20R β ^{-/-} sobrevivieron a la infección por *C. rodentium*, así como los ratones de tipo silvestre sí lo hicieron (Figura 2F), demostrando que IL-19, IL-20 e IL-24 son prescindibles para la defensa del huésped contra la infección por *C. rodentium*.

Ejemplo 5: La deficiencia de IL-22 puede comprometer la integridad epitelial durante la etapa temprana de infección por *C. rodentium*.

Los presentes inventores examinaron los mecanismos cadena abajo de IL-22 durante infección por *C. rodentium*. Tanto los ratones IL-22^{-/-} como los ratones de tipo silvestre tratados con mAb anti-IL-22 el día 0 desarrollaron diarrea sanguinolenta más severa y una mayor incidencia de prolapso rectal en comparación con los ratones control 8 días después de la inoculación de *C. rodentium* (datos no mostrados). Los colon de ratones IL-22^{-/-} (datos no mostrados) o los ratones tratados con mAb anti-IL-22 el día 0 se engrosaron y acortaron 10 días después de la inoculación (Figura 3A), así como también tenían un ciego más pequeño, en comparación con los ratones de control. El análisis histológico reveló además un aumento de la inflamación en los colon que carecen de señalización de IL-22 (Figura 3B). También hubo marcada ulceración de la mucosa multifocal y múltiples focos de inflamación transmural en los ratones IL-22^{-/-} y en los ratones tratados con mAb anti-IL-22 (Figura 3C y Figura 9). Además, las cargas bacterianas en el ganglio linfático mesentérico, el bazo y el hígado de los ratones IL-22^{-/-} se incrementaron significativamente en comparación con los de los ratones de tipo silvestre. Curiosamente, la diferencia en las cargas bacterianas en los colon de ratones de tipo silvestre y ratones IL-22^{-/-} fue insignificante (Figura 3D). De acuerdo con estos resultados, también hubo evidencias de diseminación bacteriana sistémica, particularmente en los hígados de ratones IL-22^{-/-}, donde era evidente la necrosis hepatocelular multifocal con microabscesos embólicos (Figura 3E).

En conclusión, estos datos indican que la integridad epitelial se ve comprometida en ratones IL-22^{-/-} durante la etapa temprana de infección por *C. rodentium*.

Ejemplo 6: La deficiencia de IL-22 conduce a una reducción en los títulos de IgG antibacteriana

Estudios previos establecieron el papel esencial de los anticuerpos de *C. rodentium* en el aclaramiento de bacterias. La transferencia de suero de ratones de tipo silvestre después de la infección rescató completamente a los ratones CD4^{-/-} de la muerte tras la exposición a *C. rodentium* (10). En nuestros estudios, los ratones deficientes en IL-22 agonizaban o murieron comenzando aproximadamente el día 8, cuando las respuestas de anticuerpos no se desarrollaron completamente en ratones de tipo silvestre (Figura 3F). El día 8, los títulos de anticuerpos anti-*C. rodentium* fueron 50 veces menores que los del día 16 en ratones de tipo silvestre. Sin embargo, cuando se compararon los títulos de anticuerpos anti-*C. rodentium* el día 8 a partir de ratones de tipo silvestre y IL-22^{-/-}, se produjo una reducción significativa inesperada en el título de IgG anti-*C. rodentium* en ratones IL-22^{-/-} en comparación con los ratones de tipo silvestre (Figura 3G). Por el contrario, no hubo disminución de los títulos de IgG, IgM, IgA o IgE anti-*C. rodentium* en ratones IL-22^{-/-} (figura 10A y datos no mostrados). Además, el análisis del subtipo de IgG reveló que si bien no había IgG1 anti-*C. rodentium* en ratones IL-22^{-/-} o de tipo silvestre 8 días después de la inoculación, otros subtipos de IgG anti-*C. rodentium*, incluyendo IgG2a, IgG2b, IgG2c y IgG3, se redujeron significativamente en ratones IL-22^{-/-} (Figura 10B). Era poco probable que las diferencias en LA IgG específica antibacteriana contribuyeran al aclaramiento de *C. rodentium* del colon en este punto del tiempo, especialmente dado que la IgG no está dirigida a la luz de la mucosa colónica y las cargas bacterianas del colon tanto en ratones de tipo silvestre como en ratones IL-22^{-/-} fueron similares (Figura 3D). Es posible, aunque esta IgG anti-*C. rodentium* circulante puede ser importante para controlar la penetración de *C. rodentium* a través de la barrera epitelial intestinal y la prevención de la diseminación sistémica, ya que un estudio reciente demostró que la IgG circulante, pero no la IgA o IgM secretora, era necesaria para la eliminación sistémica de *C. rodentium* (C. Maaser et al., Infect. Immun. 72, 3315 (1 de junio de 2004)). No está claro cómo la deficiencia de IL-22 conduce a una reducción en los títulos de IgG antibacteriana. Es poco probable que la IL-22 actúe directamente sobre los linfocitos B, ya que la expresión de IL-22R no es detectable en los linfocitos B (S. Lecart et al., Int. Immunol. 14, 1351 (1 de noviembre de 2002)). No obstante, la IgG anti-*C. rodentium* reducida podría ser uno de los factores que contribuyen a la respuesta de defensa del huésped defectuosa en ratones IL-22^{-/-} durante la infección por *C. rodentium*.

Ejemplo 7: IL-22 fue indispensable para la inducción de lectinas antimicrobianas, tales como RegIIIβ y RegIIIγ, de las células epiteliales colónicas durante la infección bacteriana.

Tratamiento con IL-22 de tejidos de colon de ratones de tipo silvestre no infectados ex vivo reguladas positivamente muchas proteínas antimicrobianas, incluyendo S100A8, S100A9, RegIIIβ, RegIIIγ, haptoglobina, SAA3, y lactotransferrina mediante análisis de micromatrices (Fig. 4A, 19 y 20). La inducción de estas proteínas se confirmó mediante RT-PCR en tiempo real (figura 4B y datos no mostrados). Durante la infección por *C. rodentium*, sin embargo, solo S100A8, S100A9, RegIIIβ y RegIIIγ se expresaron diferencialmente en IL-22^{-/-} ratones en comparación con los ratones de tipo silvestre (Figura 4C). El resto de los genes no fueron inducidos o no fueron diferentes en los dos puntos de tipo silvestre vs. IL-22^{-/-} ratones (datos no mostrados). La expresión de S100A8 y S100A9 fue ligeramente superior en los colon de ratones IL-22^{-/-} que en los colon de tipo silvestre el día 4 y el día 6, lo que sugiere que la expresión diferencial de estas proteínas era, muy probablemente, no responsable de la mayor mortalidad observada en ratones IL-22^{-/-} durante la infección por *C. rodentium*. No se encontraron diferencias en la expresión de defensinas, proteínas que son importantes en la defensa del huésped del epitelio infectado (T. Ganz, Science 286, 420 (October 15, 1999)), entre los ratones de tipo silvestre e IL-22^{-/-} (datos no mostrados). Curiosamente, la regulación por aumento de RegIIIβ y RegIIIγ observada en ratones de tipo silvestre fue completamente abolida en ratones IL-22^{-/-} tras la inoculación de *C. rodentium* (Figura 4C), lo que indica que

estas dos proteínas tenían funciones potenciales en el control la por *C. rodentium*. Tanto RegIII β como RegIII γ pertenecen a una familia de proteínas de lectina de tipo C secretadas (H. L. Cash, C. V. Whitham, L. V. Hooper, Protein Expression and Purification 48:151 (2006). Los niveles de expresión de RegIII β y RegIII γ aumentan drásticamente en respuesta a la colonización bacteriana y también a otros estímulos inflamatorios en ratones (S. A. Keilbaugh et al., Gut 54, 623 (May 1, 2005) H. Ogawa et al., Inflammatory Bowel Diseases 9, 162 (2003) H. Ogawa, K. Fukushima, I. Sasaki, S. Matsuno, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279, G492 (Sep, 2000)).

RegIII β o RegIII γ pueden prevenir la invasión de *C. rodentium* profundamente en las criptas del colon, ya que no se observaron diferencias en las cargas bacterianas de los colon de ratones IL-22 $^{-/-}$ frente a los ratones de tipo silvestre (Figura 3D). Como alternativa, las proteínas RegIII β o RegIII γ pueden actuar como factores de crecimiento autocrinos que desempeñan un papel en la reparación y/o protección epitelial en el contexto de la inflamación intestinal (H. Ogawa et al., Inflammatory Bowel Diseases 9, 162 (2003); S. L. Pull, J. M. Doherty, J. C. Mills, J. I. Gordon, T. S. Stappenbeck, PNAS 102, 99 (January 4, 2005); V. Moucadel et al., Eur J Cell Biol 80, 156 (Feb, 2001)).

Ejemplo 8: La inmunidad adaptativa no es esencial para la defensa temprana del huésped mediada por IL-22 contra infección por *C. rodentium*

Los datos anteriores sugirieron papeles de la IL-22 tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa. Por lo tanto, los inventores utilizaron ratones (Rag2 $^{-/-}$) con deficiencia del gen 2 activador de la recombinación para examinar críticamente la función de IL-22 en la inmunidad innata frente a la adaptativa durante infección por *C. rodentium*. Los ratones Rag2 $^{-/-}$ perdieron peso gradualmente y, al final, agonizaron o murieron alrededor del día 30, debido a su falta de linfocitos B y T, y su consecuente incapacidad para montar respuestas de anticuerpos contra *C. rodentium* (Figura 13A). A diferencia de los ratones p19 $^{-/-}$ o IL-22 $^{-/-}$, ninguno de los ratones Rag2 $^{-/-}$ perdieron más del 10 % de su peso corporal o murieron durante las dos primeras semanas de infección. Además, los ratones Rag2 $^{-/-}$ tratados con mAb anti-IL-22 perdieron peso muy rápidamente (figura 13A), similar a los ratones TS tratados con mAb anti-IL-22 (figura 2E). Todos los ratones Rag2 $^{-/-}$ tratados con mAb anti-IL-22 se volvieron moribundos o murieron alrededor del día 10 (Figura 13). Estos datos sugieren que la ruta de IL-22 todavía está activa en ratones Rag2 $^{-/-}$ y que la IL-22 es esencial para proteger a los ratones de la muerte durante la fase temprana de infección por *C. rodentium*. Estos datos también indican la reducción de los títulos de IgG anti-*C. rodentium* era causa insuficiente de la morbilidad y la mortalidad observadas en ratones IL-22 $^{-/-}$ tras la infección por *C. rodentium*, ya que la falta de producción de anticuerpos, en ratones Rag2 $^{-/-}$ solo no causaba una pérdida rápida de peso ni la muerte temprana tras la infección.

La producción de IL-22 en ratones Rag2 $^{-/-}$ fue comparable con la de los ratones WT tras la infección por *C. rodentium* (Figura 13B). Por el contrario, la inducción de IL-17A se redujo significativamente en ratones Rag2 $^{-/-}$ (Figura 13B y C). Los linfocitos T y los linfocitos B, por lo tanto, no eran las fuentes de IL-22 en este modelo. La tinción inmunohistoquímica con un mAb anti-IL-22 (Figura 15) detectó células positivas para IL-22 en el colon de ratones WT infectados con *C. rodentium*, pero no en colon o colon no infectado o colon de ratones IL-22 $^{-/-}$ infectados. La células positivas IL-22 se colocalizaron principalmente con grupos de células CD11c $^{+}$ en el colon de ratones Rag2 $^{-/-}$ (Figura 13D), pero no con células positivas para F4/80, Gr-1 o DX5 (datos no mostrados). Además, IL-23 indujo la producción de IL-22 directamente desde las CD CD11c $^{+}$ In vitro (Figura 13E). En conjunto, los datos de los inventores demuestran que las CD son una de las principales fuentes de producción de IL-22 durante infección por *C. rodentium*, y que IL-23 puede promover directamente la producción de IL-22 por las CD.

Ejemplo 9: RegIII desempeña un papel importante durante la infección bacteriana.

Curiosamente, la regulación por aumento de RegIII β y RegIII γ observada en ratones de tipo silvestre fue completamente abolida en ratones IL-22 $^{-/-}$ (Figura 4C), así como en ratones p19 $^{-/-}$, (Figura 16) tras la inoculación de *C. rodentium*. RegIII β y RegIII γ pertenecen a una familia de proteínas de lectina de tipo C secretadas. Los inventores encontraron que otros miembros de la familia, incluidos RegI, RegII, RegIII α y RegIII δ (Figura 17), pero no RegIV (datos no mostrados), también estaban regulados por aumento en colon infectados por *C. rodentium* y que su inducción fue completamente abolida en ratones IL-22 $^{-/-}$. La proteína de fusión RegIII γ exógena de ratón (rmRegIII γ) protegió significativamente a los ratones IL-22 $^{-/-}$ frente a la pérdida de peso inducida por el infección por *C. rodentium*, y aproximadamente el 50 % de los animales tratados con la proteína de fusión rmRegIII γ sobrevivieron a la infección, mientras que el 100 % de los ratones IL-22 $^{-/-}$ tratados con el control estaban agonizantes o murieron (Figura 14A). Estos datos apoyan la hipótesis de que las proteínas de la familia Reg, tal como RegIII γ , median en las funciones esenciales para controlar la infección por *C. rodentium* cadena abajo de IL-22.

Finalmente, la presencia del eje IL-23/IL-22/Reg también se validó en un sistema humano. La IL-23 humana induce la producción de hIL-22 a partir de las CD humanas (Figura 14B). Las células epiteliales colónicas humanas primarias (figura 12B) y las líneas celulares epiteliales de colon humano, HT29 y HCT15, expresan IL-22R (Fig. 14C). In vitro, las células epiteliales colónicas humanas primarias crecieron lentamente y gradualmente perdieron su expresión de IL-22R durante la expansión (datos no mostrados). Por lo tanto, los inventores utilizaron líneas de células epiteliales de colon para evaluar su respuesta a la IL-22 humana. La IL-22 indujo la activación de STAT3 en estas líneas de células epiteliales de colon (Figura 14D), y tanto RegIII β como RegIII γ se indujeron

significativamente por IL-22 (Figura 14E). De manera importante, la proteína de fusión RegIII γ humana (rhRegIII γ), como la proteína de fusión rmRegIII γ , también redujo la mortalidad de los ratones IL-22 $^{-/-}$, al 40 % tras la infección por *C. rodentium*, frente al 100 % de mortalidad en los ratones IL-22 $^{-/-}$ tratados con control (Figura 18). En conclusión, los datos de los inventores implican que la ruta de IL-22 puede desempeñar un papel esencial en el control de infecciones bacterianas, particularmente infecciones bacterianas A/E, en el tracto GI humano.

Sumario

Los presentes inventores demuestran en el presente documento que la IL-22 desempeña un papel indispensable en la defensa temprana del huésped contra los patógenos bacterianos de unión y borrado (A/E).

Los datos en el presente documento indican que IL-22 protege la integridad de la barrera epitelial intestinal y evita la invasión bacteriana con propagación sistémica a través de dos mecanismos. En primer lugar, la IL-22 está implicada en la obtención de las primeras respuestas de IgG antibacterianas. En segundo lugar, la IL-22 es indispensable para la inducción de lectinas antimicrobianas, tales como RegIII β y RegIII γ , de las células epiteliales colónicas durante la infección bacteriana. La falta de uno o ambos de estos mecanismos puede contribuir a la respuesta de defensa del huésped comprometida con una mayor diseminación sistémica y mortalidad en ratones IL-22 $^{-/-}$ durante la infección por *C. rodentium*.

Mientras que las respuestas inmunes adaptativas son esenciales para la eliminación de estos patógenos (L. Bry, M. B. Brenner, J Immunol 172, 433 (January 1, 2004)), las citocinas, tales como IL-22, que son producidas por las células inmunitarias durante las primeras etapas de la infección son necesarias también para que las células epiteliales intestinales obtengan una respuesta antimicrobiana completa y una respuesta de curación de heridas para prevenir la invasión sistémica de microbios patogénicos en el huésped. Como se muestra en el presente documento, la inducción de RegIII β y RegIII γ también indica que IL-22 puede tener funciones más amplias en el control de diversas infecciones bacterianas. Los datos apoyan además el papel de los linfocitos Th17 y sus citocinas efectoras en enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes. Finalmente, los estudios del presente documento indican que la IL-22 y sus productos cadena abajo, tales como RegIII β y RegIII γ , pueden ser beneficiosos para el tratamiento de ciertas enfermedades infecciosas.

Materiales y Métodos

Ratones

Los ratones C57B1/6, IL-12p40 $^{-/-}$ y IL-6 $^{-/-}$ se adquirieron en el the Jackson Laboratory. Los ratones IL-22 $^{-/-}$ e IL-12p19 $^{-/-}$ se generaron como se ha descrito anteriormente (11, Fig.5). Los ratones IL-17RC $^{-/-}$ e IL-20R β $^{-/-}$ fueron generados por Lexicon Pharmaceuticals (The Woodlands, TX) usando las estrategias como se han descrito (Fig.5 y Fig.8). En resumen, se prepararon ratones defectivos mediante recombinación homóloga estándar usando vectores de direccionamiento representados. Los vectores de direccionamiento se sometieron a electroporación en células ES de la cepa 129 y se identifican clones diana. Los clones diana se microinyectan en los blastocistos del huésped para producir quimeras. Las quimeras se reproducen con animales C57B1/6 para producir heterocigotos F1. Los heterocigotos se entrecruzan para producir cohortes de F2 de tipo silvestre, heterocigotos y homocigotos. Los ratones utilizados en estos estudios se genotiparon mediante ADN de cola mediante PCR usando un conjunto de tres cebadores. Los cebadores utilizados para la amplificación de alelos de tipo silvestre de ratones IL-20R β $^{-/-}$ fueron 5'-GTG GAA GCT ACT TGA TGA GTA GGG-3' (p1) y 5'-AGA TGC GAA AAT GGA GAT TAA AAG-3' (p2), lo que produjo un producto de 595 pb. Los cebadores utilizados para la amplificación de alelos mutantes de ratones IL-20R β $^{-/-}$ fueron 5'-CTA CCC GTG ATA TTG CTG AAG AG-3' (p3) y p2, lo que produjo un producto de 351 pb. Los cebadores utilizados para la amplificación de alelos de tipo silvestre de ratones IL-17RC $^{-/-}$ fueron 5'-GAG CCT GAA GAA GCT GGA AA-3' (P3) y 5'-CAA GTG TTG GCA GAG ATG GA-3' (P2), lo que arrojó un producto de 534 bp. Los cebadores utilizados para la amplificación de alelos mutantes de ratones IL-IL-17RC $^{-/-}$ fueron 5'-CTA CCC GTG ATA TTG CTG AAG CT-3' (P1) y P2, lo que produjo un producto de 404 pb.

Cepas de bacterias e infección de ratones

Se sometió a ratones de 6-8 semanas de edad a ayunas durante 8 horas antes de la inoculación oral de 2×10^9 de *C. rodentium*, cepa DBS100 (ATCC 51459; Colección Americana de Cultivos Tipo) en un volumen total de 200 μ l por ratón. Durante el ayuno, los animales tenían acceso al agua. La inoculación y todas las manipulaciones posteriores se llevaron a cabo en campanas de bioseguridad BL-2. Se permitió el acceso de los animales a los alimentos después de la inoculación. Las bacterias se prepararon mediante incubación con agitación a 37 °C durante la noche en caldo LB. La concentración relativa de bacterias se evaluó midiendo la absorbancia a DO₆₀₀ y cada cultivo de inoculación se diluyó en serie y se sembró en placa para confirmar la administración de UFC.

Recolección de tejido, histología y recuentos de UFC

Se inoculó a los ratones control o infectados como se ha descrito. Se extrajeron muestras de sangre entera, bazo, hígado, ganglio linfático mesentérico y colon en condiciones asépticas. El colon se diseccionó en el canal anal y la

pieza terminal de 0,5 cm se usó para el análisis de UFC. Los segmentos proximales se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 %. Las secciones se tiñeron con H & E para evaluar la patología tisular. El bazo, el hígado, el ganglio linfático mesentérico y el colon se pesaron y se homogeneizaron. Los homogeneizados se diluyeron en serie y se sembraron en placas por triplicado en agar MacConkey (Remel). Las colonias de *C. rodentium* se identificaron como colonias rosas. Las colonias se contaron después de 24 horas de incubación a 37 °C para determinar el log₁₀ de UFC por gramo de tejidos.

