



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 220**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04718824 .8**

96 Fecha de presentación : **09.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1601694**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2005**

54 Título: **Usos de antagonistas de IL-23; reactivos relacionados.**

30 Prioridad: **10.03.2003 US 453672 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2009

73 Titular/es: **Schering Corporation**
2000 Galloping Hill Road
Kenilworth, New Jersey 07033-0530, US

72 Inventor/es: **Oft, Martin y**
McClanahan, Terrill, K.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 330 220 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

Usos de antagonistas de IL-23; reactivos relacionados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a usos de moléculas de citoquina de mamífero y reactivos relacionados. Más específicamente, la invención se refiere a la identificación de proteínas similares a citoquina de mamífero e inhibidores de las mismas, que se pueden usar en el tratamiento de trastornos proliferativos.

10

Antecedentes de la invención

El sistema inmune puede controlar o erradicar cánceres y tumores. El sistema inmune incluye varios tipos de células linfoides y mieloides, por ejemplo, monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC), eosinófilos, células T, células B y neutrófilos. Estas células linfoides y mieloides producen proteínas de señalización secretadas conocidas como citoquinas. Las citoquinas incluyen, por ejemplo, interleuquina-10 (IL-10), interferón-gamma (IFN γ), IL-12 e IL-23. La respuesta inmune incluye inflamación, es decir, la acumulación de células inmunes sistémicamente o en un emplazamiento particular del organismo. En respuesta a un agente infeccioso o sustancia extraña, las células inmunes secretan citoquinas las cuales, a su vez, modulan la proliferación, desarrollo, diferenciación o migración de las células inmunes, por ejemplo, cuando implica inflamación excesiva, como en los trastornos auto-inmunes, mientras que la respuesta inmune deteriorada puede dar como resultado cáncer. La respuesta antitumoral por el sistema inmune incluye inmunidad innata, por ejemplo, mediada por macrófagos, células NK y neutrófilos e inmunidad adaptativa, por ejemplo, mediada por células presentadoras de antígeno (APC), células T y células B (véase, por ejemplo, Abbas, *et al.* (eds.) (2000) *Cellular and Molecular Immunology*, W. B. Saunders Co., Filadelfia, PA; Oppenheim y Feldmann (eds.) (2001) *Cytokine Reference*, Academic Press, San Diego, CA; von Andrian y Mackay (2000) *New Engl. J. Med.* 343: 1020-1034; y Davidson y Diamond (2001) *New Engl. J. Med.* 345: 340-350).

En el tratamiento de cánceres, por ejemplo, melanoma se han usado métodos de modulación de la respuesta inmune. Estos métodos incluyen tratamiento con citoquinas o anticuerpos anti-citoquinas, tales como IL-2, IL-12, factor de necrosis tumoral- α (FNT α), IFN γ , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y factor de crecimiento transformante (TGF). Donde una célula cancerosa puede producir una citoquina que mejora su propio crecimiento o su propia supervivencia, un anticuerpo anti-citoquina puede ser un agente terapéutico adecuado (véase, por ejemplo, Ramirez-Montagut, *et al.* (2003) *Oncogene* 22: 3180-3187; Braun, *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164: 4025-4031; Shaw, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161: 2817-2824; Coussens y Werb (2002) *Nature* 420: 860-867; Baxevanis, *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164: 3902-3912; Shimizu, *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163: 5211-5218; Belardelli y Ferrantini (2002) *TRENDS Immunol.* 23: 201-208; Seki, *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168: 3484-3492; Casares, *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171: 5931-5939; y Oft, *et al.* (2002) *Nature Cell Biol.* 4: 487-494).

La interleuquina-23 (IL-23) es una citoquina heterodimérica comprendida de dos subunidades, es decir, p19 y p40. La subunidad p19 está relacionada estructuralmente con IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), y la subunidad p35 de IL-12. La subunidad p40 de IL-23 también es parte de IL-12, una citoquina heterodimérica que comprende p35 y p40. IL-23 media la señalización por unión a un receptor heterodimérico, comprendido de IL-23R e IL-12Rbeta1. La subunidad IL-12Rbeta1 es compartida por el receptor de IL-12, que está compuesto de IL-12Rbeta e IL-12Rbeta2. Muchos de los primeros estudios demostraron que las consecuencias fisiológicas de una deficiencia genética en p40 (ratón knockout de p40; ratón p40KO; ratón p40^{-/-}), eran diferentes de, por ejemplo, más graves o menos graves, que las presentes en un ratón p35KO. Algunos de estos resultados se explicaron finalmente mediante el descubrimiento de IL-23 y el hallazgo de que p40KO evita la expresión de IL-12 e IL-23 (Oppmann, *et al.* (2000) *Immunity* 13: 715-725; Wiekowski, *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166: 7563-7570; Parham, *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168, 5699-708; Frucht (2002) *Sci STKE* 2002, E1-E3; Elkins, *et al.* (2002) *Infection Immunity* 70: 1936-1948; y Cua, *et al.* (2003) *Nature* 421: 744-748).