Aislamiento de ARN y RT-PCR en tiempo real

El ARN celular y tisular se aisló mediante RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La RT-PCR en tiempo real se realizó en un sistema de PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) con cebadores y sondas usando reactivos de la mezcla maestra de RT-PCR TaqMan en una etapa (Applied Biosystems). Las secuencias de los cebadores y las sondas fueron las siguientes: mL-22, directo, 5'-TCC GAG GAG TCA GTG CTA AA-3', inverso, 5'-AGA ACG TCT TCC AGG GTG AA-3', y sonda, 5'-TGA GCA CCT GCT TCA TCA GGT AGC A-3' (FAM, TAMRA); mL-17A, directo, 5'-GCT CCA GAA GGC CCT CAG A-3', inverso, 5'-CTT TCC CTC CGC ATT GAC A-3', y sonda, 5'-ACC TCA ACC GTT CCA CGT CAC-3' (FAM, TAMRA); gen doméstico ribosómico de ratón RPL-19, directo, 5'-GCA TCC TCA TGG AGC ACA T-3', inverso, 5'-CTG GTC AGC CAG GAG CTT-3', and probe, 5'-CTT GCG GGC CTT GTC TGC CTT-3' (FAM, TAMRA); mL-19, directo, 5'-AGC CTG GAT TGA CAG GAA TC-3', inverso, 5'-GAT AAT CAG ACG AGG CGT TTC-3', y sonda, 5'-TCT GGA AAC TCC TGC AGC CTG ACA C-3' (FAM, TAMRA); mL-20, directo, 5'-TTT GGG AGA ACT AGG CAT TCT T-3', inverso, 5'-TCT TGG ACA GGA GTG TTC TCA-3', y sonda, 5'-CAG CCT CTC CAC TTT CAT CTA TAG CAT CTC C-3' (FAM, TAMRA); mL-24, directo, 5'-GCT CTC CAT GCC ATT TCA A-3', inverso, 5'-TGG CCA AGG GTC TGA AGT-3', y sonda, 5'-TGT ACA TCC CTG CTG TCC TCA AGG C-3' (FAM, TAMRA); mL-6, directo, 5'-TCC AAT GCT CTC CTA ACA GAT AAG-3', inverso, 5'-CAA GAT GAA TTG GAT GGT CTT G-3', y sonda, 5'-TCC TTA GCC ACT CCT TCT GTG ACT CCA-3' (FAM, TAMRA); mS100A8, directo, 5'-TGT CCT CAG TTT GTG CAG AAT ATA AA-3', inverso, 5'-TCA CCA TCG CAA GGA ACT CC-3', y sonda 5'-CGA AAA CTT GTT CAG AGA ATT GGA CAT CAA TAG TGA-3' (FAM, TAMRA); mS100A9, directo, 5'-GGT GGA AGC ACA GTT GGC A-3', inverso, 5'-GTG TCC AGG TCC TCC ATG ATC-3', y sonda, 5'-TGA AGA AAG AGA AGA GAA ATG AAG CCC TCA TAA ATG-3' (FAM, TAMRA); mRegIIly, directo, 5'-ATG GCT CCT ATT GCT ATG CC-3', inverso, 5'-GAT GTC CTG AGG GCC TCT T-3', y sonda, 5'-TGG CAG GCC ATA TCT GCA TCA TAC C-3' (FAM, TAMRA); mPAP/HIP/RegI-IIβ, directo, 5'-ATG GCT CCT ACT GCT ATG CC-3', inverso, 5'-GTG TCC TCC AGG CCT CTT T-3', y sonda, 5'-TGA TGC AGA ACT GGC CTG CCA-3' (FAM, TAMRA); mL-12p40, directo, 5'-ACA TCT ACC GAA GTC CAA TGC A-3', inverso, 5'-GGA ATT GTA ATA GCG ATC CTG AGC-3', y sonda, 5'-TGC ACG CAG ACA TTC CCG CCT-3' (FAM, TAMRA); mL-23p19, directo, 5'-GGT GGC TCA GGG AAA TGT-3', inverso, 5'-GAC AGA GCA GGC AGG TAC AG-3', y sonda, 5'-CAG ATG CAC AGT ACT CCA GAC AGC AGC-3' (FAM, TAMRA); mL-20Rβ, directo, 5'-CAG GTG CTT CCA GTC CGTCT-3', inverso, 5'-CTC TCC TGG AAT CCC CAA AGT-3', y sonda, 5'-CAG CAC AGA TGC CAA CGG CCT CAT-3' (FAM, TAMRA); mL-20Rα, directo, 5'-CTG GCC GCT TCG GGA CGC-3', inverso, 5'-AAC CAC AGA AGA CAC AAG GAA CTG-3', y sonda, 5'-TCT GCT GCT GGC CGC TTC GG-3' (FAM, TAMRA); mL-22R, directo, 5'-GCT GGA CTC CCT TGT GTG T-3', inverso, 5'-CAC ATG GCC TCA GTC TCA A-3', y sonda, 5'-CGC GGG ACC CTC ATC CTT TAG-3' (FAM, TAMRA); mL-10Rβ, directo, 5'-TCC ACA GCA CCT GAA GGA GTT-3', inverso, 5'-GGA GGG AAG GAG AAC AGC AGA-3', y sonda, 5'-TGG GCC ACC CCC ATC ACA GC-3' (FAM, TAMRA). Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado y las muestras se normalizaron al gen de mantenimiento RPL-19 y se informaron de acuerdo con el procedimiento $\Delta\Delta Ct$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{referencia}}$$

ELISA de Ig

Los análisis se realizaron en suero de sangre completa recolectada como se describió previamente (10). En resumen, las placas de ELISA (Nunc) se recubrieron con *C. rodentium* destruido con calor o con un Ab de captura de Ig antiratón de cabra diluido 1/1000 en PBS (SouthernBiotech). Las placas revestidas se lavaron en PBS más Tween 20 al 0,05 %, se bloquearon durante 1 hora con 300 µl de tampón de bloqueo (PBS + BSA al 0,5 % + Proclina 10) y se lavaron antes de la adición de patrones diluidos en serie (IgA, IgG, IgG3 e IgM monoclonal de ratón de SouthernBiotech; los isotipos de IgG1, IgG2a e IgG2b de Sigma-Aldrich; IgG2c de ratón obtenida de Bethyl laboratories) o desconocidos. Las muestras se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cinco veces y los isotipos Ig se detectaron con IgA, IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3 anti-ratón de cabra (SouthernBiotech) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), diluidos a 1/4.000 en diluyente de ensayo (PBS + 0,5 % de BSA + 0,05 % de Tween 20 + 10 PPM de Proclina, pH 7,4) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el lavado, se añadió sustrato de peroxidasa de TMB a cada pocillo y se dejó que se desarrollara durante 15 minutos, a continuación se añadió solución de parada (ácido fosfórico 1 M) a cada pocillo. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de Molecular Devices (Sunnyvale, CA) a DO₄₅₀.

Cultivo de colon in vitro

Los colon se extrajeron de ratones C57Bl/6. Después de limpiar con PBS frío, los dos puntos se cortaron longitudinalmente. Los colonos se colocaron en una placa de Petri de 100 mm con 10 ml de tampón HBSS

(Mediatech) que contenía 2,5 µg/ml de Fungizona-Anfotericina B, 10 µg/ml de gentamicina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (todos de GIBCO, Invitrogen). Los colon se rasparon suavemente para eliminar el moco en el borde de la placa de Petri y se transfirieron a una nueva placa de Petri con tampón HBSS recién preparado. Los colon se cortaron en trozos de 1-2 mm y se transfirieron a una placa de 24 pocillos con 50 mg de colon/1ml/pocillo en tampón RPMI que contenía 10% de FCS inactivado por calor (HyClone), 2,5 µg/ml de Fungizona-Anfotericina B, 10 µg/ml de gentamicina, L-glutamina 2 mM, 100 U /ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Se añadieron 10 µg/ml de IL - 22 (R & D systems) al cultivo y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Análisis de micromatrices

La cantidad y calidad de muestras de ARN total se determinó usando un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop Technologies) y Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), respectivamente. El procedimiento para la preparación de ARNc marcado con colorante Cy e hibridación de matriz fue proporcionado por Agilent Technologies. En resumen, la muestra de ARN total se convirtió en ADNc de doble hebra y a continuación en ARNc marcado con colorante Cy usando el kit de amplificación lineal fluorescente de bajo ARN de Agilent. El ARNc marcado se purificó usando el kit RNeasy mini kit (Qiagen). El rendimiento de ARNc y la incorporación de colorante Cy se determinaron usando el espectrofotómetro ND-1000. Se fragmentaron 750 ng del ARNc marcado y se hibridaron con la matriz del genoma del ratón entero de Agilent como se describe en el kit-plus de hibridación in situ del fabricante. Todas las muestras se marcaron con Cy5 y se hibridaron contra la referencia de ratón universal marcada con Cy3 (Stratagene). Después de la hibridación, las matrices se lavaron, se secaron y escanearon en el escáner de micromatrices ADN de Agilent. El software de extracción de Agilent 8.5 se utilizó para analizar imágenes de matriz adquiridas. Para la agrupación de datos de micromatrices (Figura 20), los datos de expresión se procesaron a datos de relación de log de Agilent por procedimientos estándar. Los genes seleccionados se agruparon mediante aglomeración iterativa de vectores más altamente vinculados por el coeficiente de correlación de Pearson, con datos para vectores aglomerados resumidos por la unión promedio.

Cultivo y estimulación de fibroblastos en la punta de la cola del ratón in vitro

Para establecer fibroblastos de la punta de la cola (TTF), se pelaron las colas de ratones IL-17RC^{-/-} adultos y de los compañeros de camada de tipo silvestre, se trituraron en trozos de 1 cm, se colocaron en placas de cultivo y se incubaron en DMEM rico en glucosa (que contenía FCS al 10 %, glutamina 2 mM, 100 U /ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina durante 5 días. Las células que migraron fuera de las piezas de injerto se transfirieron a placas nuevas (pase 2) y se mantuvieron en el mismo medio. Los inventores usaron TTF en el pase 3 para experimentos de estimulación. Los TTF se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1,2x10⁵ por pocillo. Veinticuatro horas después de la siembra, se añadieron IL-17A e IL-17F murinas recombinantes (R & D Systems) al medio de cultivo a diversas concentraciones. El sobrenadante del cultivo celular se recogió 24 horas después de la adición de citocinas y los niveles de IL-6 murina se midieron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) mediante un conjunto ELISA de IL-6 de ratón (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Bloqueo de IL-22 murina in vivo

Se inyectó por vía intraperitoneal mAb (11) IL-22 de bloqueo anti-ratón (Clon 8E11, IgG1 de isotipo de ratón) antes (día 0) u 8 días después (día 8) de la infección por *C. rodentium* a una dosis de 150 µg/ratón cada dos días. Cierta grupo de control también recibió el mAb de IgG1 de control de isotipo.

Estadística

La significancia estadística se calculó mediante ANOVA de una vía o de dos vías utilizando el software Prism (GraphPad). Todos los valores de $p \leq 0,05$ se consideran significativos, y están indicados en el texto. A menos que se especifique lo contrario, todos los estudios para los cuales se presentan datos son representativos de al menos dos experimentos independientes.

Aunque la invención anterior se ha descrito con algo de detalle a modo de ilustración y ejemplos a efectos de claridad de comprensión, no debe interpretarse que las descripciones y ejemplos limitan el ámbito de la invención.

Ejemplo 10: La ruta de LT está mediada por la IL-22 durante la infección por *Citrobacter rodentium*.

Para ayudar a determinar si la IL-22 es importante para la mortalidad causada por el bloqueo de LT, los inventores realizaron un experimento de rescate en el que expresaron la IL-22 en el ratón al mismo tiempo que el tratamiento con LTbR-Fc. El procedimiento que usaron para la expresión de IL-22 fue la administración hidrodinámica en la vena de la cola del ADN del plásmido que codifica la IL-22 de ratón. La LTbR-Ig humana se construyó de la siguiente manera: se clonó LTbR humana que abarca el dominio extracelular (posición 1 a la posición 224; SEQ ID NO:57) en un vector de expresión pRK5 modificado que codifica la región Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO:58) cadena abajo de la secuencia de LTbR. Las proteínas se sobreexpresaron en células CHO y se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína A. La LTbR.1g se construyó de la siguiente forma: LTbR murina que abarca el dominio extracelular (posición 1 a la posición 222; SEQ ID NO:59) se clonó en un vector de expresión pRK5 modificado que

codifica la región Fc de IgG2a murina (SEQ ID NO:60) cadena abajo de la secuencia de LTbR.

En la figura 21, los inventores encientran que LTbR-Fc produce una curva de pérdida de peso similar (Figura 21 panel derecho) y curva de muerte (Figura 21 panel izquierdo) al bloqueo IL-22 que les llevó a examinar la relación entre LT e IL-22. La infección por *C. rodentium* conduce a la expresión temprana de IL-22 en el colon.

La Figura 21 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones inoculados con *Citrobacter rodentium*. Se sometió a ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad a ayunas durante 8 horas antes de la inoculación oral de 2×10^9 de *C. rodentium*, cepa DBS100 (ATCC 51459; Colección Americana de Cultivos Tipo) en un volumen total de 200 μ l por ratón. Durante el ayuno, los animales tenían acceso al agua. La inoculación y todas las manipulaciones posteriores se llevaron a cabo en campanas de bioseguridad BL-2. Se permitió el acceso de los animales a los alimentos después de la inoculación. Las bacterias se prepararon mediante incubación con agitación a 37 °C durante la noche en caldo LB. La concentración relativa de bacterias se evaluó midiendo la absorbancia a DO₆₀₀ y cada cultivo de inoculación se diluyó en serie y se sembró en placa para confirmar la administración de UFC. El día de la inoculación, a los ratones también se les inyectaron 150 μ g de mAb anti-gp120, mAb anti-IL-22 8E11 o LTbR-Fc 3 veces por semana.

La ruta de LT regula múltiples aspectos cadena arriba que son importantes para la producción de IL-22. La Figura 22 proporciona datos sobre la ruta de LT después de la infección con *C. rodentium*. Los colon A, C, E. Colones se cosecharon en diferentes puntos de tiempo después de la infección con *C. rodentium*. Se inyectó a los ratones 150 μ g de anti-gp120 o LTbR-Fc cada dos días. El ARN se extrajo usando el kit Qiagen RNeasy. El análisis Taqman se realizó para determinar la expresión de IL-22, RegIIIg, p19, or p40 respecto al punto de tiempo del día 0. B. El día 4 después de la infección, se recogieron los colon. Después de limpiar con PBS frío, los colon se cortaron longitudinalmente. Los colon se colocaron en una placa de Petri de 100 mm con 10 ml de tampón HBSS (Mediatech) que contenía 2,5 μ g/ml de Fungizona-Anfotericina B, 10 μ g/ml de gentamicina, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin (todos de GIBCO, Invitrogen). Los colon se rasparon suavemente para eliminar el moco en el borde de la placa de Petri y se transfirieron a una nueva placa de Petri con tampón HBSS recién preparado. Los colon se cortaron en trozos de 1-2 mm y se transfirieron a una placa de 24 pocillos con 50 mg de colon/1 ml/pocillo en tampón RPMI que contenía 10 % de FCS inactivado por calor (HyClone), 2,5 μ g/ml de Fungizona-Anfotericina B, 10 μ g/ml de gentamicina, L-glutamina 2 mM, 100 U /ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Se añadieron 10 ng/ml de rmlL-22 (sistemas de R & D) al cultivo y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron para un ELISA de IL-22. D. Día 6 Células de la lámina propia de colon. CD determinadas por CD11c + y MHC II +. Los colon se cosecharon y enjuagaron con HBSS sin calcio y magnesio (Invitrogen) con 2 % de SFB y HEPES 10 mM. Los colon se cortaron longitudinalmente y a continuación se seccionaron en piezas de 2-4 cm, y las piezas se transfirieron a una placa de 10 cm con HBSS sin calcio y magnesio, FBS al 2 %, EDTA 1 mM, HEPES 10mM y DTT 1mM (Sigma-Aldrich). Las fracciones de IEL se recogieron y desecharon después de una incubación de 45 minutos a 37 °C mientras se agitaba a 200 rpm. Para el aislamiento de LPMC, la capa epitelial restante se retiró y las piezas de colon se cortaron en cubitos y se colocaron en RPMI que contenía FCS al 10 %, HEPES 20 mM y 0,5 mg/ml de colagenasa/dispasa (Roche Diagnostics). Las piezas de colon se incubaron durante una hora a 37 °C mientras se agitaba. Las células epiteliales aisladas se lavaron y se usaron para el análisis FACS.

En la figura 22, los inventores encontraron que LTbR-Fc bloqueaba la inducción de IL-22 así como RegIIIg, que se ha demostrado que es inducida por IL-22 (Figura 22A-C). Anteriormente se había demostrado que las células dendríticas producen IL-22 y los inventores encontraron una ligera reducción de los números de CD en la lámina propia del colon 6 días después de la infección (Figura 22D). La disminución de IL-22 causada por LTbR-Fc es muy probablemente debida a la pérdida de IL-23, ya que tanto la expresión de p19 como la de p40 se inhiben después del tratamiento con LTbR-Fc durante la infección (Figura 22E).

IL-22 rescata parcialmente los defectos observados en ratones tratados con LTbR. La Figura 23 proporciona datos relativos al efecto de IL-22 en ratones tratados con LTbR. A. Prueba de expresión de IL-22 en suero y RegIIIg en colon después de la inyección en la vena de la cola del plásmido IL-22. B. Rescate de los efectos de LTbR-Fc con el plásmido de IL-22.

El día -1, los animales se pesaron y se agruparon, los ratones extra se sacrificaron. Después del pesaje, todos los animales ayunaron 14 horas. A la mañana siguiente (día 0), todos los ratones fueron inoculados oralmente con $2-4 \times 10^9$ UFC de *C. rodentium* en 200 μ l de PBS. Se inyectó mAb de control de 150 μ g o proteína de fusión Fc i.p. en 200 μ l de PBS tres veces por semana durante dos semanas comenzando el mismo día que la inoculación de bacterias. La comida fue reemplazada por los investigadores después de la inoculación. Seis horas después, se inyectó ADN plasmídico por la vena de la cola. Experimentos de inyección en la vena de la cola: 1) Se diluyó la construcción de ADN (vector pRK o pRK-mIL-22) en Ringer a una concentración para producir una dosis final de 10 microgramos/ratón/inyección. 2) A cada ratón se inyectó por vía intravenosa en la vena de la cola con aproximadamente 1,6 ml de la solución que contenía ADN en Ringer. 3) Las dosis se administraron como una inyección intravenosa en embolada (vena de la cola) durante un período de 4-5 segundos (8 segundos máximo) para la captación máxima de ADN. Los ratones se mantuvieron sin anestesia en un dispositivo de contención acrílico cónico con un elemento de calentamiento para aumentar la temperatura corporal y dilatar los vasos sanguíneos. 4) Se usaron jeringas estériles desechables para cada animal. Los animales se monitorizaron continuamente hasta que

5 fueron clínicamente normales. 5) Se observaron animales para cualquier signo clínico adverso durante al menos 20 minutos después de la dosis. Si los animales no estaban clínicamente normales a la hora de la dosis, se les practicó la eutanasia o se les controló hasta que fueron clínicamente normales. Se sacrificó a los animales moribundos. Todas las manipulaciones se realizaron en campanas de bioseguridad BL-2. Durante la infección, se sacrificaron animales moribundos o aquellos que mostraban angustia no lograda o prolapso rectal.

10 Los ratones se monitorizaron durante 4 semanas todos los días. Entre el día 5 y el día 17, cuando los ratones tratados con LTbR-Fc podrían morir, los ratones se controlaron dos veces al día, los ratones se controlaron dos veces al día, incluidos los fines de semana. Los gránulos fecales se recolectaron cada semana para medir las UFC de *C. rodentium*. Los ratones se pesaron una vez por semana durante el estudio. Si los ratones exhibieron una pérdida de peso del 15 % o más, se pesaron diariamente. Si la pérdida de peso excede del 20 %, se sacrificó a los ratones. Al final del estudio, se sacrificaron todos los ratones y se repitieron las muestras de bazo, y colon para análisis histológico, ARNo FACS.

15 Tal como se muestra en la Figura 23A, los inventores pudieron detectar la expresión de IL-22 en el suero de ratón comenzando a las 2 horas después de la inyección, con la expresión disminuyendo a las 72 horas. Los inventores también pueden detectar la expresión de RegIIIg en el colon, lo que sugiere que la IL-22 activa puede actuar sobre el colon cuando se expresa de esta manera. La IL-22 podría rescatar parcialmente la mortalidad y la pérdida de peso inducida por el tratamiento con LTb-Fc durante la infección (Figura 23B).

20 **Tratamiento de ratones con mAb IL-22 (8E11).** La figura 24 representa datos que demuestran que el tratamiento con mAb anti-IL-22 8E11 conduce a la reducción de folículos de colon, a una organización de linfocitos B/T comprometida, y a un número reducido de células CD, linfocitos T y linfocitos B en el colon. A. Seis días después de la infección, se cosecharon los colon y se cortaron longitudinalmente. Después de una incubación de 30 minutos en HBSS sin calcio y magnesio, FBS al 2 %, EDTA 1 mM, 10mM HEPES y 1mM DTT, los colon se rasparon suavemente para eliminar las células epiteliales. Los folículos se identificaron como masas blancas redondas. Hubo cinco ratones por grupo y cada colon se contó y se representó como folículos totales encontrados o folículos totales mayores de 1 mm encontrados. B. Seis días después de la infección, los colon se lavaron con PBS frío y se congelaron rápidamente en OCT. Se cortaron secciones de seis micrómetros, se secaron, a continuación se fijaron en acetona. Las secciones se bloquearon con suero al 10 %, se incubaron con anti-CD5 FITC y anti-B220 APC a 10ug/ml cada una. Las imágenes se capturaron en un microscopio NIKON BX61. C. Seis días después de la infección, las células de la lámina propia del colon se aislaron como se describió anteriormente. El análisis FAC se realizó para determinar el número de células dendríticas, linfocitos T CD3 y linfocitos B después del tratamiento con 8E11.

35 Como se muestra en la Figura 24, se trató a los ratones con anticuerpo bloqueante de IL-22 o LTbR-Fc y se contaron folículos linfoides en el colon después de seis días después de la infección para determinar si IL-22 podría tener un papel en la formación de estructuras linfoides de colon. Los inventores encontraron una disminución en los folículos de más de 1 mm, lo que sugiere que IL-22 y LT podrían ser importantes para el aumento en el tamaño del folículo después de la infección (Figura 24A). El análisis histológico muestra que el bloqueo de IL-22 alteraba las zonas de linfocitos T y B del folículo, mientras que el bloqueo de LT tenía un efecto similar (Figura 24B). A continuación se determinó si el bloqueo de IL-22 conduce a un cambio en el número de células en la lámina propia del colon. Los inventores descubrieron que el bloqueo de IL-22 conducía a disminuciones de los recuentos de CD, linfocitos Y y linfocitos B durante la infección. En conclusión, la IL-22 parece ser importante para la formación de folículos linfoides y puede ser un componente importante de la vía linfotóxica en el colon.

Listado de secuencias

50 <110> GENENTECH, Inc.

<120> Composiciones y procedimientos para el tratamiento de trastornos microbianos

<130> SMW/FP6829519

55 <140> EP

<141> 07-11-2008

<150> EP08848478.7

<151> 07-11-2008

60 <150> PCT/US2008/082890

<151> 07-11-2008

<150> 60/986,170

65 <151> 07/11/2007

<150> 61/013,620
<151> 13/12/2007

5 <150> 61/015,620
<151> 20/12/2007

<160> 61

10 <210> 1
<211> 1131
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15 <400> 1

```

cattctgccc tcgagccac cggaacgaa agagaagctc tatctcccct 50
ccaggagccc agctatgaac tccttctcca caagcgctt cggtcagtt 100
gccttctccc tggggtgct cctgggtgtg cctgctgctt tccctgcccc 150
agtaccccc ggagaagatt ccaaagatgt agccgcccc cacagacagc 200
cactcacctc ttcagaacga attgacaaac aaattcggta catcctcgac 250
ggcatctcag ccctgagaaa ggagacatgt aacaagagta acatgtgtga 300
aagcagcaaa gaggcactgg cagaaaacaa cctgaacctt ccaaagatgg 350
ctgaaaaaga tggatgcttc caatctggat tcaatgagga gacttgctg 400
gtgaaaatca tcaactggtc tttggagttt gaggtatacc tagagtacct 450
ccagaacaga tttgagagta gtgaggaaca agccagagct gtgcagatga 500
gtacaaaagt cctgatccag ttcctgcaga aaaaggcaaa gaatctagat 550
gcaataacca cccctgacct aaccacaaat gccagcctgc tgacgaagct 600
gcaggcacag aaccagtggc tgcaggacat gacaactcat ctattctgc 650
gcagctttaa ggagttcctg cagtccagcc tgagggtctc tcggcaaatg 700
tagcatgggc acctcagatt gttgttgta atgggcattc cttcttctg 750
tcagaaacct gtccactggg cacagaactt atgttgttct ctatggagaa 800

ctaaaagtat gagcgtagg acactatatt aattattttt aatttattaa 850
tatttaaata tgtgaagctg agttaattta tgtaagtcac atttatattt 900
ttaagaagta ccacttgaaa cattttatgt attagttttg aaataataat 950
ggaaagtggc tatgcagttt gaatatcctt tgtttcagag ccagatcatt 1000
tcttggaag tgtaggctta cctcaataa atggctaact tatacatatt 1050
tttaaagaaa tatttatatt gtatttatat aatgtataaa tggtttttat 1100
accaataaat ggcattttta aaaattcagc a 1131

```

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

5

<400> 2

```

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser
 1           5           10           15

Leu Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val
          20           25           30

Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln
          35           40           45

Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile
          50           55           60

Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser
          65           70           75

Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu
          80           85           90

Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly
          95          100          105

Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu
          110          115          120

Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser
          125          130          135

Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu
          140          145          150

Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr
          155          160          165

Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln
          170          175          180

Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu
          185          190          195

Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg
          200          205          210

Gln Met

```

10 <210> 3
 <211> 2347
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 3

ctgtttcagg gccattggac tctccgtcct gccagagca agatgtgtca 50
 ccagcagttg gtcattctctt ggttttccct ggtttttctg gcatctcccc 100
 tcgtggccat atgggaactg aagaaagatg tttatgtcgt agaattggat 150
 tggatatccg atgcccctgg agaaatggtg gtcttcacct gtgacacccc 200
 tgaagaagat ggtatcacct ggaccttggg ccagagcagt gaggtcttag 250
 gctctggcaa aaccctgacc atccaagtca aagagttttg agatgctggc 300
 cagtacacct gtcacaaagg aggcgaggtt ctaagccatt cgctcctgct 350
 gcttcacaaa aaggaagatg gaatttggtc cactgatatt ttaaaggacc 400
 agaaagaacc caaaaataag acctttctaa gatgcgaggc caagaattat 450
 tctggacgtt tcacctgctg gtggctgacg acaatcagta ctgatttgac 500
 attcagtgct aaaagcagca gaggtctctt tgacccccaa ggggtgacgt 550
 gcggagctgc tacactctct gcagagagag tcagagggga caacaaggag 600
 tatgagtact cagtggagtg ccaggaggac agtgccctgcc cagctgctga 650
 ggagagtctg ccatttgagg tcatgggtga tgccgttcac aagctcaagt 700
 atgaaaacta caccagcagc ttcttcatca gggacatcat caaacctgac 750
 ccaccaaga acttgacgct gaagccatta aagaattctc ggcaggtgga 800
 ggtcagctgg gagtaccctg acacctggag tactccacat tcctacttct 850
 ccctgacatt ctgcgttcag gtccagggca agagcaagag agaaaagaaa 900
 gatagagtct tcacggacaa gacctcagcc acggctcatct gccgcaaaaa 950
 tgccagcatt agcgtgcggg ccaggagccg ctactatagc tcattcttga 1000
 gcgaatgggc atctgtgccc tgcagttagg ttctgatcca ggatgaaaat 1050
 ttggaggaaa agtggaagat attaagcaaa atgttttaaag acacaacgga 1100
 atagacccaa aaagataatt tctatctgat ttgctttaaa acgttttttt 1150
 aggatcacia tgatatcttt gctgtatttg tatagttaga tgctaaatgc 1200
 tcattgaaac aatcagctaa tttatgtata gatcttccag ctctcaagtt 1250
 gccatgggccc ttcattgctat ttaaataatt aagtaattta tgtatttatt 1300
 agtatattac tgttatttaa cgtttgtctg ccaggatgta tggaatgttt 1350
 catactctta tgacctgac catcaggatc agtccctatt atgcaaaatg 1400
 tgaatttaat tttatttgta ctgacaactt ttcaagcaag gctgcaagta 1450

```

catcagtttt atgacaatca ggaagaatgc agtgttctga taccagtgcc 1500
atcatacact tgtgatggat gggaacgcaa gagatactta catggaaacc 1550
tgacaatgca aacctgttga gaagatccag gagaacaaga tgctagtcc 1600
catgtctgtg aagacttcct ggagatggtg ttgataaagc aatttagggc 1650
cacttacact tctaagcaag tttaatcttt ggatgcctga attttaaaag 1700
ggctagaaaa aaatgattga ccagcctggg aaacataaca agaccccgctc 1750
tctacaaaaa aaatttaaaa ttagccaggc gtggtggctc atgcttgtgg 1800
tcccagctgt tcaggaggat gaggcaggag gatctcttga gcccaggagg 1850
tcaaggctat ggtgagccgt gattgtgcc a ctgcatacca gcctaggtga 1900
cagaatgaga ccctgtctca aaaaaaaaaa tgattgaaat taaaattcag 1950
ctttagcttc catggcagtc ctcaccccca cctctctaaa agacacagga 2000
ggatgacaca gaaacaccgt aagtgtctgg aaggcaaaaa gatcttaaga 2050
ttcaagagag aggacaagta gttatggcta aggacatgaa attgtcagaa 2100
tggcagggtg cttcttaaca gccctgtgag aagcagacag atgcaaagaa 2150
aatctggaat ccctttctca ttagcatgaa tgaacctgat acacaattat 2200
gaccagaaaa tatggctcca tgaagggtgct acttttaagt aatgtatgtg 2250
cgctctgtaa agtgattaca tttgtttcct gtttgtttat ttatttat 2300
atttttgcat tctgaggctg aactaataaa aactcttctt tgtaatc 2347

```

<210> 4
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 662 845 T3

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

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

<210> 5
 <211> 1145
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 5

```

attctctccc cagcttgctg agccctttgc tcccctggcg actgcctgga 50
cagtcagcaa ggaattgtct cccagtgcac tttgcctcc tggctgcaa 100
ctctggctgc taaagcggct gccacctgct gcagtctaca cagcttcggg 150
aagaggaaag gaacctcaga ccttcagat cgcttcctct cgcaacaaac 200
tatttgctgc aggaataaag atggctgctg aaccagtaga agacaattgc 250
atcaactttg tggcaatgaa atttattgac aatacgcttt actttatagc 300
tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggcaag cttgaatcta 350
aattatcagt cataagaaat ttgaatgacc aagttctctt cattgaccaa 400

ggaaatcggc ctctatttga agatatgact gattctgact gtagagataa 450
tgcaccccg g accatattta ttataagtat gtataaagat agccagccta 500
gaggtatggc tgtaactatc tctgtgaagt gtgagaaaat ttcaactctc 550
tctgtgaga acaaaattat ttcotttaag gaaatgaatc ctctgataa 600
catcaaggat acaaaaagtg acatcatatt ctttcagaga agtgtcccag 650
gacatgataa taagatgcaa tttgaatctt catcatacga aggatacttt 700
ctagcttggtg aaaaagagag agaccttttt aaactcattt tgaaaaaaga 750
ggatgaattg ggggatagat ctataatgtt cactgttcaa aacgaagact 800
agctattaaa atttcatgcc gggcgcagtg gctcacgcct gtaatcccag 850
ccctttggga ggctgaggcg ggcagatcac cagaggtcag gtgttcaaga 900
ccagcctgac caacatggtg aaacctcatc tctactaaaa atacaaaaaa 950
ttagctgagt gtagtgacgc atgcctcaa tcccagctac tcaagaggct 1000
gaggcaggag aatcacttgc actccggagg tagaggttgt ggtgagccga 1050
gattgcacca ttgcgctcta gcctgggcaa caacagcaaa actccatctc 1100
aaaaaataaa ataaataaat aaacaaataa aaaattcata atgtg 1145

```

<210> 6
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

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

<210> 7
 <211> 1147
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7

cgaccagggtt ctccctccccc agtcaccagt tgcctcgagtt agaattgtct 50
gcaatggccg cccctgcagaa atctgtgagc tctttcotta tggggaccct 100
ggccaccagc tgccctccttc tcttggccct cttggtacag ggaggagcag 150
ctgcgcccac cagctccac tgcaggcttg acaagtccaa cttccagcag 200
ccctatatca ccaaccgcac cttcatgctg gctaaggagg ctagcttggc 250
tgataacaac acagacgttc gtctcattgg ggagaaactg ttccacggag 300
tcagtatgag tgagcgctgc tatctgatga agcaggtgct gaacttcacc 350
cttgaagaag tgctgttccc tcaatctgat aggttccagc cttatatgca 400
ggaggtggtg cccttcctgg ccaggctcag caacaggcta agcacatgtc 450
atattgaagg tgatgacctg catatccaga ggaatgtgca aaagctgaag 500
gacacagtga aaaagcttgg agagagtgga gagatcaaag caattggaga 550
actggatttg ctgtttatgt ctctgagaaa tgccctgcatt tgaccagagc 600
aaagctgaaa aatgaataac taacccccct tccctgctag aaataacaat 650
tagatgcccc aaagcgattt tttttaacca aaaggaagat gggaagccaa 700
actccatcat gatgggtgga ttccaaatga acccctgcgt tagttacaaa 750
ggaaaccaat gccacttttg tttataagac cagaaggtag acttttctaag 800
catagatatt tattgataac atttcattgt aactggtggt ctatacacag 850
aaaacaattt atttttttaa taattgtctt ttccataaa aaagattact 900
ttccattcct ttaggggaaa aaacccctaa atagcttcat gtttccataa 950
tcagtacttt atatttataa atgtatttat tattattata agactgcatt 1000
ttatttatat cattttatta atatggattt atttatagaa acatcattcg 1050
atattgctac ttgagtgtaa ggctaataat gatatttatg acaataatta 1100
tagagctata acatgtttat ttgacctcaa taaacacttg gatatcc 1147

<210> 8
<211> 179
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

5

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

<210> 9
 <211> 1049
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

```

aaaacaacag gaagcagctt acaaactcgg tgaacaactg aggggaaccaa 50
accagagacg cgctgaacag agagaatcag gotcaaagca agtggaagtg 100
ggcagagatt ccaccaggac tgggtgcaagg cgcagagcca gccagatttg 150
agaagaaggc aaaaagatgc tggggagcag agctgtaatg ctgctgttgc 200
tgctgccctg gacagctcag ggcagagctg tgccctggggg cagcagccct 250
gcctggactc agtgccagca gctttcacag aagctctgca cactggcctg 300
gagtgcacat ccactagtgg gacacatgga tctaagagaa gagggagatg 350
aagagactac aaatgatgtt ccccatatcc agtgttgaga tggctgtgac 400
ccccaaggac tcagggacaa cagtcagttc tgcttgcaaa ggatccacca 450
gggtctgatt ttttatgaga agctgctagg atcggatatt ttcacagggg 500
    
```

```

agccttctct gctccctgat agccctgtgg gccagcttca tgcctcccta 550
ctgggcctca gccaaactcct gcagcctgag ggtcaccact gggagactca 600
gcagattcca agcctcagtc ccagccagcc atggcagcgt ctcccttctcc 650
gcttcaaaaat ccttcgcagc ctccaggcct ttgtggetgt agccgcccgg 700
gtctttgccc atggagcagc aaccctgagt ccctaaaggc agcagctcaa 750
ggatggcact cagatctcca tggcccagca aggccaagat aaatctacca 800
ccccaggcac ctgtgagcca acagggttaat tagtccatta attttagtgg 850
gacctgcata tggtgaaaat taccaatact gactgacatg tgatgctgac 900
ctatgataag gttgagtatt tattagatgg gaagggaaat ttggggatta 950
tttatectcc tggggacagt ttggggagga ttatttattg tatttatatt 1000
gaattatgta cttttttcaa taaagtotta tttttgtggc taaaaaaaa 1049

```

<210> 10
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

5

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

185

5
 <210> 11
 <211> 808
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

gatataaagc tectacagct acctggcctg agaagccaac tcagactcag 50
ccaacagaga ttgttgattt gcctcttaag caagagattc attgcagctc 100
agcatggctc agaccagctc atacttcacg ctgatctcct gcctgatgtt 150
tctgtctcag agccaaggcc aagaggccca gacagagttg ccccaggccc 200
ggatcagctg cccagaaggc accaatgcct atcgctccta ctgctactac 250
tttaatgaag accgtgagac ctgggttgat gcagatctct attgccagaa 300
catgaattcg ggcaacctgg tgtctgtgct caccagggc gaggggtgcct 350
ttgtggcctc actgattaag gagagtggca ctgatgactt caatgtctgg 400
attggcctcc atgaccccaa aaagaacgcg cgtggcact ggagcagtg 450
gtccctggtc tctacaagt cctggggcat tggagcccca agcagtgtta 500
atcctggcta ctgtgtgagc ctgacctcaa gcacaggatt ccagaaatgg 550
aaggatgtgc cttgtgaaga caagttctcc tttgtctgca agttcaaaaa 600
ctagaggcaa ctggaaaata catgtctaga actgatccag caattacaac 650
ggagtcaaaa attaaaccgg accatctctc caactcaact caacctggac 700
actctcttct ctgctgagtt tgccttgta atcttcaata gttttaccta 750
ccccagtctt tggaacccta aataataaaa ataaacatgt ttccactatt 800
gtgctgtc 808

<210> 12
<211> 166
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12

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

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

Asn

<210> 13
 <211> 773
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

```

aagccacctc aagtggacaa ggcacttacc aacagagatt gctgatttgc 50
tccttaagca agagattcac tgccgctaag catggctcag accaactcgt 100
tcttcattgt gatctctctc ctgatgttcc tgtctctgag ccaaggccag 150
gagtcaccaga cagagctgcc taatccccga atcagctgcc cagaaggcac 200
caatgcctat cgctctact gctactactt taatgaagac cctgagacct 250
gggttgatgc agatctctat tgccagaaca tgaattcagg caacctggtg 300
tctgtgtcga cccaggcgga ggggtgccttc gtggcctcac tgattaagga 350
gagtagcact gatgacagca atgtctggat tggcctccat gacccaaaaa 400
agaaccgccg ctggcactgg agtagtgggt ccctgggtctc ctacaagtcc 450
tgggacactg gatccccgag cagtgtctaat gctggctact gtgcaagcct 500
gacttcattg tcaggattca agaaatggaa ggatgaatct tgtgagaaga 550
agttctcctt tgtttgcaag ttcaaaaact agaggaagct gaaaaatgga 600
tgtctagaac tggctctgca attactatga agtcaaaaat taaactagac 650
tatgtctcca actcagttca gaccatctcc tccctaataa gtttgcattc 700
ctgatcttca gtaccttcac ctgtctcagt ctctagagcc ctgaaaaata 750
aaaacaaact tattttttatc cag 773
    
```

<210> 14
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

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

Asn

<210> 15
 <211> 807
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

5

```

aaaccataacc atatcccacc agagagtgac tectgattgc ctccctcaagt 50
cgagacact atgctgcctc ccatggccct gccagtgta tcttgatgc 100
tgctttctcg cctcatgctg ctgtctcagg ttcaagggtga agaaccaccag 150
agggaactgc cctctgcacg gatccgctgt cccaaaggct ccaaggccta 200
tggctccac tgctatgctt tgtttttgc accaaaatcc tggacagatg 250
cagatctggc ctgccagaag cggccctctg gaaacctggg gtctgtgctc 300
agtggggctg agggatcctt cgtgtcctcc ctgggtgaaga gcattggtaa 350
cagctactca tacgtctgga ttgggtccca tgacccaca cagggcaccg 400
agcccaatgg agaagggttg gagtggagta gcagtgatgt gatgaattac 450
tttgcatggg agagaaatcc ctccaccatc tcaagccccg gccactgtgc 500
gagcctgtcg agaagcacag catttctgag gtggaaagat tataactgta 550
atgtgaggtt accctatgtc tgcaagtcca ctgactagtg caggagggaa 600
gtcagcagcc tgtgtttggg gtgcaactca tcatgggcat gagaccagtg 650

tgaggactca ccctggaaga gaatattcgc ttaattcccc caacctgacc 700
acctcattct tatctttctt ctgtttcttc ctccccctg tcatttcagt 750
ctcttcattt tgtcatacgg cctaaggctt taaagagcaa taaaattttt 800
agtctgc .807

```

5 <210> 16
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

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

<210> 17
 <211> 784
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

```

aaaccatacc atatcccacc agagagtcgc agacactatg ctgcctccca 50
tggccctgcc cagtgtatct tggatgctgc tttcctgcct catgctgctg 100
tctcaggttc aaggtgaaga accccagagg gaactgcct ctgcacggat 150
ccgctgtccc aaaggtcca aggcctatgg ctcccactgc tatgccttgt 200

```

```

ttttgtcacc aaaatcctgg acagatgcag atctggcctg ccagaagcgg 250
ccctctggaa acctggtgtc tgtgctcagt ggggctgagg gatccttctg 300
gtcctccctg gtgaagagca ttggtaacag ctactcatat gtctggattg 350
ggctccatga ccccacacag ggcacogagc ccaatggaga aggttgggag 400
tggagtagca gtgatgtgat gaattacttt gcatgggaga gaaatccctc 450
caccatctca agccccggcc actgtgcgag cctgtcgaga agcacagcat 500
ttctgagggtg gaaagattat aactgtaatg tgagggtacc ctatgtctgc 550
aagttcactg actagtgcag gaggggaagtc agcagcctgt gtttgggtgtg 600
caactcatca tgggcatgag accagtgtga ggactcacc tggaagagaa 650
tattcgctta attccccaa cctgaccacc tcattcttat ctttcttctg 700
tttcttcctc cccgctgtca tttcagtctc ttcattttgt catacggcct 750
aaggctttaa agagcaataa aatttttagt ctgc 784

```

<210> 18
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 18

5

ES 2 662 845 T3

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

<210> 19
 <211> 1002
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 19

5

```

gggaggggtcc cttcctcagg gagcacagga actctgagac tcagcaaggg 50
tgtcctggga gggctcgggg atgggagagt acacagattc acaactcatt 100
cagaactgta gaagatgatg gatgtgacca agatcacttt agtcctaggg 150
gactagagaa ggaaaatgac atgaggcagt ggggtatctg tgtgttctcc 200
cactgaccac gctttcttta gtgactcctg attgcctcct caagtgcag 250
acactatgct gcctcccatg gccctgccca gtgtatcttg gatgctgctt 300
tctgcctca tgctgctgtc tcaggttcaa ggtgaagaac cccagagggg 350
actgccctct gcacggatcc gctgtcccaa aggcctccaag gcctatggct 400
cccactgcta tgccttgttt ttgtcaccaa aatcctggac agatgcagat 450
ctggcctgcc agaagcggcc ctctggaaac ctggtgtctg tgctcagtgg 500
ggctgagggg tccttcgtgt cctcctcgtt gaagagcatt ggtaacagct 550
actcatacgt ctggattggg ctccatgacc ccacacaggg caccgagccc 600
aatggagaag gttgggagtg gagtagcagt gatgtgatga attactttgc 650
atgggagaga aatccctcca ccatctcaag ccccgccac tgtgcgagcc 700
tgtcgagaag cacagcattt ctgaggtgga aagattataa ctgtaatgtg 750
aggttaccct atgtctgcaa gttcactgac tagtgcagga gggagtcag 800
cagcctgtgt ttggtgtgca actcatcatg gccatgagac cagtgtgagg 850
actcacctg gaagagaata ttgccttaat tcccccaacc tgaccacctc 900
attcttatct ttcttctgtt tcttcctccc cgctgtcatt tcagttctct 950
cattttgtca tacggcctaa ggcttttaaag agcaataaaa tttttagtct 1000
gc 1002

```

<210> 20
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

```

Met Leu Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu
 1               5               10               15

Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln Val Gln Gly Glu Glu Pro Gln
                20                25                30

Arg Glu Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro Lys Gly Ser Lys
                35                40                45

Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser

```

ES 2 662 845 T3

				50					55					60
Trp	Thr	Asp	Ala	Asp	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Asn
				65					70					75
Leu	Val	Ser	Val	Leu	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Ser	Phe	Val	Ser	Ser
				80					85					90
Leu	Val	Lys	Ser	Ile	Gly	Asn	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Val	Trp	Ile	Gly
				95					100					105
Leu	His	Asp	Pro	Thr	Gln	Gly	Thr	Glu	Pro	Asn	Gly	Glu	Gly	Trp
				110					115					120
Glu	Trp	Ser	Ser	Ser	Asp	Val	Met	Asn	Tyr	Phe	Ala	Trp	Glu	Arg
				125					130					135
Asn	Pro	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Pro	Gly	His	Cys	Ala	Ser	Leu	Ser
				140					145					150
Arg	Ser	Thr	Ala	Phe	Leu	Arg	Trp	Lys	Asp	Tyr	Asn	Cys	Asn	Val
				155					160					165
Arg	Leu	Pro	Tyr	Val	Cys	Lys	Phe	Thr	Asp					
				170					175					

<210> 21
 <211> 847
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 21

```

ccatccctga gatcttttta taaaaaaccc agtctttgct gaccagacaa 50
agcataccag atctcaccag agagtgcgag acactatgct gcctcccatg 100
gccctgcccga gtgtgtcctg gatgctgctt tcctgectca ttctcctgtg 150
tcagggttcaa ggtgaagaaa ccagaagga actgccctct ccacggatca 200
gctgtcccaa aggotccaag gcctatggct cccctgcta tgccttggtt 250
ttgtcaccaa aatcctggat ggatgcagat ctggcttgcc agaagcggcc 300
ctctggaaaa ctggtgtctg tgctcagtgg ggctgaggga tccttcgtgt 350
cctccctggt gaggagcatt agtaacagct attcatacat ctggattggg 400
ctccatgacc ccacacaggg ctctgagcct gatggagatg gatgggagtg 450
gagtagcact gatgtgatga attactttgc atgggagaaa aatccctcca 500
ccatcttaaa ccttggccac tgtgggagcc tgtcaagaag cacaggattt 550
ctgaagtggg aagattataa ctgtgatgca aagttaccct atgtctgcaa 600
gttcaaggac tagggcaggt ggggaagtcag cagcctgagc ttggcgtgca 650
gctcatcatg gacatgagac cagtgtgaag actcaccttg gaagagaata 700
ttctcccaa actgccctac ctgactacct tgcatgatc ctcttcttt 750
ttcttttttc ttcaccttca tttcaggctt ttctctgtct tccatgtctt 800
gagatctcag agaataataa taaaaatgtt actttatact taaaaaa 847

```

<210> 22
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 22

5

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

<210> 23
 <211> 947
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 23

```
ccatccctga gatcttttta taaaaaaccc agtctttgct gaccagacaa 50
agcataccag atctcaccag agagtcctag gggactacag aaggaaaaag 100
acaagaggca gtaggatatc tgtgtgtcct cccgctgacc acacttcctt 150
tagtgacccg attgcctcct caagtgcag acactatgct gcctcccatg 200
gccctgcccc gtgtgtcctg gatgctgctt tctgcctca ttctcctgtg 250
tcagggttcaa ggtgaagaaa ccagaagga actgccctct ccacggatca 300
gctgtcccaa aggtccaag gcctatggt cccctgcta tgccttgttt 350
ttgtcaccaa aatcctggat ggatgcagat ctggcttgcc agaagcggcc 400
```

```

ctctggaaaa ctggtgtctg tgctcagtg ggctgagggg tcttctgtgt 450
cctccctggt gaggagcatt agtaacagct attcatacat ctggattggg 500
ctccatgacc ccacacaggg ctctgagcct gatggagatg gatgggagtg 550
gagtagcact gatgtgatga attactttgc atgggagaaa aatccctoca 600
ccatcttaaa ccctggccac tgtgggagcc tgtcaagaag cacaggattt 650
ctgaagtgga aagattataa ctgtgatgca aagttaccct atgtctgcaa 700
gttcaaggac tagggcaggt ggaagtcag cagcctgagc ttggcgtgca 750
gctcatcatg gacatgagac cagtgtgaag actcaccctg gaagagaata 800
ttctcccaa actgccctac ctgactacct tgatcatgac ctcttctttt 850
ttcttttttc ttcaccttca tttcaggctt ttctctgtct tccatgtctt 900
gagatctcag agaataataa taaaatggt actttatagc taaaaaa 947