Los presentes métodos para el tratamiento de cáncer no son completamente eficaces, y citoquinas tales como IL-12 o IFN γ producen efectos secundarios tóxicos (véase, por ejemplo, Naylor y Hadden (2003) *Int. Immunopharmacol.* 3: 1205-1215; Fernández, *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162: 609-617). La presente invención aborda estos problemas, proporcionando métodos de uso de antagonistas de IL-23.

60 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa en el descubrimiento de que un agonista o antagonista de IL-23 puede modular el crecimiento tumoral.

La presente invención proporciona el uso de un antagonista de IL-23 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores, como se indica en la reivindicación 1. También se proporciona el uso anterior, en el que el antagonista de IL-23 inhibe o previene el crecimiento de tumores; así como el uso anterior, en el que la célula tumoral

expresa IL-23. La presente invención proporciona el método anterior, en el que el antagonista de IL-23 comprende una composición de unión que une específicamente un polipéptido o ácido nucleico de p19 (SEC ID N°: 1, 2, 3 ó 4); o el uso anterior, en el que la composición de unión comprende: un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo; un ácido nucleico antisentido o ARN de interferencia pequeño (siRNA); y el uso anterior, en el que la composición de unión comprende: un anticuerpo policlonal; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo o un fragmento Fab, Fv o F(ab')₂.

Otra realización de la presente invención proporciona el uso anterior en el que la célula tumoral es: una célula de cáncer de colon; una célula de cáncer de ovario; una célula de cáncer mamario o una célula de melanoma.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un antagonista de IL-23 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que sufre de un cáncer o un tumor que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de IL-23 como se ha indicado en la reivindicación 10; y el uso anterior, en el que el antagonista de IL-23 inhibe: crecimiento del cáncer o tumor; caquexia; anorexia o angiogénesis. También se proporciona el uso anterior, en el que el antagonista de IL-23 comprende una composición de unión que une específicamente un polipéptido o ácido nucleico de: p19 (SEC ID N°: 1, 2, 3 ó 4). La presente invención proporciona el uso anterior, en el que la composición de unión comprende: un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo; un ácido nucleico antisentido o ARN de interferencia pequeño (siRNA); y el uso anterior, en el que la composición de unión comprende: un anticuerpo policlonal; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo; o un fragmento Fab, Fv o F(ab')₂.

En otra realización, la invención proporciona el uso anterior, en el que el cáncer o tumor es del: tracto gastrointestinal; tracto respiratorio; sistema reproductivo; o sistema endocrino; así como el uso anterior, en el que el cáncer o tumor es: cáncer de colon; cáncer de ovario; un melanoma; o cáncer mamario.

En otro aspecto la presente invención proporciona un método para determinar si las células tumorales expresan IL-23 que comprende poner en contacto una muestra de un sujeto con un antagonista como se ha indicado en la reivindicación 19, así como el método anterior, en el que la composición de unión comprende una sonda de ácido nucleico o cebador que se une específicamente o hibrida al polinucleótido de SEC ID N°: 1.

Otra realización de la presente invención proporciona un equipo para determinar si las células tumorales expresan IL-23 que comprende un antagonista de IL-23 como se ha indicado en la reivindicación 21 y un compartimento o instrucciones para uso o evacuación. También se proporciona el equipo anterior, en el que el antagonista comprende un anticuerpo que se une específicamente a p19 (SEC ID N°: 2).

Descripción detallada

Como se usa en este documento, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras tales como “un”, “una” y “la” incluyen sus referencias plurales correspondientes, a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. Todas las referencias citadas en este documento se incorporan como referencia en el mismo alcance como si se indicara que cada publicación, solicitud de patente o patente individual, se incorporara específicamente e individualmente como referencia.

I. Definiciones

“Activación”, “estimulación” y “tratamiento”, como se aplican a células o a receptores, pueden tener el mismo significado, por ejemplo, activación, estimulación o tratamiento de una célula o receptor con un ligando, a menos que se indique de otra manera mediante el contexto o explícitamente. “Ligando” abarca ligandos naturales y sintéticos, por ejemplo, citoquinas, variantes de citoquina, análogos, muteínas y composiciones de unión obtenidas de anticuerpos. “Ligando” abarca también moléculas pequeñas, por ejemplo, miméticos de péptidos de citoquinas y miméticos de péptidos de anticuerpos. “Activación” puede referirse a activación celular regulada por mecanismos internos, así como por factores externos o ambientales. “Respuesta”, por ejemplo, de una célula, tejido, órgano u organismo, abarca un cambio en el comportamiento bioquímico o fisiológico, por ejemplo, concentración, densidad, adhesión o migración dentro de un compartimento biológico, velocidad de expresión génica o estado de diferenciación, en el que el cambio se correlaciona con activación, estimulación o tratamiento, o con mecanismos internos tales como programación genética.

La “actividad” de una molécula puede describir o referirse a la unión de la molécula a un ligando o a un receptor, para actividad catalítica; a la capacidad para estimular expresión génica o señalización, diferenciación o maduración celular; a actividad antigénica; a la modulación de actividades de otras moléculas y similares. La “actividad” de una molécula puede referirse también a actividad en la modulación o el mantenimiento de interacciones de célula a célula, por ejemplo, adhesión, o actividad para mantener una estructura de una célula, por ejemplo, membranas celulares o citoesqueleto. La “actividad” puede significar también actividad específica, por ejemplo, [actividad catalítica]/[mg de proteína] o [actividad inmunológica]/[mg de proteína], concentración en un compartimento biológico, o similares. La “actividad proliferativa” abarca una actividad que promueve, que es necesaria para, o que se asocia específicamente

ES 2 330 220 T3

con, por ejemplo, división celular normal, así como cáncer, tumores, displasia, transformación celular, metástasis y angiogénesis.

5 “Administración” y “tratamiento”, como se aplican a un animal, ser humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o líquido biológico, se refieren al contacto de un agente de diagnóstico, composición o compuesto terapéutico farmacéutico exógeno con el animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o líquido biológico. “Administración” y “tratamiento” se pueden referir, por ejemplo, a métodos terapéuticos, de placebo, farmacocinéticos, de diagnóstico, de investigación y experimentales. “Tratamiento de una célula” abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula. La “administración” y el 10 “tratamiento” significan también tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, mediante una composición de unión de diagnóstico de reactivo o mediante otra célula. El “tratamiento”, como se aplica a un sujeto humano, veterinario o de investigación, se refiere a tratamiento terapéutico, medidas profilácticas o preventivas, para aplicaciones de investigación y de diagnóstico. El “tratamiento”, como se aplica a un sujeto humano, veterinario o de investigación, de célula, tejido u órgano, abarca el contacto de un agonista de IL-23 o antagonista de IL-23 con un sujeto humano o animal, una célula, tejido, compartimento fisiológico o líquido fisiológico. El “tratamiento de una célula”, abarca también situaciones en las que el agonista de IL-23 o antagonista de IL-23 entra en contacto con el receptor de IL-23 (heterodímero de IL-23R e IL-12Rbeta1), por ejemplo, en la fase líquida o fase coloidal, así como situaciones en las que el agonista o antagonista entra en contacto con un fluido, por ejemplo, donde el fluido está en contacto con una célula o receptor, pero donde no se ha demostrado que el agonista o antagonista entra en contacto con la célula o el 20 receptor.

La “composición de unión” se refiere a una molécula, molécula pequeña, macromolécula, anticuerpo, un fragmento o análogo de los mismos, o receptor soluble, capaz de unirse a una diana. La “composición de unión” puede referirse también a un complejo de moléculas, por ejemplo, un complejo no covalente, a una molécula ionizada o a una 25 molécula modificada covalentemente o no covalentemente, por ejemplo, modificada mediante fosforilación, acilación, entrecruzamiento, ciclización o escisión limitada, la cual es capaz de unirse a una diana. La “composición de unión”, puede referirse también a una molécula en combinación con un estabilizante, excipiente, sal, tampón, disolvente o aditivo. La “unión” puede definirse como una asociación de la composición de unión con una diana, donde la asociación da como resultado la reducción en el movimiento Browniano normal de la composición de unión, en casos en los que 30 la composición de unión puede disolverse o suspenderse en solución.

“Caquexia” es un síndrome de agotamiento que implica pérdida de músculo (agotamiento muscular) y grasa, que se produce como resultado de un trastorno en el metabolismo. La caquexia ocurre en diversos cánceres, trastorno obstructivo pulmonar crónico (COPD), insuficiencia de órganos avanzada y SIDA. La “caquexia del cáncer” es la 35 caquexia que ocurre con el cáncer. La caquexia del cáncer se caracteriza, por ejemplo, por pérdida de peso marcada, anorexia, astenia y anemia. La anorexia es un trastorno que se produce como resultado de la falta de motivación para comer, por ejemplo, aversión al alimento (véase, por ejemplo, MacDonald, *et al.* (2003) *J. Am. Coll. Surg.* 197: 143-161; Rubin (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5384-5389; Tisdale (2002) *Nature Reviews Cancer* 2: 862-871; Argiles, *et al.* (2003) *Drug Discovery Today* 8: 838-844; Lelli, *et al.* (2003) *J. Chemother.* 15: 220-225; y Argiles, *et al.* (2003) *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 6: 401-406). 40

“Variantes conservativamente modificadas” se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes conservativamente modificadas se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o prácticamente idénticas o, donde el 45 ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, para secuencias de ácido nucleico esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos puede codificar cualquier proteína dada.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, el especialista en la técnica reconocerá que una sustitución individual a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína, que sustituye a un aminoácido o un porcentaje 50 pequeño de aminoácidos en la secuencia codificada por un aminoácido conservado, es una “variante conservativamente modificada”. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen en la técnica. Un ejemplo de una sustitución conservativa es el intercambio de un aminoácido en uno de los siguientes grupos por otro aminoácido del mismo grupo (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.767.063, expedida a Lee, *et al.*; y Kyte y Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.* 157: 105-132): 55

- (1) Hidrófobos: Norleucina, Ile, Val, Leu, Phe, Cys o Met;
- (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;

- (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe;
- (7) Aminoácidos pequeños: Gly, Ala, Ser.