```

<210> 24
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

5

ES 2 662 845 T3

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

<210> 25
 <211> 1285
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 25

5

```

ataagacttt tatggatgga ttgtttttct caaataatat tatcgctttg 50
tgactaaagt aaagattatt aattcctgag gcaagaagat ataaaagctc 100
cagaaacggt gactgggacc actggagaca ctgaagaagg cagggggcct 150
tagagtcttg gttgccaaac agattttgcag atcaaggaga acccaggagt 200
ttcaaagaag cgctagtaag gtctctgaga tccttgcaact agctacatcc 250
tcagggtagg aggaagatgg cttccagaag catgcggtctg ctccatttgc 300
tgagctgcct ggccaaaaca ggagtcctgg gtgatatcat catgagaccc 350
agctgtgctc ctggatggtt ttaccacaag tccaattgct atggttactt 400
caggaagctg aggaactggt ctgatgccga gctcgagtgt cagtcttacg 450
gaaacggagc ccacctggca tctatcctga gtttaaagga agccagcacc 500
atagcagagt acataagtgg ctatcagaga agccagccga tatggatttg 550
cctgcacgac ccacagaaga ggcagcagtg gcagtggatt gatggggcca 600
tgtatctgta cagatcctgg tctggcaagt ccatgggtgg gaacaagcac 650
tgtgctgaga tgagctccaa taacaacttt ttaacttggg gcagcaacga 700
atgcaacaag cgccaacact tctgtgcaa gtaccgacca tagagcaaga 750
atcaagattc tgctaactcc tgcacagccc cgtcctcttc ctttctgcta 800
gcctggctaa atctgctcat tatttcagag gggaaaccta gcaaactaag 850
agtgataagg gccctactac actggctttt ttaggcttag agacagaaac 900
tttagcattg gcccagtagt ggcttctagc tctaaatggt tgccccgcca 950
tccctttcca cagtatcctt cttccctcct cccctgtctc tggctgtctc 1000
gagcagtcta gaagagtgca tctccagcct atgaaacagc tgggtctttg 1050
gccataagaa gtaaagattt gaagacagaa ggaagaaact caggagtaag 1100
cttctagacc ccttcagctt ctacaccctt ctgccctctc tccattgcct 1150
gcacccccacc ccagccactc aactcctgct tgtttttctt ttggccatag 1200
gaaggtttac cagtagaatc cttgctaggt tgatgtgggc catacattcc 1250
tttaataaac cattgtgtac ataagaaaaa aaaaa 1285

```

<210> 26
 <211> 158
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

Met	Ala	Ser	Arg	Ser	Met	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu
1				5				10					15

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

<210> 27
 <211> 1087
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 27

```

ccaagaacga tagtcaattc cagaaaccgc tatgaagttc ctctctgcaa 50
gagacttcca tccagttgcc ttcttgggac tgatgctggt gacaaccacg 100
gccttcoccta cttcacaagt ccggagagga gacttcacag aggataccac 150
tcccaacaga cctgtctata ccacttcaca agtcggaggc ttaattacac 200
atgttctctg ggaaatcgtg gaaatgagaa aagagttgtg caatggcaat 250
tctgattgta tgaacaacga tgatgcactt gcagaaaaca atctgaaact 300
tccagagata caaagaaatg atggatgcta ccaaactgga tataatcagg 350
aaatttgctt attgaaaatt tcctctgggc ttctggagta ccatagctac 400
ctggagtaca tgaagaacaa cttaaaagat aacaagaaag acaaagccag 450
agtccttcag agagatacag aaactctaatt tcatatcttc aaccaagagg 500
taaaagattt acataaaaata gtccttccta cccaatttc caatgctctc 550
ctaacagata agctggagtc acagaaggag tggctaagga ccaagaccat 600
ccaattcatc ttgaaatcac ttgaagaatt tctaaaagtc actttgagat 650
ctactcggca aacctagtgc gttatgccta agcatatcag tttgtggaca 700

ttcctcactg tggtcagaaa atatatcctg ttgtcaggta tctgacttat 750
gttgttctct acgaagaact gacaatatga atgttgggac actattttta 800
ttatttttta ttatttgata atttaaataa gtaaaactta agttaattta 850
tgattgatat ttattatttt tatgaagtgt cacttgaaat gttatatgtt 900
atagttttga aatgataacc taaaaatcta tttgatataa atattctggt 950
acctagccag atggtttctt ggaatgtata agtttacctc aatgaattgc 1000
taattttaa atgtttttta agaaatcttt gtgatgtatt ttataaatgt 1050
ttagactgtc ttcaaacaaa taaattatat tatattt 1087

```

<210> 28
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 28

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

Thr

<210> 29
 <211> 1951
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 29

agaaggaaca gtgggtgtcc aggcacatca gaccaggcag ctgcagcaa 50
 agcaaggtaa gttctctcct cttccctgtc gctaactccc tgcattctaga 100
 ggctgtccag attcagactc caggggacag gctacccttg aaccaggcag 150
 cgtgggagtg ggatgtgtcc tcagaagcta accatctcct ggtttgccat 200
 cgttttgctg gtgtctccac tcatggccat gtgggagctg gagaaagacg 250
 tttatgttgt agaggtggac tggactcccg atgcccctgg agaaacagtg 300
 aacctcacct gtgacacgcc tgaagaagat gacatcacct ggacctcaga 350
 ccagagacat ggagtcatag gctctggaaa gacctgacc atcactgtca 400
 aagagtttct agatgctggc cagtacacct gccacaaagg aggcgagact 450
 ctgagccact cacatctgct gctccacaag aaggaaaatg gaatttggtc 500
 cactgaaatt ttaaaaaatt tcaaaaacaa gactttcctg aagtgtgaag 550
 caccaaatta ctccggacgg ttcacgtgct catggctggg gcaaagaaac 600
 atggacttga agttcaacat caagagcagt agcagttccc ctgactctcg 650
 ggcagtgaca tgtggaatgg cgtctctgtc tgcagagaag gtcacactgg 700
 accaaagga ctatgagaag tattcagtggt cctgccagga ggatgtcacc 750
 tgcccaactg ccgaggagac cctgcccatt gaactggcgt tggaagcacg 800
 gcagcagaat aaatatgaga actacagcac cagcttcttc atcagggaca 850
 tcatcaaacc agacccgccc aagaacttgc agatgaagcc tttgaagaac 900
 tcacaggtgg aggtcagctg ggagtaccct gactcctgga gcactcccca 950
 ttctacttc tccctcaagt tctttgttcg aatccagcgc aagaaagaaa 1000
 agatgaagga gacagaggag gggtgtaacc agaaaggtgc gttcctcgta 1050
 gagaagacat ctaccgaagt ccaatgcaaa ggcggaatg tctgcgtgca 1100
 agctcaggat cgctattaca attcctcatg cagcaagtgg gcatgtgttc 1150
 cctgcagggt ccgatcctag gatgcaacgt tggaaaggaa agaaaagtgg 1200
 aagacattaa ggaagaaaaa tttaaactca ggatggaaga gtcccccaaa 1250
 agctgtcttc tgcttggttg gctttttcca gtttctctaa gttcatcatg 1300
 acaccttgc tgatttctac atgtaaatgt taaatgcccg cagagccagg 1350
 gagctaattg atgcatagat attctagcat tccacttggc cttatgctgt 1400
 tgaaatattt aagtaattta tgtatttatt aatttatttc tgcatttcac 1450

```

atttgatatac caagatgtat tgaatatttc atgtgctcgt ggocctgatcc 1500
actgggacca ggcctatta tgcaaattgt gagcttgta tcttcttcaa 1550
cagctcttca atcagggctg cgtaggtaca ttagcttttg tgacaaccaa 1600
taagaacata atattctgac acaagcagtg ttacatattt gtgaccagta 1650
aagacatagg tggatatttg agacatgaag aagctgtaa gttgactctg 1700
aagagtttag cactagtctt aacacaaaga aagacttttt agaagtgata 1750
ttgataagaa accagggcct tctttagaag ggtacctaaa tttaaaagaa 1800
ttttgaaagg ctgggtatcg gtggtatatg cttttaattc cagcactcag 1850
gagaccaagg caggcagatc tctgtgagtt tgaggacagc ctggtgtaca 1900
gagggagttc cagcacagcc agtgccacac agaaattctg tctcaaaaac 1950
a 1951

```

5
 <210> 30
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 30

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

Gln	Arg	Asp	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Ser	Val	Ser	Cys	Gln	Glu	Asp	Val	185	190	195
Thr	Cys	Pro	Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Leu	Pro	Ile	Glu	Leu	Ala	Leu	200	205	210
Glu	Ala	Arg	Gln	Gln	Asn	Lys	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ser	Phe	215	220	225
Phe	Ile	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Lys	Asn	Leu	Gln	230	235	240
Met	Lys	Pro	Leu	Lys	Asn	Ser	Gln	Val	Glu	Val	Ser	Trp	Glu	Tyr	245	250	255
Pro	Asp	Ser	Trp	Ser	Thr	Pro	His	Ser	Tyr	Phe	Ser	Leu	Lys	Phe	260	265	270
Phe	Val	Arg	Ile	Gln	Arg	Lys	Lys	Glu	Lys	Met	Lys	Glu	Thr	Glu	275	280	285
Glu	Gly	Cys	Asn	Gln	Lys	Gly	Ala	Phe	Leu	Val	Glu	Lys	Thr	Ser	290	295	300
Thr	Glu	Val	Gln	Cys	Lys	Gly	Gly	Asn	Val	Cys	Val	Gln	Ala	Gln	305	310	315
Asp	Arg	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ser	Cys	Ser	Lys	Trp	Ala	Cys	Val	Pro	320	325	330
Cys	Arg	Val	Arg	Ser											335		

<210> 31
 <211> 866
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 <400> 31

```

ggcacagctg gacctggtgg gggttctctg tggttccatg ctttctggac 50
tcttgccctgc tggctggagc tgctgacagg cctgacatct tctgcaacct 100
ccagcatcag gacaaagaaa gccgcctcaa accttccaaa tcacttcctc 150
ttggcccagg aacaatggct gccatgtcag aagactcttg cgtcaacttc 200
aaggaaatga tgtttattga caacacgctt tactttatac ctgaagaaaa 250
tggagacctg gaatcagaca actttggccg acttcactgt acaaccgcag 300
taatacggaa tataaatgac caagttctct tcgttgacaa aagacagcct 350
gtgttcgagg atatgactga tattgatcaa agtgccagtg aaccccagac 400
cagactgata atatacatgt acaaagacag tgaagtaaga ggactggctg 450
tgaccctctc tgtgaaggat agtaaaatgt ctaccctctc ctgtaagaac 500
aagatcattt cctttgagga aatggatcca cctgaaaata ttgatgatat 550
acaaagtgat ctcatattct ttcagaaacg tgttccagga cacaacaaga 600
tggagtttga atcttctactg tatgaaggac actttcttgc ttgccaaaag 650

gaagatgatg ctttcaaact cattctgaaa aaaaaggatg aaaatgggga 700
taaactctgt atgttcactc tcactaactt acatcaaagt taggtgggga 750
gggttttgtt tccagaaaga tgattagcac acatgcgcct tgtgatgacc 800
tcgcctgtat ttccataaca gaataccoga ggctgcatga tttatagagt 850
aaacacgttt atttgt 866

```

<210> 32
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 32

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

<210> 33
 <211> 1121
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 33

cctaaacagg ctctcctctc acttatcaac tgttgacact tgtgcgatct 50
 ctgatggctg tcctgcagaa atctatgagt ttttccctta tggggacttt 100

```

ggccgccagc tgccctgcttc tcattgccct gtgggccagc gaggcaaagt 150
cgctgcccgt caacacccgg tgcaagcttg aggtgtccaa cttccagcag 200
ccgtacatcg tcaaccgcac ctttatgctg gccaaggagg ccagccttgc 250
agataacaac acagacgtcc ggctcatcgg ggagaaactg ttccgaggag 300
tcagtgtctaa agatcagtg c tacctgatga agcaggtgct caacttcacc 350
ctggaagacg ttctgctccc ccagtcagac aggttccagc cctacatgca 400
ggaggtggta cctttcctga ccaaactcag caatcagctc agctcctgtc 450
acatcagcgg tgaagaccag aacatccaga agaatgtcag aaggctgaag 500
gagacagtga aaaagcttgg agagagtggg gagatcaagg cgattgggga 550
actggacctg ctgtttatgt ctctgagaaa tgcttgctgc tgagcgagaa 600
gaagctagaa aacgaagaac tgctccttcc tgcttcttaa aaagaacaat 650
aagatccctg aatggacttt tttactaaag gaaagtgaga agctaacgtc 700
catcatcatt agaagatttc acatgaaacc tggctcagtt gaaaaagaaa 750
atagtgtcaa gttgtccatg agaccagagg tagacttgat aaccacaaag 800
attcattgac aatattttat tgtcactgat gatacaacag aaaaataatg 850
tactttaaaa aattgtttga aaggagggtt cctctcattc ctttagaaaa 900
aaagcttatg taacttcatt tccatatcca atattttata tatgtaagtt 950
tatttattat aagtatacat tttatttatg tcagtttatt aatatggatt 1000
tatttataga aacattatct gctattgata tttagtataa ggcaaataat 1050
atztatgaca ataactatgg aaacaagata tcttaggctt taataaacac 1100
atggatatca taaaaaaaaa a 1121

```

<210> 34
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 34

ES 2 662 845 T3

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

<210> 35
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 35

cgcttagaag tcggactaca gagttagact cagaaccaa ggaggtggat 50
 aggggggtcca caggcctggt gcagatcaca gagccagcca gatctgagaa 100
 gcaggggaaca agatgctgga ttgcagagca gtaataatgc tatggctggt 150
 gccctgggtc actcagggcc tggctgtgcc taggagtagc agtcctgact 200
 gggctcagtg ccagcagctc tctcggaatc tctgcatgct agcctggaac 250
 gcacatgcac cagcgggaca tatgaatcta ctaagagaag aagaggatga 300
 agagactaaa aataatgtgc cccgtatcca gtgtgaagat ggttgtgacc 350
 cacaaggact caaggacaac agccagttct gcttgcaaag gatccgccaa 400
 ggtctggctt tttataagca cctgcttgac tctgacatct tcaaagggga 450
 gcctgctota ctccctgata gcccctatgga gcaacttcac acctccctac 500
 taggactcag ccaactcctc cagccagagg atcacccccg ggagacccaa 550
 cagatgccca gctgagttc tagtcagcag tggcagcgcc cccttctccg 600
 ttccaagatc cttcgaagcc tccaggcctt tttggccata gctgcccggg 650
 tctttgcccc cggagcagca actctgactg agcccttagt gccaacagct 700
 taaggatgcc caggttccca tggctaccat gataagacta atctatcagc 750
 ccagacatct accagttaat taaccatta ggacttgtgc tgttcttgtt 800
 ttgtttgttt tgcgtgaagg gcaaggacac cattattaaa gagaaaagaa 850
 acaaacccca gagcaggcag ctggctagag aaaggagctg gagaagaaga 900
 ataaagtctc gagcccttgg ccttgggaagc gggcaagcag ctgcgtggcc 950
 tgaggggaag ggggcggtgg catcgagaaa ctgtgagaaa acccagagca 1000
 tcagaaaaag tgagcccagg ctttggccat tatctgtaag aaaaacaaga 1050
 aaaggggaac attatacttt cctgggtggc tcagggaat gtgcagatgc 1100
 acagtactcc agacagcagc tctgtacctg cctgctctgt ccctcagttc 1150
 taacagaatc tagtcactaa gaactaacag gactaccaat acgaactgac 1200
 aaatactacc actatgacct gtgacaaagc tgcataattta ttaagtggga 1250
 aggggaacttt tgatattatt tatccttgta acagtataga tgatggttat 1300
 ttattctatt tataaggaat tatgtatatt ttttttcaat aaagatttat 1350
 ttatgtggc 1359

<210> 36
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 36

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

Ala

<210> 37
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 37

acaccatcca gatctctgga agacagacaa gatgctgcct ccaacagcct 50
gctccgtoat gtccctggatg ctgctctcct gcctgatgct cttatctcag 100
gttcaaggtg aagactccct gaagaatata ccctccgcac gcattagttg 150
ccccaagggc toccaggctt atggctccta ctgctatgcc ttgtttcaga 200
taccacagac ctggtttgat gcagaactgg cctgccaaaa gaggcctgga 250
ggacacctcg tatctgtgct caatagcgt gaggcctcat tcttgtcctc 300
catggtgaag agaacaggaa acagctacca atacacttg attgggctcc 350
atgacccac tctgggtgca gaacccaatg gaggtggatg ggaatggagt 400
aacaatgaag tgatgaatta ctttaactgg gagaggaacc catctactgc 450
cttagaccgt gctttctgtg gcagcttgct aagagcttct ggatttctaa 500
aatggagaga tatgacatgt gaggtgaagt tgccctatgt ctgcaaattt 550
actggttaaa cttatcagac agcaaacatc ccgaatttgt cttgaagagc 600
atcatggaca agggacaaaa tgtgaagact cacctagaaa aagcattttc 650
tatctacagt ccacattaga gccttaatct gctctttcca tatctgtctt 700
tagtcctttt ggtataagtt tgggctcaat tctaaaataa aaataagctt 750
tctgtcaca 759

<210> 38
<211> 175
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 38

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

	110		115		120
Glu Trp Ser Asn	Asn Asp Val Met Asn Tyr Phe Asn Trp Glu Arg				
	125		130		135
Asn Pro Ser Thr	Ala Leu Asp Arg Ala Phe Cys Gly Ser Leu Ser				
	140		145		150
Arg Ala Ser Gly	Phe Leu Lys Trp Arg Asp Met Thr Cys Glu Val				
	155		160		165
Lys Leu Pro Tyr	Val Cys Lys Phe Thr Gly				
	170		175		

<210> 39
 <211> 769
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 39

```

aagacacctt ggtctcagcc tgcagagatc gttgagttgc atcctaagca 50
aaagactgtc tgctgctcag catggctagg aacgcctact tcatcctgct 100
ctcatgcctg atcgtcctgt ctccaagcca aggccaggaa gctgaagaag 150
acctgccatc tgccaggatc agttgccag aaggttccaa tgcoctacagc 200
tctattgtt actacttcac tgaagaccgt ttaacttggg ctgatgcaga 250
tcttttttgc cagaacatga attcaggcta cctggtgtca gttctcagtc 300
aggctgaggg caactttgtg gcctctctga ttaaggagag tggcactaca 350
gacgccaatg tctggactgg actccatgat cccaaaagga atcgtcgctg 400
gcactggagc agtgggtctc tgtttctcta caaatcctgg gcaactgggt 450
ctcctaacag ttccaatcgt ggctactgtg tatctctgac ttcaaacaca 500
ggatacaaga aatggaagga tgacaactgt gatgccaat actcatttgt 550
ctgcaagttc aaaggctgaa gtcacctgaa aaaaaatagt catataaagc 600
aaaattgaaa ttactatagt gtcagaaatt aaattggacc atctatcaaa 650
agcaaattag atcctgtctt cctggagaga cattcttgct tcaactgtcct 700
atggtacctg tatctccatt attttctgga aatttgcaca actgaaataa 750
aaacaccttt acaatgttg 769
    
```

<210> 40
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 40

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

<210> 41
 <211> 692
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 41

```

agtattcatt attcctagct gacagaaatt attgatttag aatttaaate 50
gaagactgtc tgctgatcag catggctcag aacaatgtat accttatcct 100
gttcttatgc ctgatgttcc tgtcatacag ccaaggccag gtagctgaag 150
aagacttccc cttggctgaa aaagaccttc cttctgccaa aatcaactgc 200
ccagaggggtg ccaacgccta tggttcctac tgttattatc taattgaaga 250
ccgtttgacc tggggggagg ctgatctctt ttgccagaac atgaatgcag 300
gtcacctggt gtcaatactc agccaggctg agagcaactt tgtggcctcg 350
ctggttaagg agagtggtag tacagcttcc aatgtctgga ctggacttca 400
tgaccctaaa agtaaccgtc gttggcactg gagcagtggc tccctatttc 450
tcttcaagtc atggggcact ggagctccaa gcactgccaa ccgtgggttat 500
tgtgtatcgc tgacttcaaa cacagcatat aaaaaatgga aggacgaaaa 550
ctgtgaggca cagtactcct ttgtctgcaa gttcagagcc taaagtcacc 600
tgaagaacag atgtgcagaa ctctgttact atatattata aatgaaagaa 650
gaccatctat ctgcaaaata aatactcttt cctgtaataa ct 692

```

<210> 42
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 42

5

ES 2 662 845 T3

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

<210> 43
 <211> 837
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 43

```

gcccttcctt caaatcctat cataaagcag tcacctttgt cctgacaaac 50
catctcagat ctctacaaga gagacaagat gctgcctcac ctggctctca 100
acagtatttc ctggatgctg ctctcctgcc tgttggtttgt atttcaggta 150
caagggtgaag acttccagaa ggaagtgcc tctccacgta ccagctgccc 200
catgggttac aaggcttata gctcccactg ctatgcctta gttatgacac 250
ctaaatcctg gtttcaagca gatctggtct gccagaagag accctcagga 300
catctcgtgt ctattcttag tggagggtgag gcttcctttg tgtcctcctt 350
gggtgaacggc agagtggaca actaccaaga catctggatt gggctccatg 400
atccaacaat gggccaacaa cccaatggag gtggatggga gtggagtaac 450
tccgatgtgc tgaattatct taactgggat ggggatcctt cctctactgt 500
caaccgtggc cactgtggga gtctgacagc aagttcaggg tttctgaagt 550

ggggagacta ttactgcat gggacattac catttgtctg caagttcaag 600
cagtagacaa gcagcatcca gcatttatca tgaagctccc catgacaagg 650
gatgaaatac aagaattcac ccggcaaggc tgtacttgct ttacagttgt 700
gcacagact tattctggtt ttctgtctc tttcatccat ctcttcccc 750
ttacttcagg cttttcaata tagttcctgc tttgcaatct tgcagataaa 800
taataaatac aacatttttg ttttactttt gtgtttt 837

```

<210> 44
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 44

5

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

<210> 45
 <211> 788
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 45

```

ccccggggcga aatcacctct gagctgtcaa agcattgcag acctctgtat 50
agacagatat accatggtgt ctcacaagac ccttcatagc atgtcctgga 100
tgctactgtg ttgcctgatg tccctttctt gggtaacaagg ggaacaatcc 150
  
```

cagaaaaaac tgtcttctcc acgcatcagc tgtccccaag aagcccaagc 200
 ttatggctcc tattgctatt tactgattct ggaaccacag acctgggcta 250
 atgcagagat ccactgccag aagcatttct caggacacct ggcatttctg 300
 ctacttatg gggaaattat ctttgtgtcc tctctggtga aaaacagttt 350
 gaccacattc ccatacatct ggattggact ccattgatctg tcacttggga 400
 gtttgcccaa tgaaaatgga tggaagtgga gcagctctga ccctctgacc 450
 ttctataact gggagatccc accctccatg totgcacacc acggttactg 500
 cgcagctttg totcaggcct caggttatca gaagtggaga gattattatt 550
 gtgaccacac atttccctat gtctgcaaat tcaagggtta ggccagttct 600
 gatttcaact gctgaaagt atcctgaaga tcacatagac aaaggagcga 650
 gcatgatggc tcaccaagaa agtccttctc acaccccgac accgaattcc 700
 tcattctatc tctgctgttc ttccataagt gtattctctg gggactctgg 750
 cctaaggatt cggagaacta taataaaatt tagtcaat 788

<210> 46
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 46

5

ES 2 662 845 T3

[illegible]

<210> 47
<211> 1024
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 47

```

ccgactcaag ctgaaaaagg cagggttctc ggagtgttgc ttccaatcag 50
attgcaggtc taggagaatc cacaaaaaag agaagaaaag aaaagaaaaa 100
aactggaacg ggctctgagg gccttgaaat caaagcattg aagtatcatc 150
tccatcgaaa gaggaagatg gcttaciaag gcgtgcggct actcttactg 200
ctgagctggg tagctggccc cgaagtctcg agcgatatct tgagacccag 250
ctgtgcccc aagatggtttt actataggtc coactgctat ggatacttcc 300
ggaagctaag aaactgggtct catgctgagc tggagtgtca gtcatatgga 350
aatggatccc atctggcatc tgtcttgaat caaaaggaag ccagtgtcat 400
atcaaagtac ataactggct atcagagaaa cctgcctgtg tggattggcc 450
tgcatgaccc acaaaagaag caattatggc agtggactga tgggtctaca 500
aacctgtaca gacgctggaa tcccaggaca aagagtgaag ccaggcattg 550
cgctgagatg aaccccaagg ataaattctt aacttggaac aaaaatggat 600
gtgccaaccg ccaacacttc ctgtgcaagt ataagacata gagcaaaaat 650
caagcgtcta ccagccttgc acaaactctt cccacttccc tctcacctgg 700
tggctgatct aatcattatc ccagagtaaa cactgtagca aacattgagg 750
aggcctccag ggcactggct atcaagccct gottagcatg gtgggacagt 800
ggcttccggt ctgagagttt agcatgggtg gacggtgact tccggtctca 850
gagattagca tgggtgggaca agggcttctg gtctccgtgt tcaacttaca 900
atcctttctg gtactccctt tccctctcat tgtcttaaac agcaatgctt 950
aacaagctag aaatgtgctt tcttgactac tgcgtctctg tcaaaccagt 1000
aaagtttttg agccaagaaa cagc 1024

```

<210> 48
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 48

```

Met Ala Tyr Lys Gly Val Arg Leu Leu Leu Leu Ser Trp Val
  1              5              10              15

Ala Gly Pro Glu Val Leu Ser Asp Ile Leu Arg Pro Ser Cys Ala
              20              25              30

Pro Gly Trp Phe Tyr Tyr Arg Ser His Cys Tyr Gly Tyr Phe Arg

```

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

<210> 49
 <211>
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 49

1 atgacaccac ctgaacgtct ctctctccca aggggtgtgtg gcaccaccct acacctctct
 61 ctctctggggc tgctgctggt tctgctgctt gggggcccagg ggctccctgg tgttggcctc
 121 acaccttcag ctgcccagac tgcccgctcag caccccaaga tgcattctgc ccacagcacc
 181 ctcaaaccctg ctgctcacct cattggagac cccagcaagc agaactcact gctctggaga
 241 gcaaacacgg accgtgcctt cctccaggat gggtttctct tgcagcaaca ttctctcctg
 301 gtccccacca gtggcatcta ctctgctctac tcccagggtg tcttctctgg gaaagcctac
 361 tctcccaagg ccacctctct cccactctac ctggcccatg aggtccagct ctctctctcc
 421 cagtaccctt tccatgtgcc tctctctcag tcccagaaga tgggtgtatc agggctgcag
 481 gaaccctggc tgcactcgat gtaccacggg gctgcgttcc agctcaccca gggagaccag
 541 ctatccaccc acacagatgg catccccccac ctagtctctc gccctagtag tgtcttcttt
 601 ggagccttcg ctctgtag

<210> 50
 <211>
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 50

**MTPFERLFPRVCGTTLHLLLLGLLLVLPGAQGLPGVGLTPSAAQTARQHPKMHLAHSTLKPAAHLIGDPSK
 QNSLLWRANTDRAFLQDGFSLSNNSLLVPTSGIYFVYSQVVFSGKAYSPKATSSPLYLAHEVQLFSSQYPPFHV
 PLLSSQKMVYPGLQEPWLHSMYHGAAFLTQGDQLSTHTDGIPHLVLSPTVFFGAFAL**

<210> 51
 <211>
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 51

1 atggggggcac tggggctgga gggcaggggt gggaggctcc aggggagggg ttccctcctg
61 cttagctgtgg caggagccac ttctctggtg accttgttgc tggcgggtgcc tatcactgtc
121 ctggctgtgc tggccttagt gcccagggat cagggaggac tggtaacgga gacggccgac
181 cccggggcac agggccagca aggactgggg ttccagaagc tgccagagga ggagccagaa

241 acagatctca gccccgggct cccagctgcc cacctcatag gcgctccgct gaaggggacag
301 gggctaggct gggagacgac gaaggaacag gcgtttctga cgagcgggac gcagttctcg
361 gacgccgagg ggctggcgct cccgcaggac ggcctctatt acctctactg tctcgtcggc
421 taccggggcc gggcgcccc tggcggcggg gacccccagg gccgctcggc cacgctgcgc
481 agctctctgt accggggcggg gggcgccctac gggccgggca ctcccagagc gctgctcgag
541 ggcgccgaga cgggtgactcc agtgctggac ccggccagga gacaagggtta cgggcctctc
601 tggtagacga gcgtgggggt cggcggcctg gtgcagctcc ggaggggcca gaggggtgtac
661 gtcaacatca gtcaccccca tatggtggac ttccgcgagag ggaagacctt ctttggggcc
721 gtgatggtgg ggtga

<210> 52
<211>
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 52

MGALGLEGRGGRLQGRSLLAVAGATSLVTLLLAVPITVLAVLALVLPQDQGGLVTETADPGAQAQQGLGFQKLPEE
EPETDL
SPGLPAHLIGAPLKGQGLGWETTKEQAFLTSGTQFSDAEGIALPQDGLYYLYCLVGYRGRAPPGGGDPQGRSVTLR
SSLYRA
GGAYGPGTPELLEGAETVTPVLDPARRQGYGFLWYTSVGF GGLVQLRRGERVYVNI SHPDMVDFARGKTFFGAVMV
G

<210> 53
<211>
<212> ADN
<213> Mus musculus
<400> 53

1 atgacactgc tcggccgtct ccacctcttg aggggtgcttg gcacccctcc tgtcttccctc
61 ctggggctgc tgctggccct gcctctaggg gccagggac tctctggtgt ccgcttctcc
121 gctgccagga cagcccatcc actccctcag aagcacttga cccatggcat cctgaaacct
181 gctgctcacc ttgttgggta cccagcaag cagaactcac tgctctggag agcaagcacg
241 gatcgctgct ttctccgaca tggcttctct ttgagcaaca actccctcct gatccccacc
301 agtgccctct actttgtcta ctcccagggtg gttttctctg gagaaagctg ctccccagg
361 gccattccca ctcccatcta cctggcacac gaggtccagc tcttttccctc ccaatacccc
421 ttccatgtgc ctctcctcag tgcgcagaag tctgtgtatc cgggacttca aggaccgtgg
481 gtgcgctcaa tgtaccaggg ggctgtgttc ctgctcagta agggagacca gctgtccacc
541 cacaccgacg gcatctccca tctacacttc agcccagca gtgtattctt tggagccttt
601 gcactgtag

<210> 54
<211>
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 54

MTLLGRLLHL RVLGTPPVFL LGLLALPLG AQGLSGVRF S AARTAHPLPQ KHLTHGILKPAHLVGYPSK
QNSLLWRAS T DRAFLRHGFS LSNNSLLIPT SGLYFVYSQV VFSGESCSRAIPTPIYLAH EVQLFSSQYP
FHVFLLSAQK SVYPGLQGPW VRSMYQGA V LLSKGDQLSTHTDGISHLHF SPSSVFTGAFAL

<210> 55
<211>
<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 55

1 atgacactgc tcggccgtct ccacctcttg aggggtgcttg gcacccctcc tgtcttctctc
61 ctggggctgc tgctggccct gcctctaggg gccagggac tctctggtgt ccgcttctcc
121 gctgccagga cagcccatcc actccctcag aagcacttga cccatggcat cctgaaacct

181 getgetcacc ttgttgggta cccagcaag cagaactcac tgotctggag agcaagcacg
241 gatcgtgcct ttctccgaca tggcttctct ttgagcaaca actccctcct gatccccacc
301 agtggcctct actttgtcta ctcccaggtg gttttctctg gagaaagctg ctccccagg
361 gccattccca ctcccatcta cctggcacac gaggtccagc tottttctct ccaatacccc
421 ttccatgtgc ctctcctcag tgccgagaag tctgtgtatc cgggaettca aggaccgtgg
481 gtgcgctcaa tgtaccaggg ggctgtgttc ctgctcagta agggagacca gctgtccacc
541 cacaccgacg gcattcccca tctacacttc agccccagca gtgtattctt tggagccttt
601 gcactgttag

<210> 56

<211>

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

MGTRGLQGLG GRPQGRGCLL LAVAGATSLV TLLAVPITV LAVLALVPQD QGRRVEKIIGSGAQAQKRLD
DSKPSCILPS PSSLSETPDP RLHPQRSNAS RNLASTSQGP VAQSSREASAWMTILSPAAD STPDPGVQQL
PKGEPETDLN PELPAHLIG AWMSGQGLSW EASQEEAFLRSGAQFSPTHG LALPDGVVY LYCHVGYRGR
TFPAGRSRAR SLTLRSALYR AGGAYGRGSPELLEGAETV TPVVDPIGYC SLWYTSVGFG GLAQLRSGER
VYVNISHPDM VDYRRGKTFF GAVMVG

<210> 57

<211>

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 57

ATGCTCCTGCCTTGGGCCACCTCTGCCCCGGCCTGGCCTGGGGGCTCTGGTGCTGGGCCTCTTCGGGCTCCTGGC
AGC
ATCGCAGCCCCAGGCGGTGCCTCCATATGCGTCCGAGAACCAGACCTGCAGGGACCAGGAAAAGGAATACTATGAGC
CCC
AGCACCGCATCTGCTGCTCCCGCTGCCCGCCAGGCACCTATGTCTCAGCTAAATGTAGCCGCATCCGGGACACAGTT
TGT
GCCACATGTGCCGAGAATTCCTACAACGAGCACTGGAACCTGACCATCTGCCAGCTGTGCCGCCCTGTGACCC
AGT
GATGGGCCTCGAGGAGATTGCCCCCTGCACAAGCAAACGGAAGACCCAGTGCCGCTGCCAGCCGGGAATGTTCTGTG
CTG
CCTGGGCCCTCGAGTGACACACTGCCGAGCTACTTTCTGACTGCCCGCTGGCACTGAAGCCGAGCTCAAAGATGAA
GTT
GGGAAGGGTAACAACCACTGCGTCCCCTGCAAGGCAGGGCACTTCCAGAATACCTCCTCCCCAGCGCCCCGCTGCCA
GCC
CCACACCAGGTGTGAGAACCAAGGTCTGGTGAGGCAGCTCCAGGCAGTCCAGTCCGACACAACCTGCAAAAATC
CAT
TAGAGCCACTGCCCCCAGAGATGTCAGGAGGG

<210> 58

<211>

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 58

CGCGCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCACTATACTCTGTGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC
GTC
AGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG
ACG
TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AAC
CACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC

TTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCT
GGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAT

<210> 59
<211>
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 59

ATGCGCCTGCCCCGGGCCTCCTCTCCCTGCGGCCTGGCCTGGGGGCCACTCCTGCTGGGACTCAGCGGGCTTCTGGT
GGC
CTCTCAGCCCCAGCTGGTGGCCCCCTTATCGCATAGAAAACCAGACTTGCTGGGACCAGGACAAGGAATACTACGAGC
CCA
TGCACGACGTCTGCTGCTCCCGCTGTCCCCCAGGCGAGTTTGTCTTTGCGGTATGCAGCCGCAGCCAAGACACGGTT
TGC
AAGACTTGCCCCATAATTCTTATAATGAACACTGGAACCATCTCTCCACCTGCCAGCTGTGCCGCCCCCTGTGACAT
TGT
GCTGGGCTTTGAGGAGGTTGCCCTTGCACCAGCGATCGGAAAGCCGAGTGCCGCTGTGAGCCGGGGATGTCTCTGTG
TGT
ATCTGGACAATGAGTGTGTGCACTGTGAGGAGGAGCGGCTTGTA CTCTGCCAGCCTGGCACAGAAGCCGAGGTACA
GAT
GAAATTATGGATACTGACGTCAACTGTGTCCCCTGTAAGCCGGGACACTTCCAGAACACTTCTCCCTCGAGCCCG
CTG
TCAACCCCATACCAGATGTGAGATCCAGGGCCTGGTGGAGGCAGCTCCAGGTACCTCTACTCGGATACCATCTGTA
AAA

<210> 60
<211>
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 60

CTCGAGGACCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTC
 ATC
 TTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGA
 GGA
 TGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGG
 ATT
 ACGACAGTACTCTACGCGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGC
 AAG
 GTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGT
 ATA
 TGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTG
 AAG
 ACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCTCTGGACTCTGAT
 GGT
 TCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAAGTGGT
 CCA
 CGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGAAAGCTTGGCCGCCATGGCC
 C

<210> 61
 <211>
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 61

MKHQHQQHQQHQQHMQAQTARQHPK-

MHLAHS TLKPA AHLIGDPSKQNSLLWRANTDRAFLQDGFSLSNNSLLVPTSGIYFVYSQVVFSGKAYSPKATSSPLY
 LAHE
 VQLFSSQYPFHVPLLSQKMVYPGLQEPWLHSMYHGAAFLTQGDQLSTHTDGIPHLVLSPLSTVFFGAFAL

10

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende IL-22 para su uso en un método para tratar un trastorno microbiano en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del polipéptido, en donde el trastorno microbiano es enfermedad inflamatoria intestinal (EII).
5
2. Un agonista de IL-22 que aumenta la actividad de la IL-22 para su uso en un método para tratar un trastorno microbiano en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del agonista de IL-22, en donde el trastorno microbiano es EII y en donde el agonista de IL-22 se selecciona del grupo:
10
 - (a) un polipéptido de fusión IL-22-Fc
 - (b) un ácido nucleico de IL-22;
 - (c) un polipéptido de fusión de IL-22;
 - (d) un anticuerpo o un fragmento biológicamente activo del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento se unen a IL-22, IL-22R o IL-22BP;
 - 15 (e) un anticuerpo monoclonal que se une a IL-22, IL-22R o IL-22BP; y
 - (f) un anticuerpo humanizado que se une a IL-22, IL-22R o IL-22BP.
3. El polipéptido o el agonista de IL-22 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la administración es intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación.
20
4. El polipéptido o el agonista de IL-22 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la administración es intravenosa en bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo.
25
5. El polipéptido o el agonista de IL-22 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha EII es la enfermedad de Crohn.
6. El polipéptido o el agonista de IL-22 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha EII es colitis ulcerosa.
30
7. Un kit para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno microbiano en un sujeto, en donde el kit comprende una composición farmacéutica que comprende IL-22 y en donde el trastorno microbiano es EII.