5

“Cantidad eficaz” abarca una cantidad suficiente para mejorar o prevenir un síntoma o signo de la afección médica. Cantidad eficaz significa también una cantidad suficiente para permitir o facilitar el diagnóstico. Una cantidad eficaz para un paciente o sujeto veterinario particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se esté tratando, la salud general del paciente, el método, la vía y dosis de administración, y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.888.530, expedida a Netti, *et al.*). Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o protocolo de dosificación que evita efectos secundarios o efectos tóxicos significativos. El efecto dará como resultado una mejora de una medida o parámetro de diagnóstico en al menos el 5%, habitualmente en al menos el 10%, más habitualmente al menos el 20%, muy habitualmente al menos 30%, preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, lo más preferible es que sea al menos el 60%, idealmente al menos el 70%, más idealmente al menos el 80% y muy idealmente al menos el 90%, donde el 100% se define como el parámetro de diagnóstico mostrado por un sujeto normal (véase, por ejemplo, Maynard, *et al.* (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Ratón, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, Reino Unido).

20 “Exógeno” se refiere a sustancias que se producen fuera de un organismo, célula o cuerpo humano, dependiendo del contexto. “Endógeno” se refiere a sustancias que se producen dentro de una célula, organismo o cuerpo humano, dependiendo del contexto.

25 “Afección inmune” o “trastorno inmune” abarca, por ejemplo, inflamación patológica, un trastorno inflamatorio y un trastorno o enfermedad autoinmune. La “afección inmune” se refiere también a infecciones, infecciones persistentes y afecciones proliferativas, tales como cáncer, tumores y angiogénesis, incluyendo infecciones, tumores y cánceres que resisten a la erradicación por el sistema inmune. La “afección cancerosa” incluye, por ejemplo, cáncer, células cancerosas, tumores, angiogénesis y afecciones precancerosas tales como displasia.

30 “Trastorno inflamatorio” significa un trastorno o proceso patológico en el que la patología se produce como resultado, totalmente o en parte, de, por ejemplo, un cambio en número, cambio en velocidad de migración o cambio en activación, de células del sistema inmune. Las células del sistema inmune incluyen, por ejemplo, células T, células B, monocitos o macrófagos, células presentadoras de antígeno (APC), células dendríticas, microglia, células NK, células NKT, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos o cualquier otra célula asociada específicamente con la inmunología, por ejemplo, células epiteliales o endoteliales que producen citoquinas.

35 “Inhibidores” y “antagonistas” o “activadores” y “agonistas”, se refieren a moléculas inhibitoras o activadoras, respectivamente, por ejemplo, para la activación de, por ejemplo, un ligando, receptor, cofactor, gen, célula, tejido u órgano. Un modulador de, por ejemplo, un gen, un receptor, un ligando o una célula, es una molécula que altera una actividad del gen, receptor, ligando o célula, donde la actividad se puede activar, inhibir o alterar en sus propiedades reguladoras. El modulador puede actuar solo o puede usar un cofactor, por ejemplo, una proteína, ión metálico o molécula pequeña. Los inhibidores son compuestos que disminuyen, bloquean, evitan, retardan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan a la baja, por ejemplo, un gen, proteína, ligando, receptor o célula. Los activadores son compuestos que aumentan, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o regulan positivamente, por ejemplo, un gen, proteína, ligando, receptor o célula. Un inhibidor puede definirse también como una composición que reduce, bloquea o inactiva una actividad constitutiva. Un “agonista” es un compuesto que interacciona con una diana para causar o promover un aumento en la activación de la diana. Un “antagonista” es un compuesto que se opone a las acciones de un agonista. Un antagonista evita, reduce, inhibe o neutraliza la actividad de un agonista. Un antagonista puede también evitar, inhibir o reducir la actividad constitutiva de una diana, por ejemplo, un receptor diana, aún donde no existe un agonista identificado.

50 Para examinar el alcance de inhibición, por ejemplo, muestras o ensayos que comprenden, por ejemplo, una proteína, gen, célula u organismo determinado, se tratan con un activador o inhibidor potencial y se comparan con muestras de control sin el inhibidor. A las muestras de control, es decir, no tratadas con antagonista, se les asigna un valor de actividad relativa del 100%. Se consigue inhibición cuando el valor de actividad con respecto al control es de aproximadamente el 90% o menos, típicamente el 85% o menos, más típicamente el 80% o menos, muy típicamente el 75% o menos, en general el 70% o menos, más generalmente el 65% o menos, muy generalmente el 60% o menos, típicamente el 55% o menos, habitualmente el 50% o menos, más habitualmente el 45% o menos, muy habitualmente el 40% o menos, preferiblemente el 35% o menos, más preferiblemente el 30% o menos, aún más preferiblemente el 25% o menos y lo más preferible es que sea menos del 25%. Se consigue activación cuando el valor de actividad con respecto al control es de aproximadamente el 110%, en general al menos el 120%, más generalmente al menos el 140%, muy generalmente al menos el 160%, con frecuencia al menos el 180%, con mayor frecuencia al menos dos veces, con mayor frecuencia al menos 2,5 veces, habitualmente al menos 5 veces, más habitualmente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 20 veces, más preferiblemente al menos 40 veces y lo más preferible es que sea más de 40 veces mayor.