Fig.1

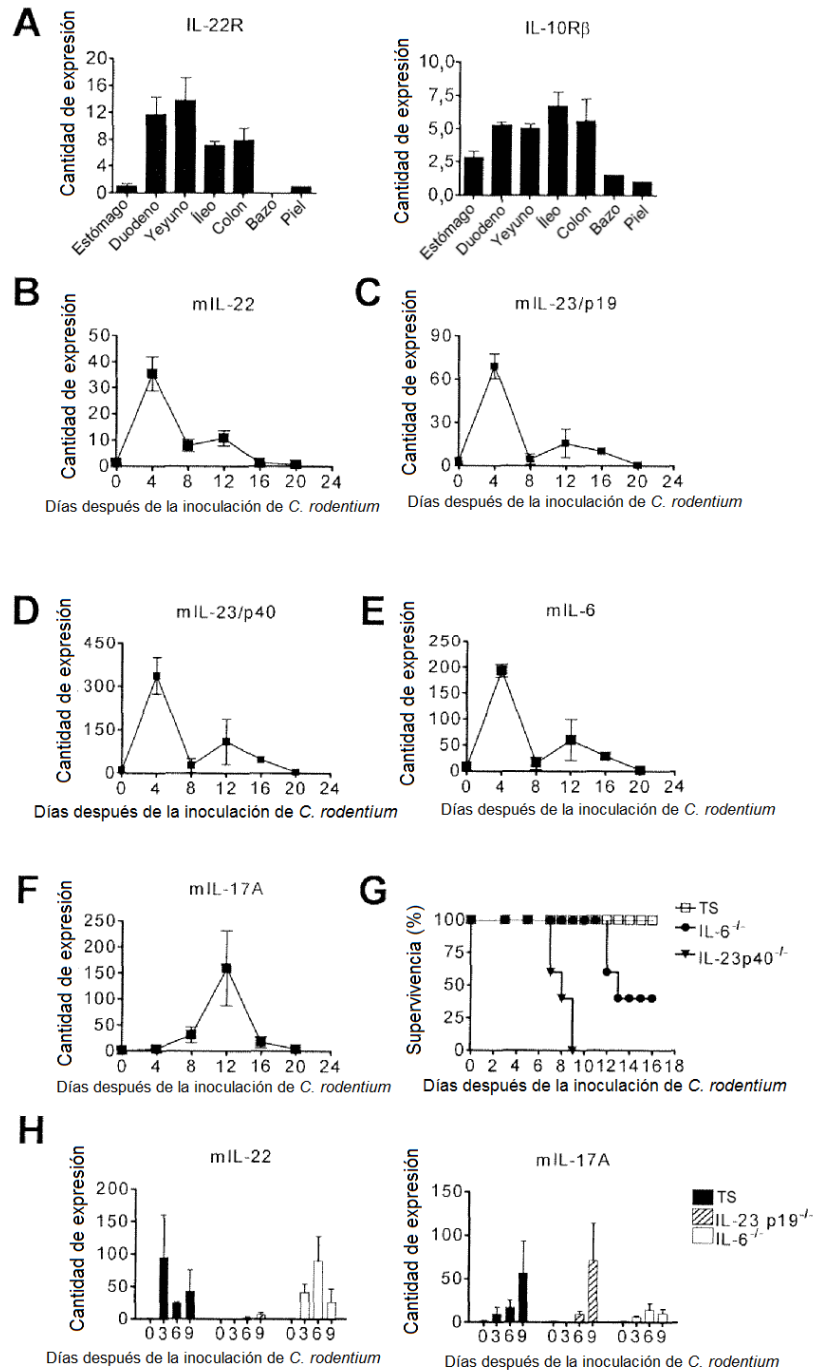


Fig.2

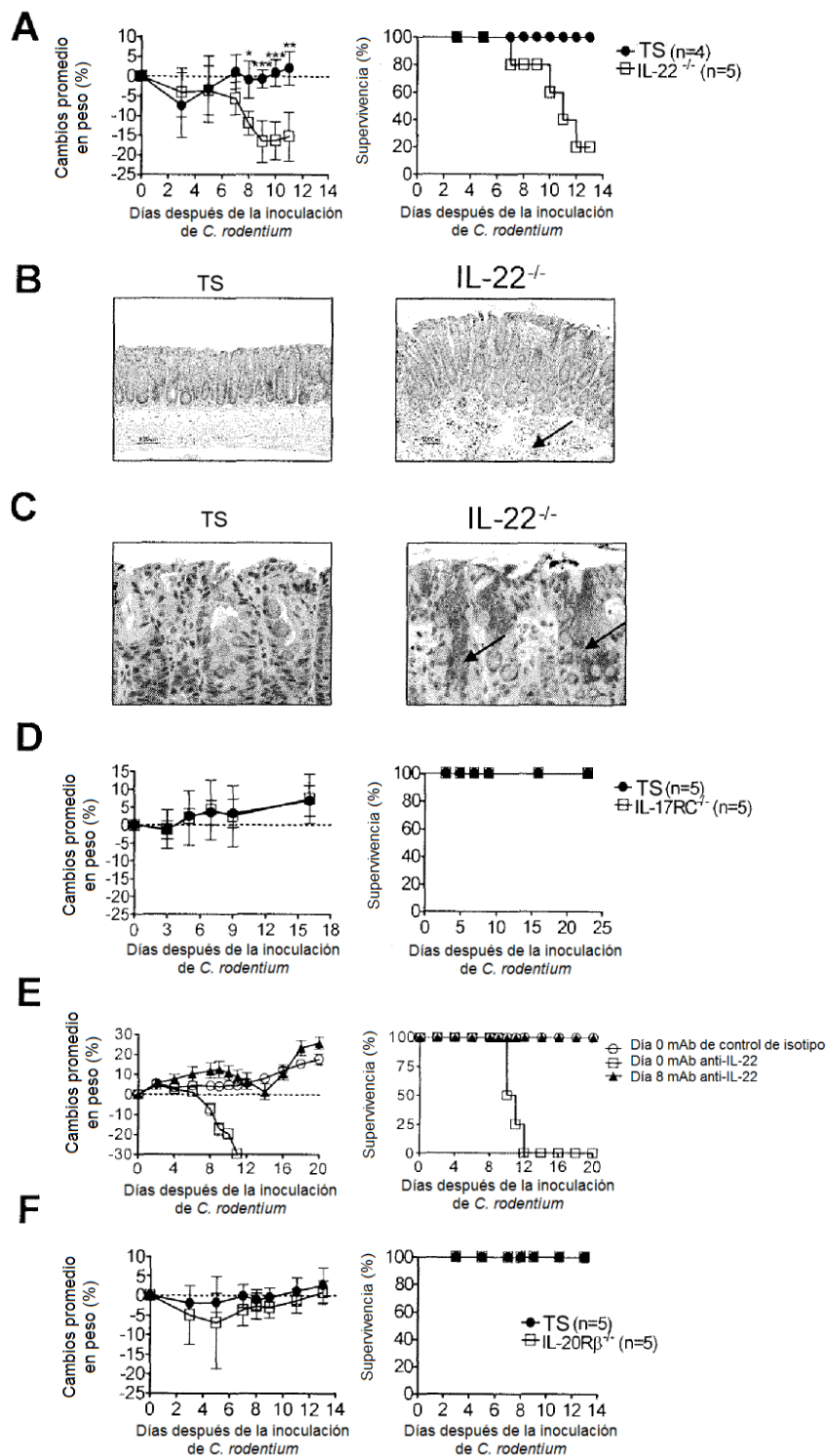


Fig.3

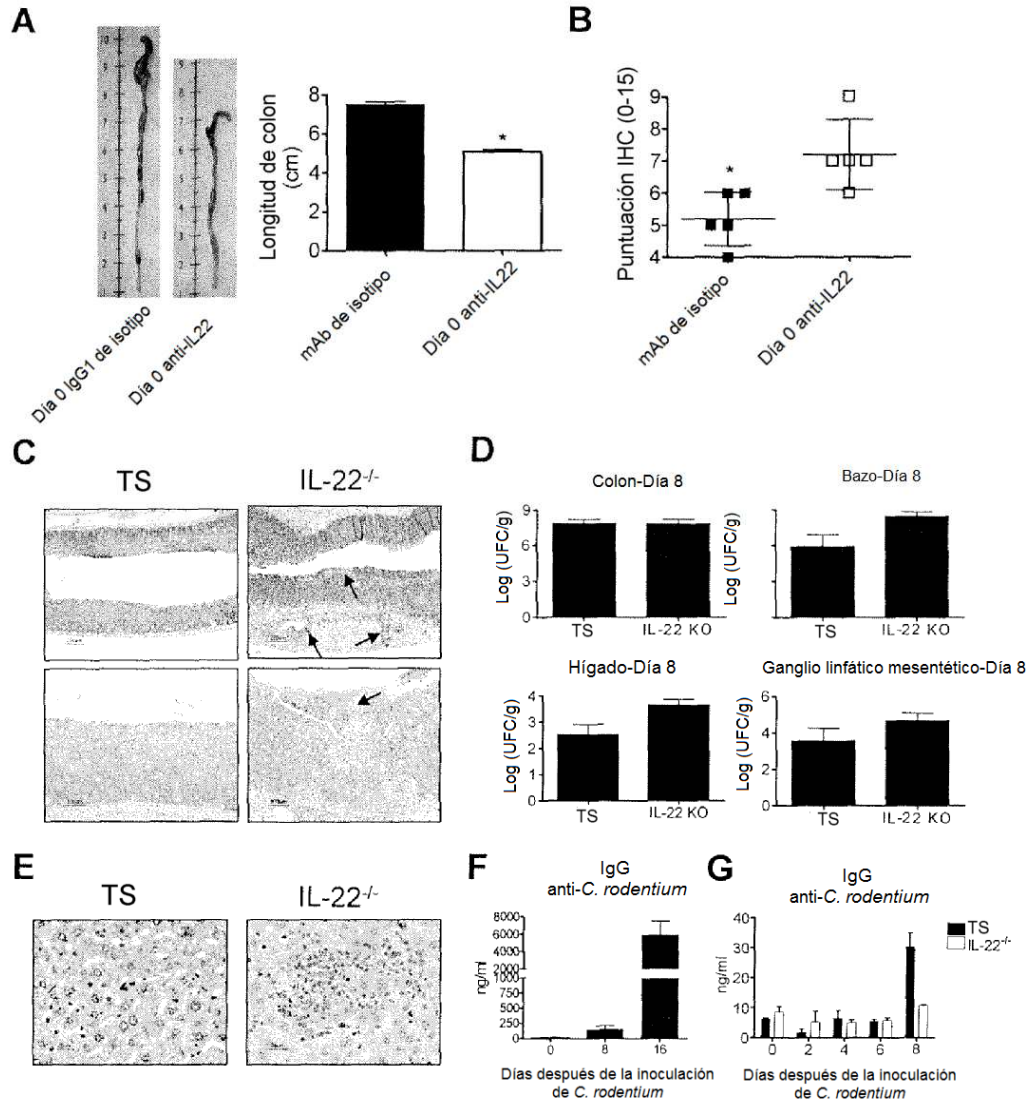


Fig.4

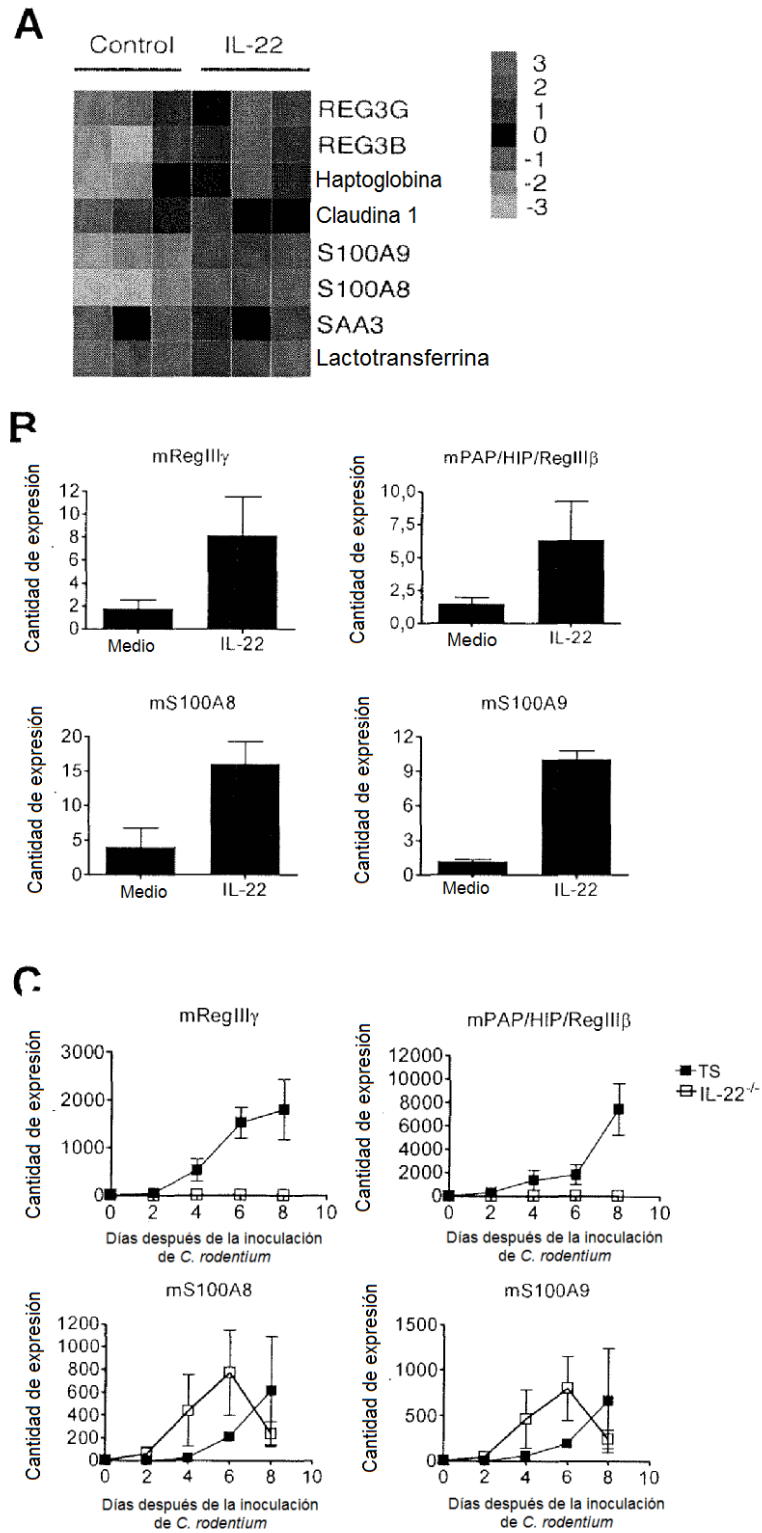


Fig. 5

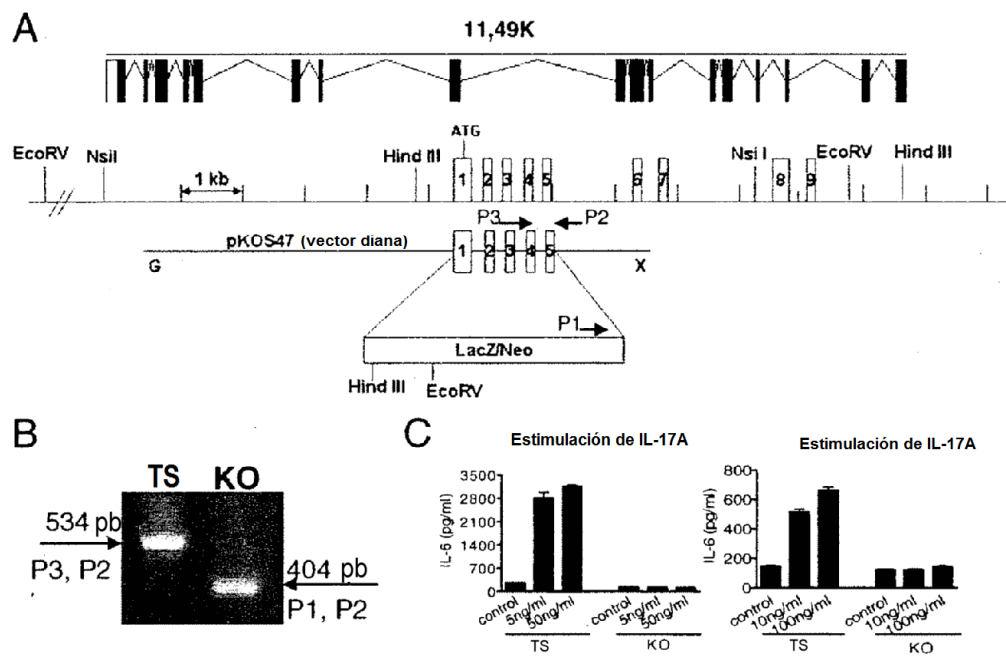


Fig. 6

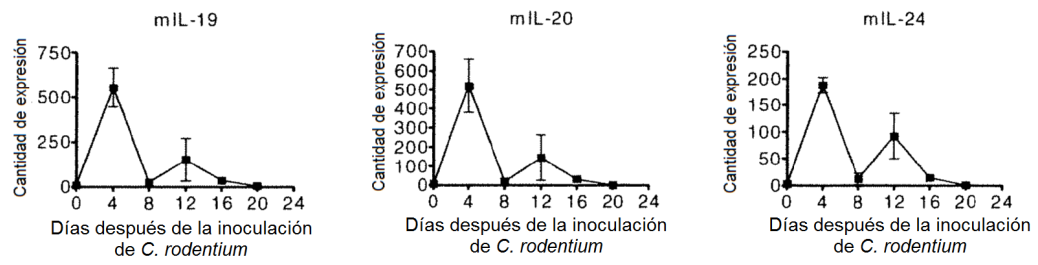


Fig. 7

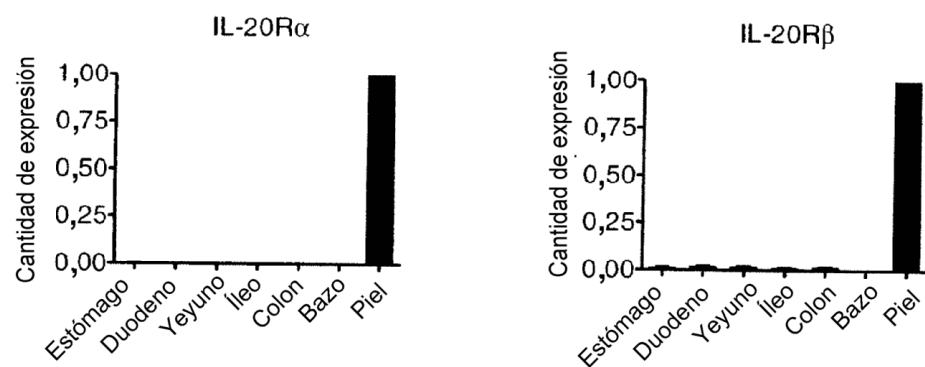


Fig. 8

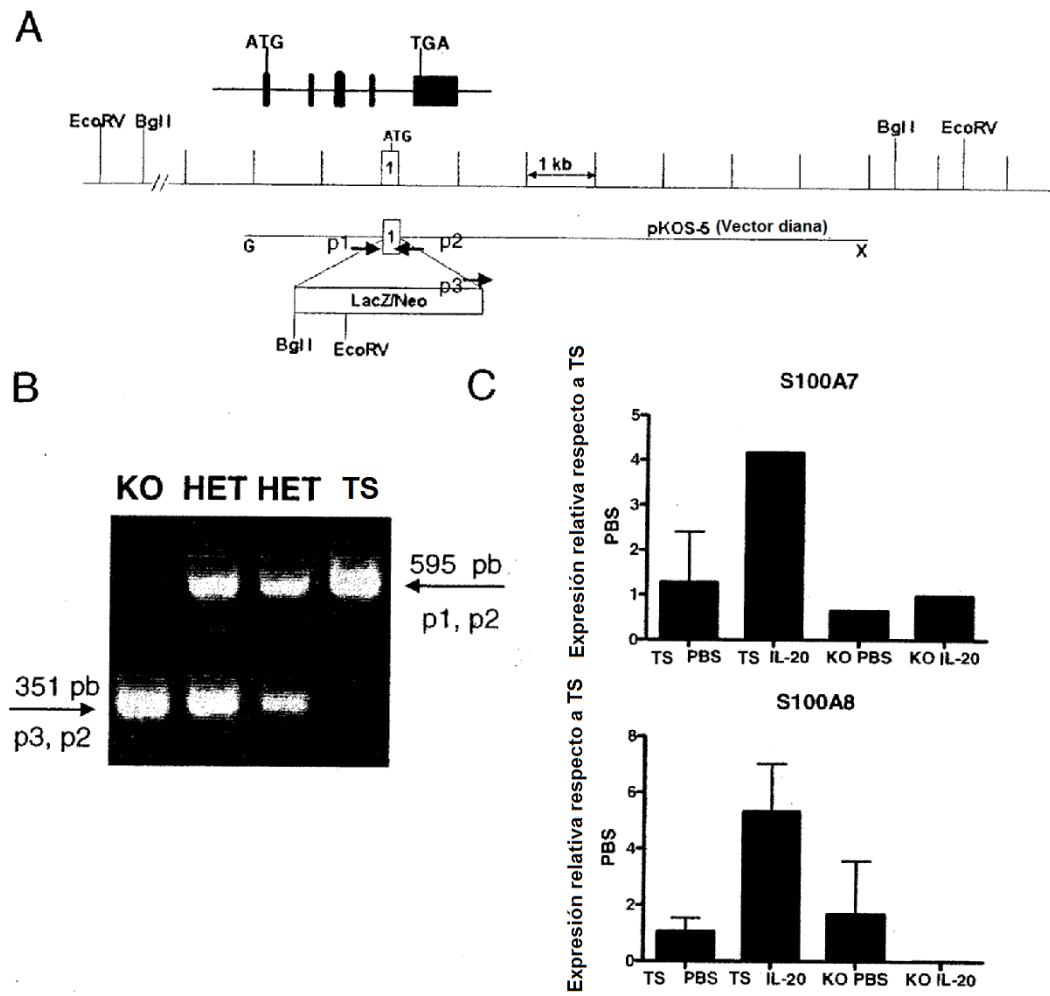


Fig. 9

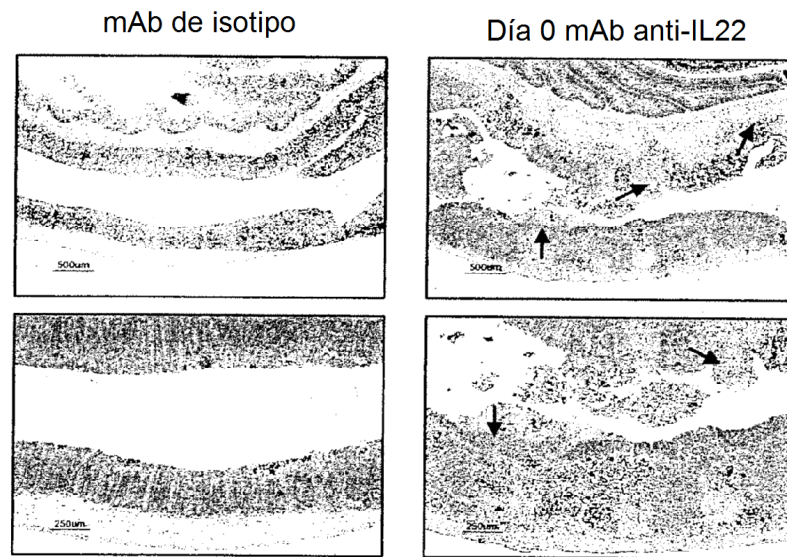


Fig. 10

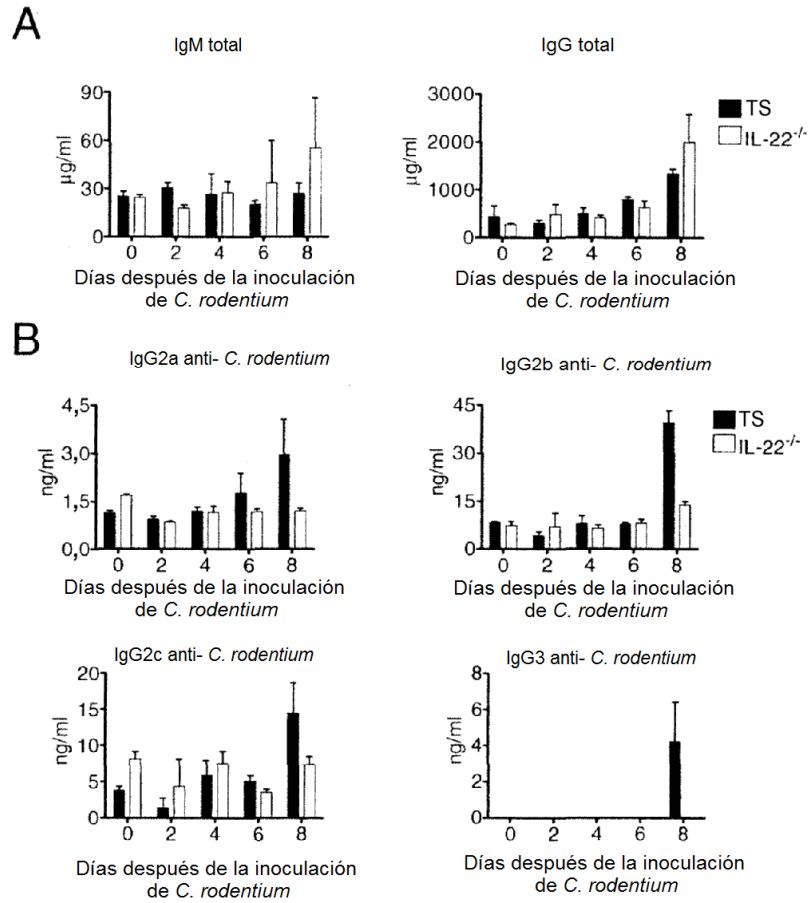


Fig. 11

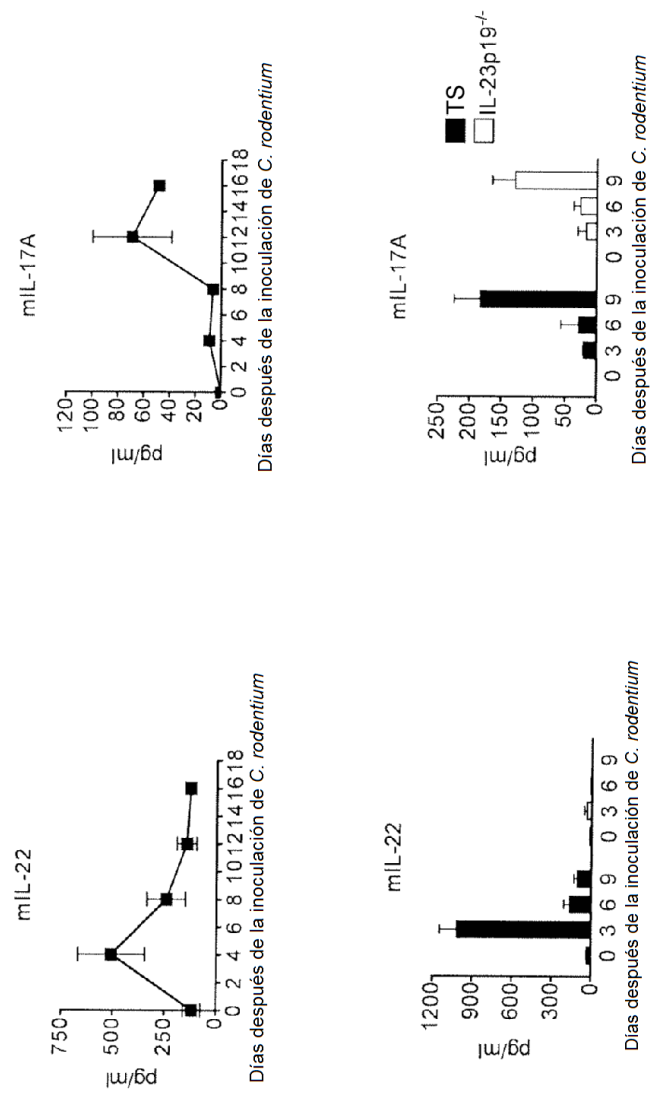


Fig. 12

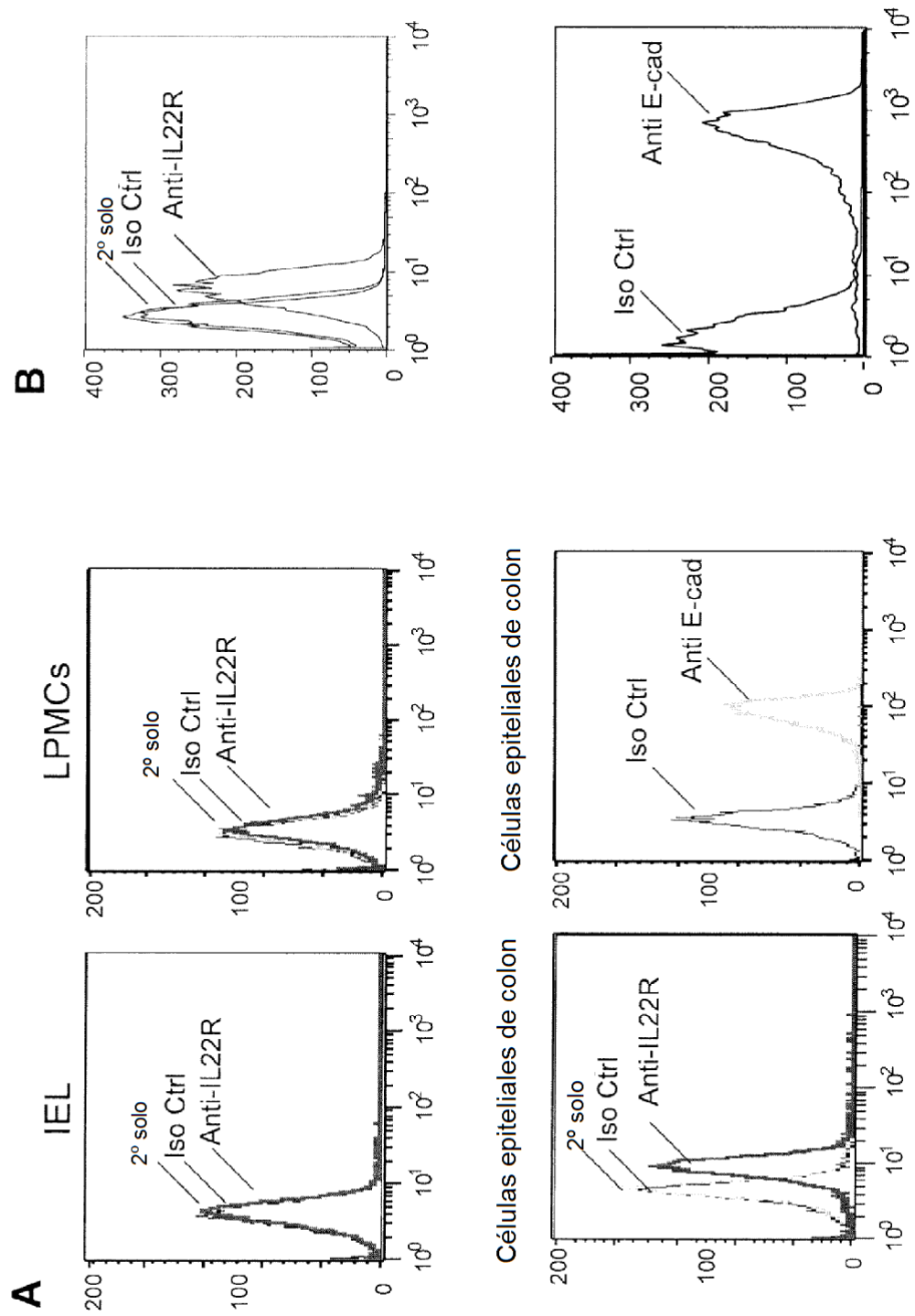
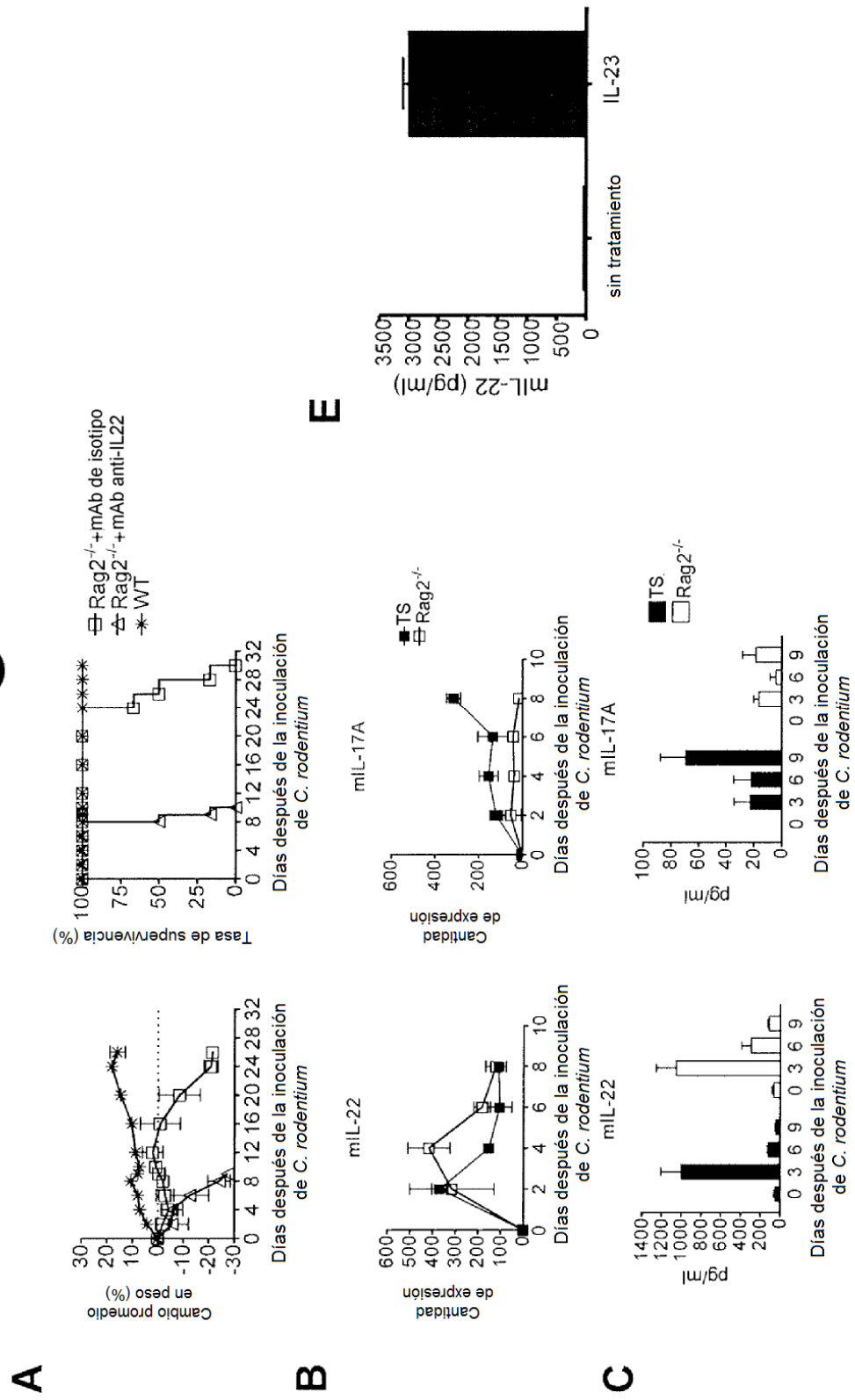


Fig. 13



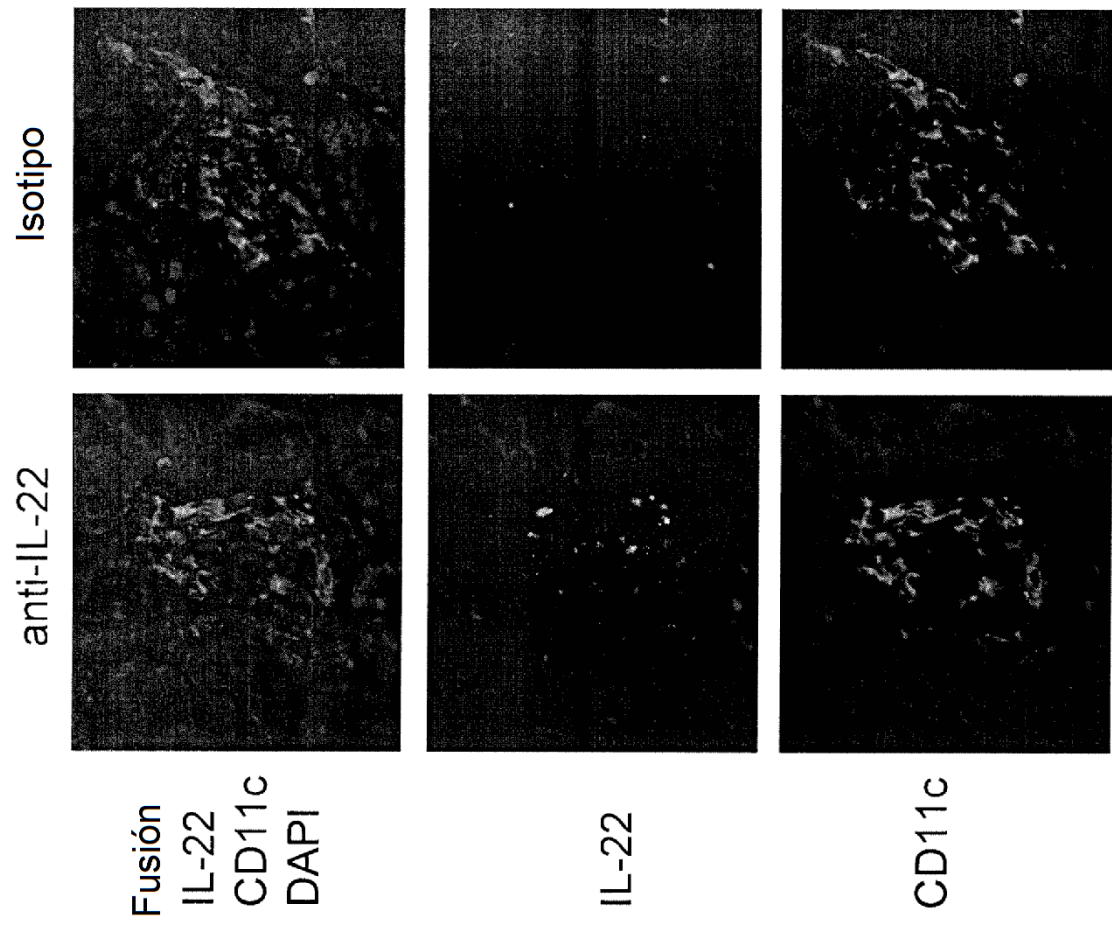
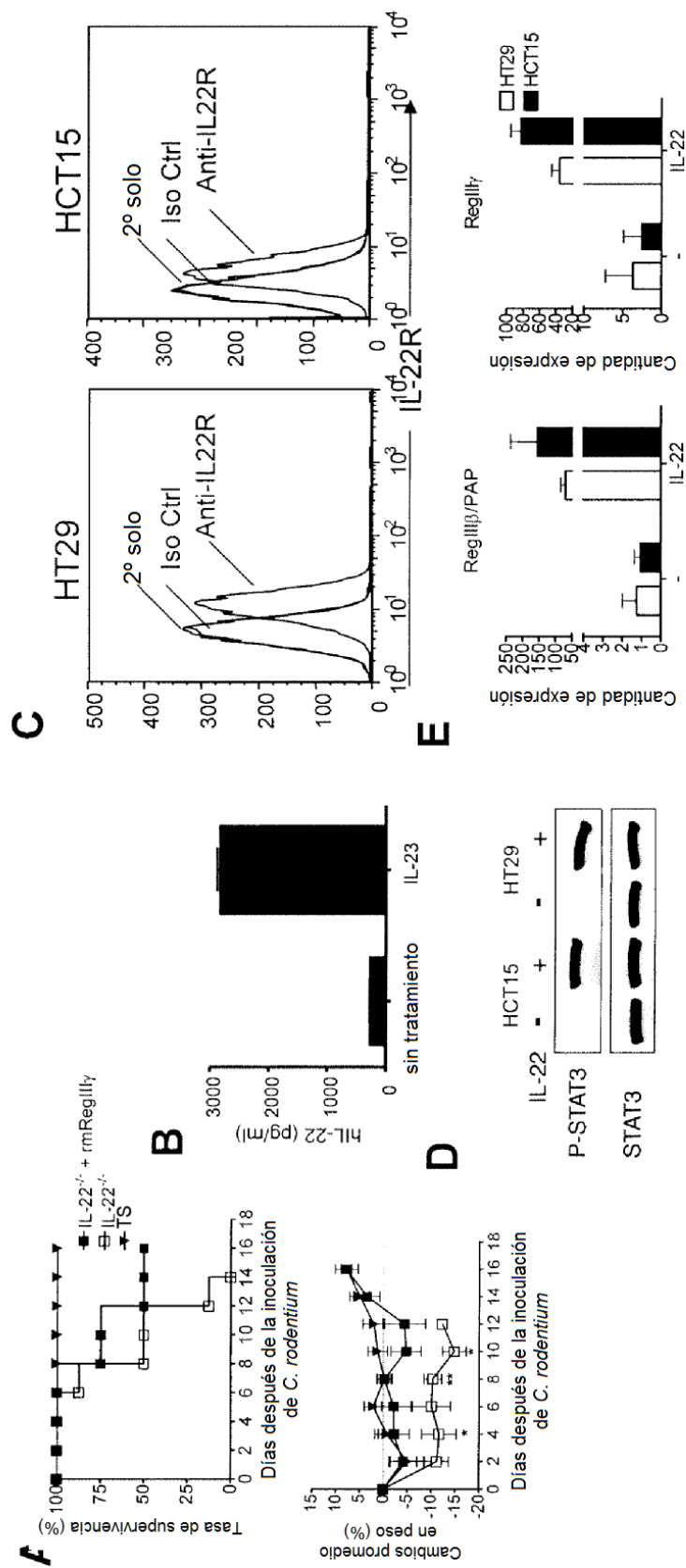


Fig. 14



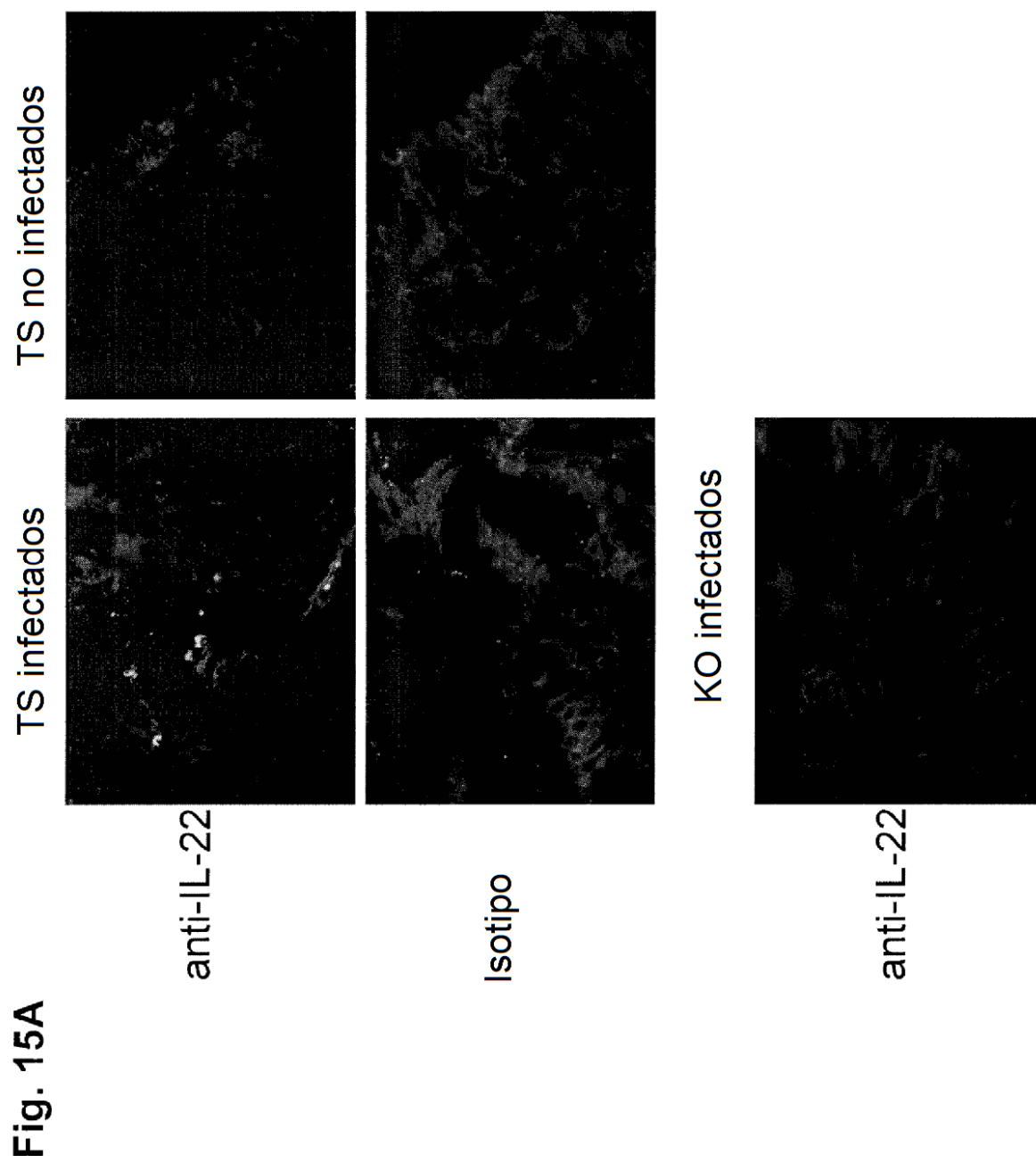


Fig. 15B

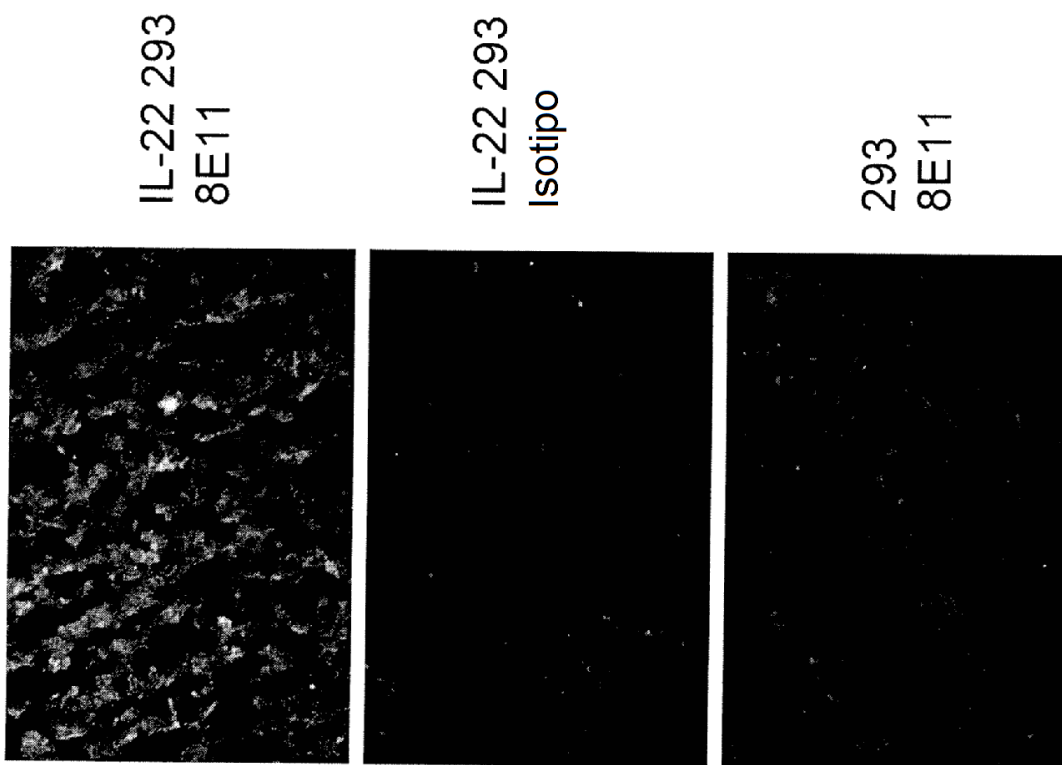


Fig. 16

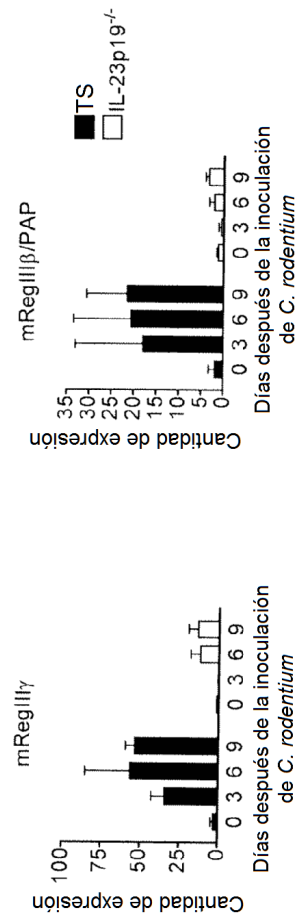


Fig. 17

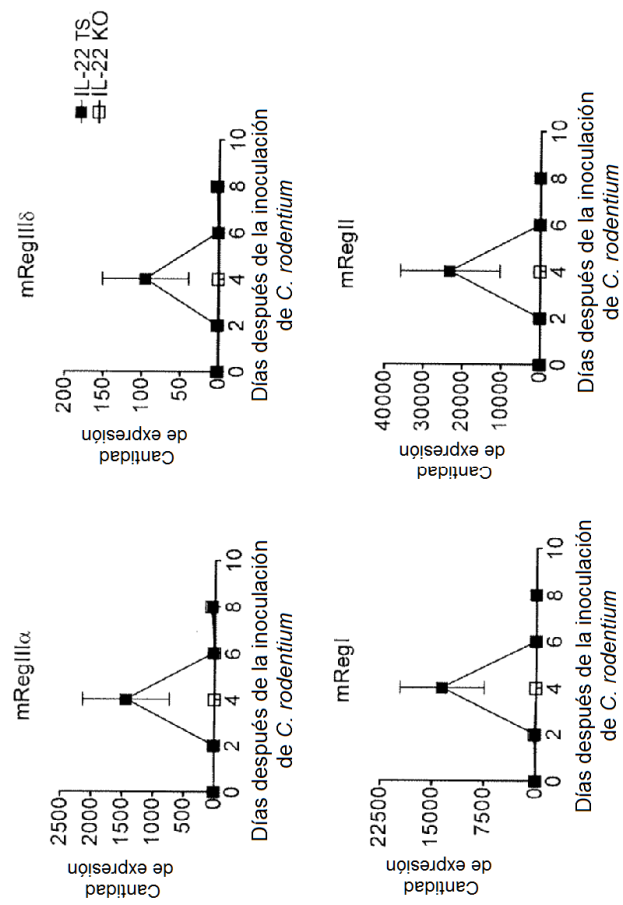


Fig. 18

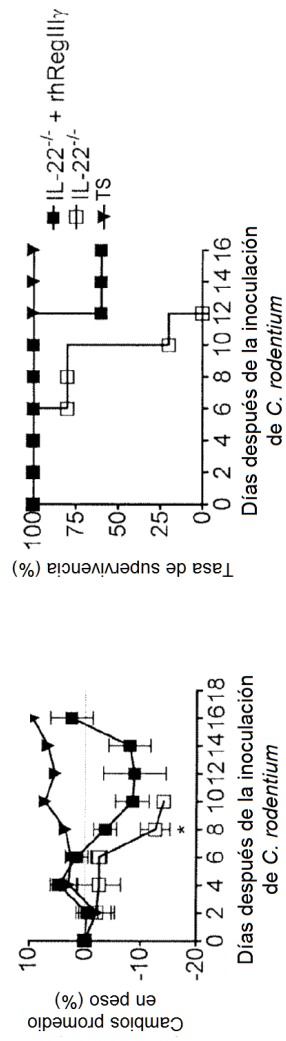


Fig. 19A

Probeset	Valor p	Log2 FC	ID	Símbolo
A_51_P256827	0	5,674	NM_013650	S100a8
A_52_P700056	0,001	3,722	BC089618	
A_51_P402943	0,001	3,637	NM_009114	S100a9
A_51_P235945	0,007	2,668	NM_017370	Hp
A_51_P169671	0,042	2,523	NM_011036	Pap
A_52_P472324	0,012	2,351	NM_011414	Slpi
A_52_P329207	0,006	2,262	NM_007969	Expi
A_52_P295432	0,015	2,111	NM_009141	Cxcl5
A_52_P321831	0,007	2,062	XM_894811	Krtap3-1
A_51_P279437	0,013	2,032	NM_029662	Mfsd2
A_51_P246166	0,01	1,983	NM_007969	Expi
A_52_P230938	0,008	1,966	NM_010741	Ly6c
A_51_P384894	0,019	1,837	NM_001001332	Stfa1
A_51_P156955	0,045	1,837	NM_013459	Cfd