ES 2 330 220 T3

Los puntos finales en activación o inhibición pueden controlarse de la manera siguiente. La activación, inhibición y respuesta al tratamiento, por ejemplo, de una célula, líquido fisiológico, tejido, órgano y sujeto animal o humano, puede controlarse mediante un punto final. El punto final puede comprender una cantidad o porcentaje predeterminado de, por ejemplo, un indicio de inflamación, oncogenicidad o desgranulación o secreción celular, tal como la liberación de una citoquina, oxígeno tóxico o una proteasa. El punto final puede comprender, por ejemplo, una cantidad predeterminada de flujo o transporte iónico; migración celular; adhesión celular; proliferación celular; potencial para metástasis; diferenciación celular y cambio en fenotipo, por ejemplo, cambio en expresión de genes que se relacionan con inflamación, apoptosis, transformación, ciclo celular o metástasis (véase, por ejemplo, Knight (2000) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30: 145-158; Hood y Cheresch (2002) *Nature Rev. Cancer* 2: 91-100; Timme, *et al.* (2003) *Curr. Drug Targets* 4: 251-261; Robbins e Itzkowitz (2002) *Med. Clin. North Am.* 86: 1467-1495; Grady y Markowitz (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3: 101-128; Bauer, *et al.* (2001) *Glia* 36: 235-243; y Stanimirovic y Satoh (2000) *Brain Pathol.* 10: 113-126).

Un punto final de inhibición es generalmente el 75% del control o menos, preferiblemente el 50% del control o menos, más preferiblemente el 25% del control o menos, y lo más preferible es que sea el 10% del control o menos. En general, un punto final de activación es al menos el 150% del control, preferiblemente al menos dos veces el control, más preferiblemente al menos cuatro veces el control y lo más preferible es que sea al menos 10 veces el control.

Una composición que está “marcada” es detectable, ya sea directamente o indirectamente, mediante métodos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, isotópicos o químicos. Por ejemplo, marcadores útiles incluyen ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{14}C , ^3H , ^{125}I , isótopos estables, colorantes fluorescentes, reactivos de densidad electrónica, substratos, marcadores de epítipo o enzimas, por ejemplo, como se usan en inmunoensayos ligados a enzima o fluorettes (véase, por ejemplo, Rozinov y Nolan (1998) *Chem. Biol.* 5: 713-728).

“Ligando” se refiere, por ejemplo, a una molécula pequeña, péptido, polipéptido y molécula asociada a membrana o unida a membrana, o complejo de los mismos, que puede actuar como un agonista o antagonista de un receptor. “Ligando” abarca también un agente que no es un agonista o antagonista, pero que puede unirse al receptor sin que influya significativamente sobre sus propiedades biológicas, por ejemplo, señalización o adhesión. Además, el “ligando” incluye un ligando unido a membrana que se ha cambiado, por ejemplo, mediante métodos químicos o recombinantes, a una versión soluble del ligando unido a membrana. Por convención, donde un ligando está unido a membrana en una primera célula, el receptor se encuentra habitualmente en una segunda célula. La segunda célula puede tener la misma identidad o una identidad diferente a la primera célula. Un ligando o receptor puede ser enteramente intracelular, es decir, puede residir en el citosol, núcleo o algún otro compartimento intracelular. El ligando o receptor puede cambiar su emplazamiento, por ejemplo, desde un compartimento intracelular hasta la cara exterior de la membrana plasmática. El complejo de un ligando y receptor se denomina un “complejo ligando receptor”. Cuando un ligando y receptor están implicados en una ruta de señalización, el ligando se encuentra en una posición cadena arriba y el receptor se encuentra en una posición cadena abajo de la ruta de señalización.

Se proporcionan “moléculas pequeñas” para el tratamiento de fisiología y trastornos de tumores y cánceres. La expresión “molécula pequeña” se define como una molécula con un peso molecular que es menor de 10 kD, típicamente menor de 2 kD y preferiblemente menor de 1 kD. Las moléculas pequeñas incluyen, pero no están limitadas a, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, moléculas orgánicas que contienen un componente inorgánico, moléculas que comprenden un átomo radiactivo, moléculas sintéticas, miméticos de péptido y miméticos de anticuerpo. Como un agente terapéutico, una molécula pequeña puede ser más permeable a células, menos sensible a la degradación y menos apta para inducir una respuesta inmune que las moléculas grandes. Se describen moléculas pequeñas, tales como miméticos de péptido de anticuerpos y citoquinas, así como toxinas de molécula pequeña (véase, por ejemplo, Casset, *et al.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 198-205; Muyldermans (2001) *J. Biotechnol.* 74: 277-302; Li (2000) *Nat. Biotechnol.* 18: 1251-1256; Apostolopoulos, *et al.* (2002) *Curr. Med. Chem.* 9: 411-420; Monfardini, *et al.* (2002) *Curr. Pharm. Des.* 8: 2185-2199; Domingues, *et al.* (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6: 652-656; Sato y Sone (2003) *Biochem. J.* 371: 603-608; y la Patente de Estados Unidos N° 6.326.482 expedida a Stewart, *et al.*).

Que se une “específicamente” o “selectivamente”, cuando se hace referencia a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno u otro par de unión, indica una reacción de unión que es determinativa de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros materiales biológicos. Por tanto, en condiciones indicadas, un ligando especificado se une a un receptor particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. El anticuerpo, o composición de unión obtenida del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, del método contemplado se une a su antígeno o una variante o muténa del mismo, con una afinidad que es al menos dos veces mayor, preferiblemente al menos diez veces mayor, más preferiblemente al menos 20 veces mayor y lo más preferible es que sea al menos 100 veces mayor que la afinidad con cualquier otro anticuerpo o composición de unión derivada del mismo. En una realización preferida, el anticuerpo tendrá una afinidad que es mayor de aproximadamente 10^9 litros/mol, según se determina, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard (véase Munsen, *et al.* (1980) *Analyt. Biochem.* 107: 220-239).

II. General

Se describen métodos de uso de polipéptidos, ácidos nucleicos, variantes, muteínas y miméticos del heterodímero de IL-23, subunidad p19, subunidad p40, el heterodímero del receptor de IL-23, subunidad de IL-23R o subunidad de IL-12Rbeta1. Se proporcionan también métodos para el uso de una hiperquina, es decir, una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, la subunidad p19 enlazada a la subunidad p40, así como ácidos nucleicos que codifican la hiperquina (véase, por ejemplo, SEC ID N°: 10 u 11) (Oppmann, *et al.*, citado anteriormente; Fischer, *et al.* (1997) *Nature Biotechnol.* 15: 142-145; Rakemann, *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 1257-1266; y Peters, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161: 3575-3581).

La interleuquina-23 (IL-23; conocida también como IL-B30) es una citoquina heterodimérica compuesta de una subunidad p19 novedosa (SEC ID N°: 2 ó 4) y la subunidad p40 (SEC ID N°: 8 ó 9) de IL-12 (Oppmann, *et al.*, citado anteriormente). Al igual que p35, p19 requiere co-expresión de p40 para actividad biológica (Wiekowski, *et al.*, citado anteriormente). El receptor de IL-23 comprende una subunidad novedosa del receptor (IL-23R; SEC ID N°: 6) que une p19 e IL-12Rbeta1 (SEC ID N°: 7) que une p40 (véase, por ejemplo, Parham, *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168: 5699-5708). Estas dos subunidades del receptor forman el complejo de señalización funcional y se expresan en células T de memoria CD4⁺CD45Rb^{lo} así como macrófagos de médula ósea activados por IFNgamma (Parham, *et al.*, citado anteriormente).

Se pueden generar anticuerpos para diversas proteínas de citoquinas, incluyendo variantes individuales, polimórficas, alélicas, de cepa o de especie, y fragmentos de las mismas, tanto en sus formas de origen natural (longitud completa) como en sus formas recombinantes (véase, por ejemplo, SEC ID N°: 2, 4, 10 u 11). Además, se pueden generar anticuerpos para proteínas receptoras (véase, por ejemplo, SEC ID N°: 6) tanto en sus formas nativas (o activas) como en sus formas inactivas, por ejemplo, desnaturalizadas. Se pueden usar también anticuerpos anti-idiotípicos.

La administración de un agonista de IL-23, es decir, IL-23 o hiperquina IL-23 puede inducir, por ejemplo, proliferación de células T de memoria, blastos PHA, y células T CD45RO; y mejora de la producción de interferón-gamma (IFNgamma) por blastos PHA o células T CD45RO. Por el contrario a IL-12, IL-23 estimula preferiblemente poblaciones de células T de memoria a diferencia de poblaciones de células T sin tratar tanto en el ser humano como en ratón. IL-23 activa varias moléculas de señalización celular intracelulares, por ejemplo, Jak2, Tyk2, Stat1, Stat2, Stat3 y Stat4. IL-12 activa este mismo grupo de moléculas, pero la respuesta de Stat4 a IL-23 es relativamente débil, mientras que la respuesta de Stat4 a IL-12 es fuerte (Oppmann, *et al.*, citado anteriormente; Parham, *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168: 5699-5708).

IL-12 e IL-23 emplean mecanismos similares de transducción de señal. IL-23 que emplea su complejo de receptores, activa a Jak2, Tyk2 y Stat-1, -3, -4 y -5, como lo hace IL-12. Sin embargo, la activación de Stat-4 es significativamente más débil en respuesta a IL-23 que a IL-12. Asimismo, por el contrario a IL-12, la Stat más importante inducida por IL-23 es Stat-3 (véase, por ejemplo, Parham, *et al.*, citado anteriormente).

La administración de la subunidad p19 de IL-23 puede dar como resultado, por ejemplo, crecimiento atrofiado, infertilidad y muerte de animales, así como infiltrados inflamatorios, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal, pulmones, piel e hígado e hiperplasia de células epiteliales, anemia microcítica, recuento de neutrófilos aumentado, FNT-alfa aumentado en suero; y expresión aumentada de genes de fase aguda en el hígado (véase Wiekowski, *et al.*, citado anteriormente). Ocurrió expresión mejorada de IL-23 en líneas de células epiteliales inmortalizadas no transformadas. Por tanto, IL-23 puede proporcionar una señal temprana de potencial tumoral *in vivo*.

Otros estudios han demostrado que IL-23 modula la respuesta inmune a infección (véase, por ejemplo, Pirhonen, *et al.* (2002) *J. Immunol.* 169: 5673-5678; Broberg, *et al.* (2002) *J. Interferon Cytokine Res.* 22: 641-651; Elkins, *et al.* (2002) *Infection Immunity* 70: 1936-1948; y Cooper, *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168: 1322-1327).