A_51_P303160	0,03	1,821	NM_007482	Arg1
A_51_P461703	0,034	1,804	NM_031188	Mup1
A_51_P374476	0,019	1,742	NM_008220	Hbb-b1
A_51_P481958	0,012	1,735	NM_016674	Cldn1
A_51_P464703	0,019	1,727	NM_021443	Ccl8
A_51_P132185	0,031	1,724	NM_001001332	Stfa1
A_51_P496795	0,019	1,669	NM_145555	A330049M08Rik
A_51_P296109	0,01	1,63	NM_028618	Dmkn
A_51_P228768	0,043	1,591	NM_011409	Slfn3
A_51_P466535	0,014	1,571	AK172918	Ttc9
A_51_P387239	0,04	1,569	NM_021792	Iigp1
A_51_P337308	0,03	1,547	NM_011315	Saa3
A_51_P346938	0,031	1,541	NM_029796	Lrg1
A_51_P504546	0,047	1,536	NM_027406	Aldh1l1
A_51_P386870	0,026	1,53	NM_011472	Spr2f
A_51_P216456	0,024	1,522	NM_009311	Tac1
A_51_P212491	0,025	1,517	NM_133232	Pfkfb3
A_52_P48681	0,018	1,514	NM_016674	Cldn1
A_52_P424959	0,038	1,498	NM_153457	Rtn1
A_52_P232813	0,047	1,484	NM_203320	Gm1960
A_51_P181891	0,011	1,458	NM_028113	2600011E07Rik
A_51_P249989	0,014	1,455	NM_145133	T2bp
A_52_P487686	0,042	1,405	NM_001001332	Stfa1
A_52_P168962	0,023	1,387	NM_007646	Cd38
A_51_P485312	0,026	1,372	NM_013653	Ccl5
A_52_P99353	0,019	1,37	AK009488	
A_52_P252931	0,037	1,358	NM_013505	Dsc2
A_52_P278538	0,039	1,349	NM_008218	Hba-a1
A_52_P85132	0,034	1,331	NM_172440	Stxbp5l
A_52_P407198	0,023	1,322	NM_183153	A430060F13Rik
A_52_P638459	0,03	1,317	BC033508	Ccl5
A_51_P335559	0,019	1,311	AK034993	
A_51_P240801	0,018	1,308	BC046640	2610307O08Rik
A_52_P627816	0,032	1,292	NM_019984	Tgm1
A_52_P656860	0,01	1,273	NM_026232	Slc25a30
A_51_P180314	0,045	1,258	AK011413	Mup1
A_51_P328870	0,011	1,249	D86599	Oxtr
A_51_P482908	0,041	1,237	NM_025549	Arrdc4
A_51_P257951	0,041	1,235	NM_020509	Retnla
A_51_P441426	0,029	1,234	NM_019932	Cxcl4