Con respecto a cáncer, la presencia de una cantidad relativamente alta de transcritos en tejido usado para biopsias de un individuo, indica una predisposición para el desarrollo de la enfermedad o puede proporcionar medios para detectar la enfermedad antes de la aparición de síntomas clínicos reales. Los datos de la expresión génica son una herramienta útil en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades y procesos patológicos (véase, por ejemplo, Li y Wong (2001) *Genome Informatics* 12: 3-13; Lockhart, *et al.* (1996) *Nature Biotechnol.* 14: 1675-1680; Homey, *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164: 3465-3470; Debets, *et al.* (2000) *J. Immunol.* 165: 4950-4956).

III. Agonistas, Antagonistas y Composiciones de Unión

Se describen métodos de uso de agonistas y antagonistas de IL-23. Un agonista de IL-23 abarca, por ejemplo, IL-23, una variante, muteína, hiperquina o mimético de péptido de IL-23, anticuerpos agonistas para IL-23R, y ácidos nucleicos que codifican estos agonistas. Los antagonistas de IL-23 incluyen, por ejemplo, anticuerpos para IL-23, anticuerpos de bloqueo para IL-23R, un receptor soluble basado en la región extracelular de una subunidad del IL-23R, miméticos de péptido para el mismo y ácidos nucleicos que codifican estos antagonistas.

ES 2 330 220 T3

Se describen métodos de uso de agonistas y antagonistas de p19, el complejo de p19 y p40, IL-23R, y el complejo de IL-23R e IL-12Rbeta1, incluyendo composiciones de unión que se unen específicamente a proteínas y complejos de proteína de p19, el complejo de p19 y p40, IL-23R y el complejo de IL-23R e IL-12Rbeta1.

5 Una hiperquina de IL-23 abarca, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende la secuencia polipeptídica de p19 y p40, donde p19 y p40 se encuentran en una cadena polipeptídica continua. Las secuencias de p19 y p40 pueden estar en cualquier orden. La proteína de fusión puede contener una secuencia de enlazador, que reside entre las secuencias de p19 y p40, en una cadena polipeptídica continua.

10 Se pueden usar regiones de antigenicidad aumentada para la generación de anticuerpos. Las regiones de antigenicidad aumentada de p19 de humano se encuentran, por ejemplo, en los aminoácidos 16-28; 57-87; 110-114; 136-154 y 182-186 de AAQ89442 del GenBank (gi: 37183284). Las regiones de antigenicidad aumentada de IL-23R de humano se encuentran, por ejemplo, en los aminoácidos 22-33; 57-63; 68-74; 101-112; 117-133; 164-177; 244-264; 294-302; 315-326; 347-354; 444-473; 510-530 y 554-558 de AAM44229 del GenBank (gi: 21239252). El análisis se realizó mediante una gráfica de Parker usando el Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD). La presente invención proporciona también un antagonista de IL-23 que es un receptor soluble, es decir, que comprende una región extracelular de IL-23R, por ejemplo, los aminoácidos 1-353 de AAM44229 del GenBank o un fragmento del mismo, donde la región extracelular o fragmento del mismo se une específicamente a IL-23. El IL-23R de ratón es NP_653131 del GenBank (gi: 21362353). Se contemplan muteínas y variantes, por ejemplo, pegilación o mutagénesis, para retirar o reemplazar restos de Asn de desamidación.

20 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales, policlonales y humanizados (véase, por ejemplo, Sheperd y Dean (eds.) (2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, Nueva York, NY; Kontermann y Dubel (eds.) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, Nueva York; Harlow y Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 139-243; Carpenter, et al. (2000) *J. Immunol.* 165: 6205; He, et al. (1998) *J. Immunol.* 160: 1029; Tang, et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 27371-27378; Baca, et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684; Chothia, et al. (1989) *Nature* 342: 877-883; Foote y Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224: 487-499 y la Patente de Estados Unidos N° 6.329.511 expedida a Vásquez, et al.).

30 No es necesaria la purificación de antígeno para la generación de anticuerpos. La inmunización se puede realizar mediante inmunización con vectores de ADN; véase, por ejemplo, Wang, et al. (1997) *Virology* 228: 278-284. Como alternativa, puede inmunizarse a animales con células que posean el antígeno de interés. Se pueden aislar entonces esplenocitos de los animales inmunizados y se pueden fusionar los esplenocitos con una línea de células de mieloma para producir un hibridoma (Meyaard, et al. (1997) *Immunity* 7: 283-290; Wright, et al. (2000) *Immunity* 13: 233-242 y Preston, et al. (1997) *Eur. J. Immunol.* 27: 1911-1918). Se pueden seleccionar hibridomas resultantes para la producción del anticuerpo deseado mediante ensayos funcionales o ensayos biológicos, es decir, ensayos que no dependen de la posesión del antígeno purificado. Se puede demostrar que la inmunización con células es superior para la generación de anticuerpos que la inmunización con antígeno purificado (Kaithamana, et al. (1999) *J. Immunol.* 163: 5157-5164).