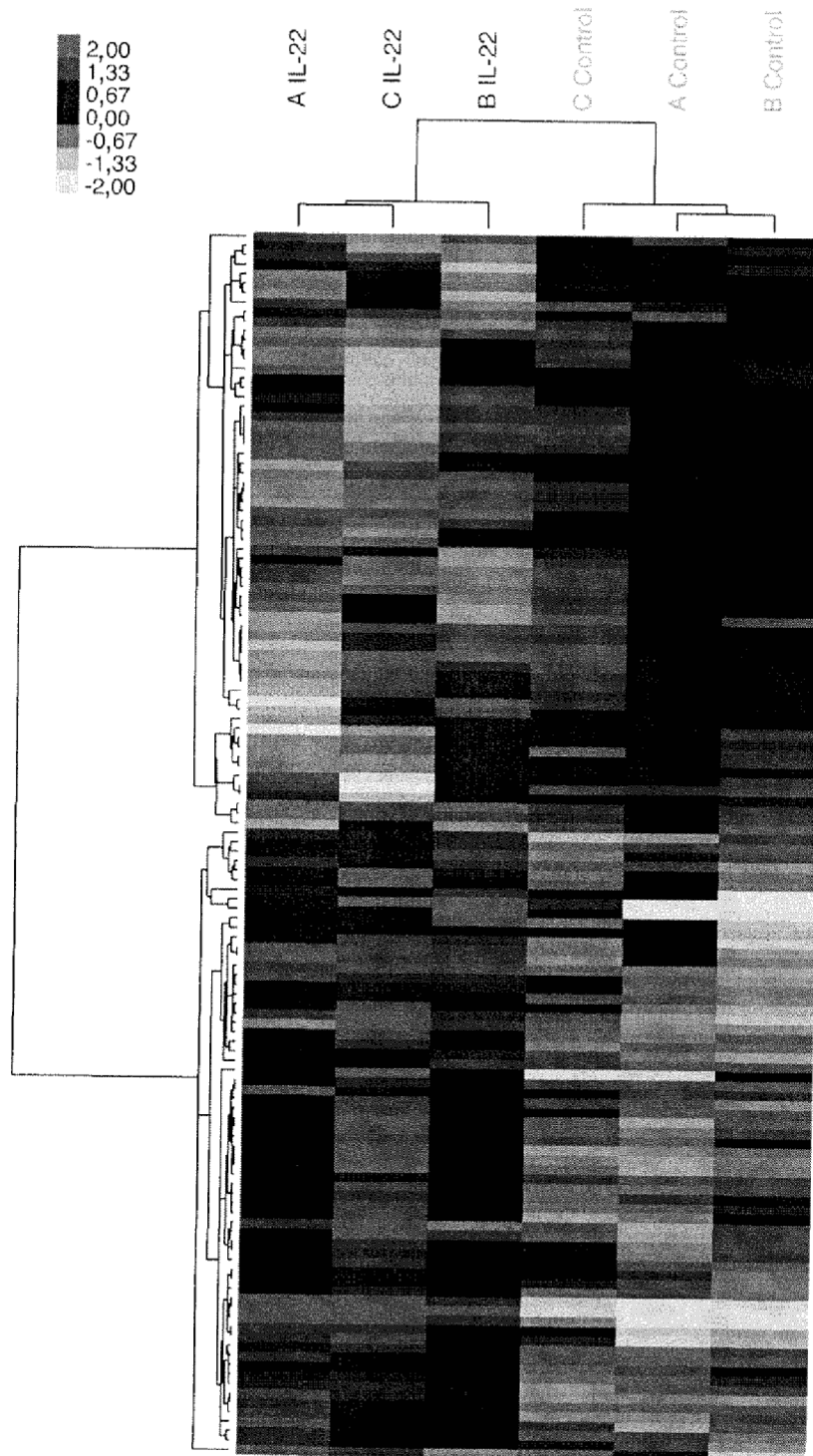
Fig. 19B

Probeset	Valor p	Log2 FC	ID	Símbolo
A_51_P128463	0,049	1,232	XM_485455	Grrp1
A_51_P239750	0,008	1,196	NM_008380	Inhba
A_51_P413866	0,044	1,188	NM_008198	Cfb
A_51_P462192	0,037	1,18	NM_138648	Olr1
A_51_P291417	0,026	1,172	NM_009378	Thbd
A_51_P459176	0,013	1,162	XM_899837	1700095J03Rik
A_51_P122321	0,012	1,161	NM_133775	9230117N10Rik
A_51_P110301	0,023	1,158	NM_009778	C3
A_51_P294807	0,039	1,154	NM_013515	Stom
A_51_P504991	0,027	1,151	NM_181542	Slfn10
A_51_P440743	0,041	1,148	NM_009886	Celsr1
A_51_P141012	0,019	1,137	AK173296	Slitrk1
A_51_P445726	0,043	1,128	NM_011095	Lilrb3
A_51_P397968	0,03	1,087	AK087113	
A_51_P464408	0,034	1,078	NM_177314	5330439B14Rik
A_52_P597634	0,041	1,077	NM_021457	Fzd1
A_51_P149714	0,038	1,066	NM_026835	Ms4a6d
A_52_P409833	0,027	1,04	NM_008872	Plat
A_51_P172853	0,03	1,04	NM_009841	Cd14
A_52_P26161	0,026	1,039	NM_008987	Ptx3
A_52_P164821	0,034	1,038	XM_905096	LOC631323
A_52_P987411	0,036	1,038	AK032717	
A_51_P370552	0,037	1,037	NM_030061	9230117E20Rik
A_52_P616392	0,017	1,032	NM_183426	Stno
A_51_P181899	0,027	1,021	NM_028113	2600011E07Rik
A_52_P104075	0,037	1,021	AK052629	Frem1
A_52_P621991	0,048	1,019	NM_009684	Apaf1
A_52_P616949	0,036	1,014	NM_027893	Pvr14
A_51_P504988	0,022	1,01	NM_172796	Slfn9
A_52_P87713	0,031	1,008	NM_011593	Timp1
A_52_P1012710	0,034	1,005	AK075639	
A_52_P491718	0,049	-1,002	AK047841	Mbtps2
A_51_P191331	0,015	-1,003	NM_011379	Sipa1
A_52_P680941	0,028	-1,003	NM_010284	Ghr
A_52_P1027837	0,038	-1,003	AK034309	9330175M20Rik
A_52_P787453	0,021	-1,019	AK045835	
A_52_P484194	0,025	-1,023	NM_001025602	Il1rl1
A_52_P524426	0,03	-1,023	NM_001003815	Epb4.1l1
A_52_P828218	0,027	-1,027	NM_001030294	Olfm4
A_52_P674087	0,011	-1,028	AK036172	Prtg
A_52_P826055	0,032	-1,028	AK134458	2310020J12Rik
A_52_P563505	0,022	-1,033	AK007074	1700095A21Rik
A_52_P44454	0,015	-1,034	P052591-1	
A_51_P398037	0,018	-1,039	AK048407	Scn3a
A_52_P1132297	0,017	-1,058	AK052006	
A_52_P35598	0,034	-1,064	AK051891	D230015P20Rik
A_51_P151983	0,009	-1,066	NM_019744	Ncoa4
A_51_P130719	0,014	-1,066	NM_023047	Dpysl5
A_52_P218833	0,018	-1,066	ENSMUST000000000	
A_52_P1084199	0,022	-1,078	AK036139	9630039A02Rik
A_51_P138496	0,021	-1,08	AK046037	
A_52_P1124261	0,046	-1,086	AK081465	
A_52_P158438	0,023	-1,094	AK006669	1700041C23Rik
A_52_P187046	0,022	-1,098	NM_022724	Suv39h2

Fig. 19C

Probeset	Valor p	Log2 FC	ID	Simbolo
A_52_P344098	0,027	-1,098	AK040876	Pde7b
A_51_P314669	0,034	-1,1	NM_011128	Pnliiprp2
A_52_P475356	0,02	-1,107	NM_011445	Sox6
A_52_P177454	0,043	-1,114	AK045474	Rab34
A_52_P972196	0,015	-1,12	AK084612	
A_52_P1140731	0,024	-1,122	AK089673	
A_51_P249302	0,017	-1,125	NM_011994	Abcd2
A_52_P866925	0,031	-1,133	AK006067	1700017107Rik
A_52_P956057	0,026	-1,17	AK081935	
A_52_P939063	0,012	-1,171	AK032576	
A_51_P243750	0,037	-1,175	NM_012025	Racgap1
A_52_P205710	0,047	-1,189	NM_021611	Mylc2pl
A_52_P1188576	0,017	-1,197	AK082439	
A_51_P282523	0,032	-1,201	NM_054044	Gpr124
A_52_P642801	0,009	-1,202	XM_618738	Lats1
A_51_P312615	0,038	-1,207	NM_010377	Hist1h1t
A_52_P214828	0,022	-1,209	NM_011253	Rbmy1a1
A_52_P158660	0,024	-1,231	XM_001002308	4833417A11Rik
A_51_P104255	0,012	-1,237	NM_001039226	LOC625026
A_52_P811599	0,035	-1,244	AK084144	
A_52_P668855	0,016	-1,246	AK042778	9330154J02Rik
A_51_P399974	0,035	-1,246	NM_146997	Olfir178
A_52_P355709	0,007	-1,247	XM_973329	LOC664837
A_52_P207356	0,048	-1,249	AK052515	Aspm
A_52_P1188835	0,034	-1,256	NM_001002780	F830005K03Rik
A_51_P407915	0,013	-1,263	AK040806	A530026G17
A_51_P352743	0,045	-1,285	NM_001013616	Trim6
A_51_P191139	0,012	-1,293	AK050699	D030005H02Rik
A_52_P1139473	0,007	-1,294	AK018751	0610037L18Rik
A_52_P69506	0,042	-1,294	NM_177566	Arhgef15
A_52_P134003	0,042	-1,327	NM_001033289	Slc9a2
A_52_P519943	0,004	-1,337	BC044804	Fads6
A_51_P366413	0,009	-1,394	AK033346	8030498J20Rik
A_52_P988314	0,029	-1,401	AK083509	
A_52_P778486	0,029	-1,404	AK016521	4932412D23Rik
A_52_P162486	0,009	-1,409	NM_007542	Bgn
A_51_P242952	0,032	-1,411	AK079868	
A_52_P267243	0,039	-1,413	NM_010200	Fgf13
A_52_P328714	0,018	-1,422	AK133758	Fbxw2
A_51_P238040	0,018	-1,424	AK030263	
A_51_P327166	0,006	-1,426	AK015801	
A_51_P201035	0,027	-1,443	NM_145924	Cenpi
A_52_P169595	0,034	-1,455	NM_177669	A630098G03Rik
A_52_P507877	0,04	-1,463	NM_007729	Col11a1
A_52_P224818	0,012	-1,468	NM_172483	Zfp180
A_51_P270050	0,041	-1,485	AK078370	6530421E24Rik
A_51_P309099	0,02	-1,489	AK050657	
A_51_P103261	0,034	-1,533	NM_009198	Slc17a1
A_52_P535430	0,021	-1,561	NM_207130	Abca16
A_52_P1083387	0,015	-1,585	AK005856	1700011B04Rik
A_51_P152873	0,014	-1,71	NM_207670	Gripap1
A_52_P569873	0,012	-1,778	XM_127913	4930455B06Rik
A_51_P396119	0,008	-2,489	AK047973	Ttll5

Fig.20



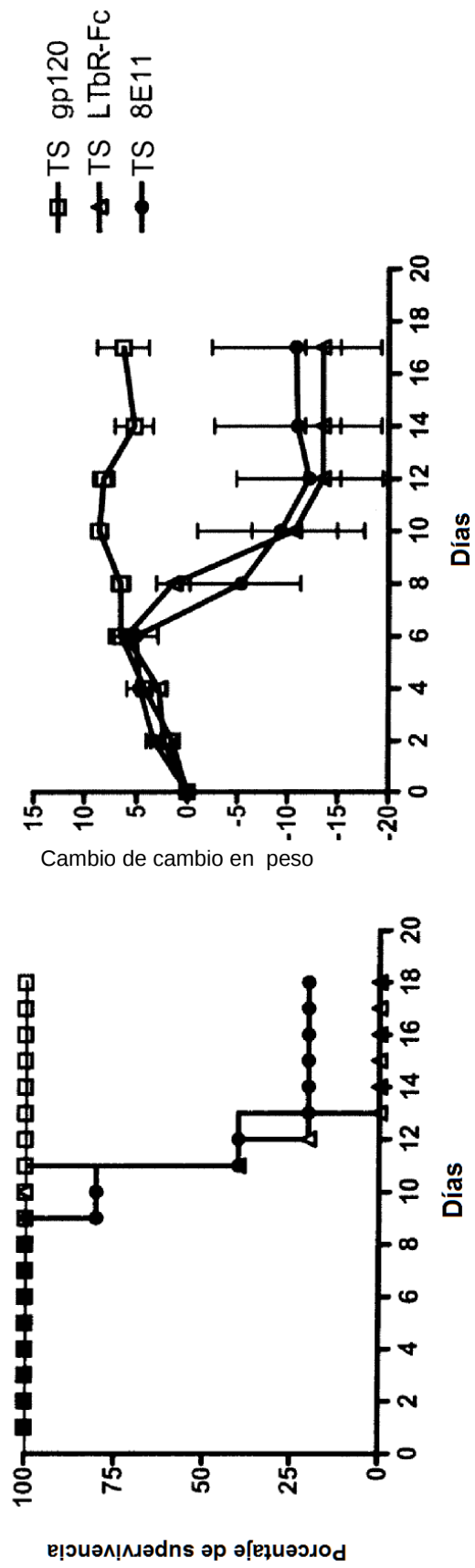
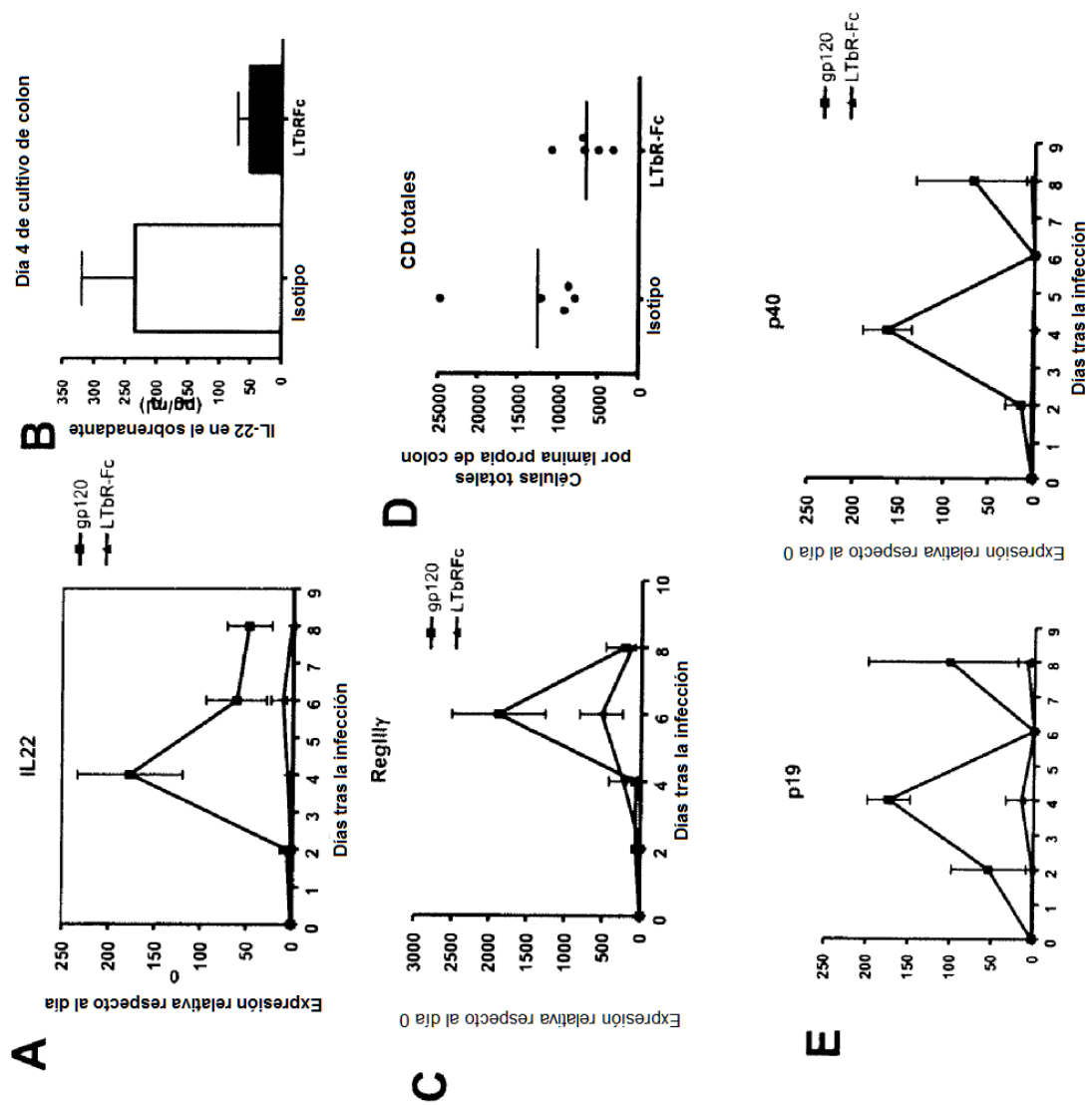


Fig. 21

Fig. 22



A.

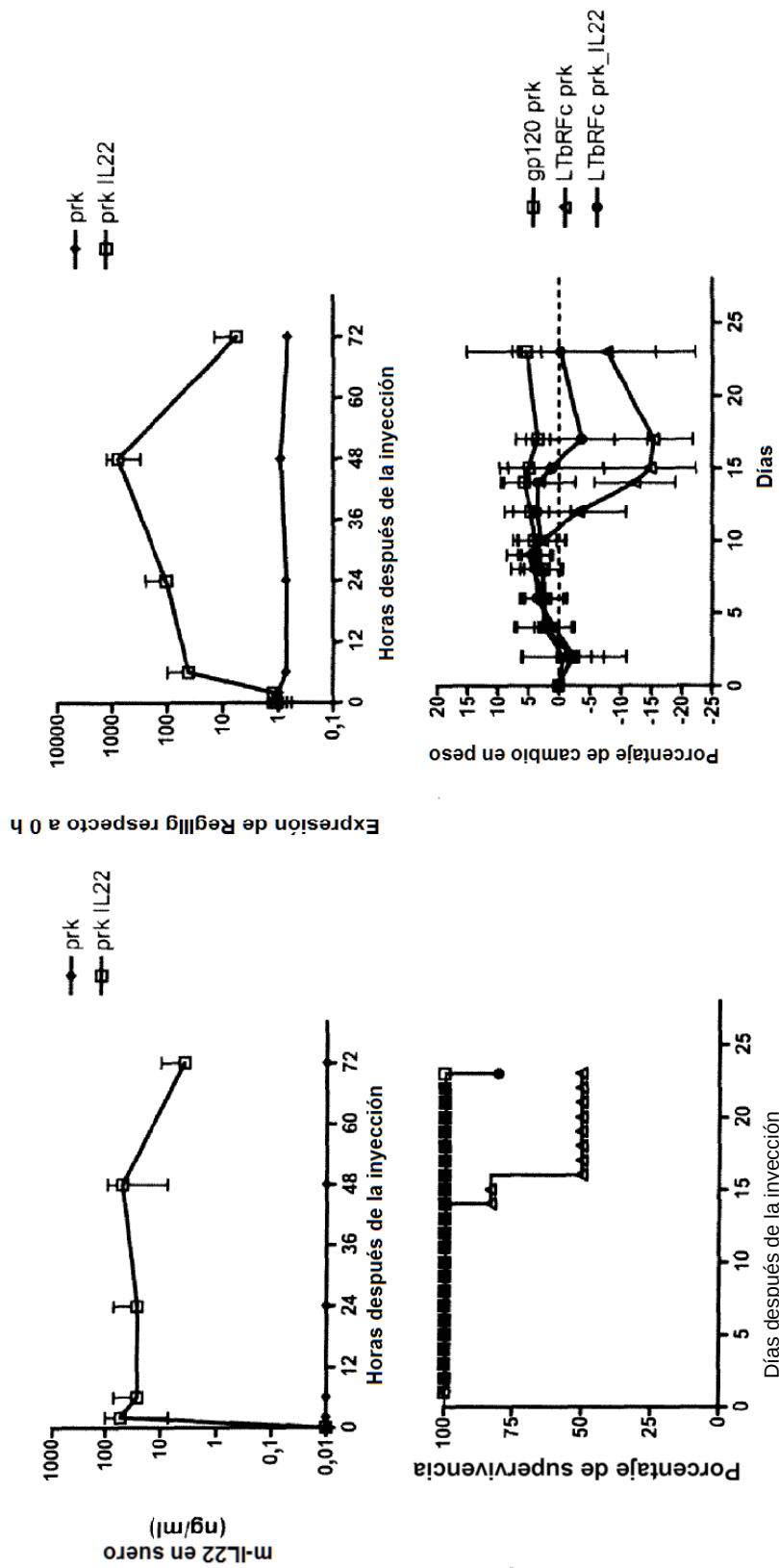


Fig. 23

Fig. 24