40 Se pueden medir las propiedades de unión del anticuerpo al antígeno y del ligando al receptor, por ejemplo, mediante resonancia de plasmones superficiales (Karlsson, et al. (1991) *J. Immunol. Methods* 145: 229-240; Neri, et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15: 1271-1275; Jonsson, et al. (1991) *Biotechniques* 11: 620-627) o mediante ELISA de competición (Friguet, et al. (1985) *J. Immunol. Methods* 77: 305-319; Hubble (1997) *Immunol. Today* 18: 305-306). Se pueden usar anticuerpos para purificación por afinidad para aislar el antígeno diana del anticuerpo y proteínas unidas asociadas, véase, por ejemplo, Wilchek, et al. (1984) *Meth. Enzymol.* 104: 3-55.

50 Los anticuerpos se unirán habitualmente con al menos una K_D de aproximadamente 10^{-3} M, más habitualmente al menos 10^{-6} M, típicamente al menos 10^{-7} M, más típicamente al menos 10^{-8} M, preferiblemente al menos 10^{-9} M y más preferiblemente al menos 10^{-10} M y lo más preferible es que sea al menos 10^{-11} M (véase, por ejemplo, Presta, et al. (2001) *Thromb. Haemost.* 85: 379-389; Yang, et al. (2001) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 38: 17-23; y Carnahan, et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* (Supl.) 9: 3982s-3990s).

55 Se proporcionan receptores solubles que comprenden los dominios extracelulares de polipéptidos de receptor de IL-23R o IL12Rbeta1. Se pueden preparar receptores solubles y se pueden usar de acuerdo con métodos convencionales (véase, por ejemplo, Jones, et al. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1592: 251-263; Prudhomme, et al. (2001) *Expert Opinion Biol. Ther.* 1: 359-373 y Fernández-Botran (1999) *Crit. Rev. Clin. Lab Sci.* 36: 165-224).

60 IV. Composiciones, Métodos Terapéuticos

65 Se describe el uso de IL-23 y anti-IL-23R, por ejemplo, en el tratamiento de afecciones y trastornos proliferativos, que incluyen cáncer, tumores, angiogénesis, caquexia, caquexia del cáncer, anorexia y trastornos precancerosos, por ejemplo, displasia. Se proporcionan también ácidos nucleicos para estos usos terapéuticos, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican IL-23 o IL-23R o un fragmento antigénico de los mismos, los ácidos nucleicos antisentido correspondientes y productos de hibridación de los mismos. La invención proporciona también composiciones para siRNA de interferencia, (véase, por ejemplo, Arenz y Schepers (2003) *Naturwissenschaften* 90: 345-359; Sazani y

ES 2 330 220 T3

Kole (2003) *J. Clin. Invest.* 112: 481-486; Pirolo, *et al.* (2003) *Pharmacol. Therapeutics* 99: 55-77 y Wang, *et al.* (2003) *Antisense Nucl. Acid Drug Devel.* 13: 169-189).

5 Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen un agonista o antagonista de IL-23, el análogo de citoquina o muteína, anticuerpo para el mismo o ácido nucleico del mismo, se mezcla con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences y U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Se pueden preparar formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico, mediante mezcla con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones, soluciones o suspensiones acuosas (véase, por ejemplo, 10 Hardman, *et al.* (2001) *Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams and Wilkins, Nueva York, NY; Avis, *et al.* (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; y Weiner y Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY).

La vía de administración es, por ejemplo, mediante aplicación tópica o cutánea, inyección subcutánea, inyección o infusión mediante las vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, intralesional o pulmonar, o mediante sistemas de liberación sostenida o un implante. Se han descrito 20 vectores de transferencia génica, por ejemplo, para el sistema nervioso central (véase, por ejemplo, Cua, *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166: 602-608; Sidman *et al.* (1983) *Biopolymers* 22: 547-556; Langer, *et al.* (1981) *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277; Langer (1982) *Chem. Tech.* 12: 98-105; Epstein, *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688-3692; Hwang, *et al.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4030-4034; y las Patentes de Estados Unidos N° 6.350.466 y 6.316.024).

25 La selección de un régimen de administración para un agente terapéutico depende de varios factores, que incluyen la tasa de renovación de la entidad en el suero o tejido, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. Preferiblemente, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente coherente con un nivel aceptable de efectos secundarios. Por 30 consiguiente, la cantidad de agente biológico administrado depende en parte de la entidad particular y la gravedad de la afección que se esté tratando. Está disponible una guía para la selección de dosis apropiadas de anticuerpos, citoquinas y moléculas pequeñas (véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 601-608; Milgrom, *et al.* (1999) *New Engl. J. Med.* 341: 1966-1973; Slamon, *et al.* (2001) *New Engl. J. Med.* 344: 783-792; Beniaminovitz, *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 342: 613-619; Ghosh, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 24-32; y Lipsky, *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 343: 1594-1602).

40 Se pueden proporcionar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y citoquinas mediante infusión continua o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana o 1 a 7 veces por semana. Las dosis se pueden proporcionar por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía tópica, por vía oral, por vía nasal, por vía rectal, por vía intramuscular, por vía intracerebral, por vía intraespinal o por inhalación. Un protocolo de dosis preferido, es uno que implica la dosis o frecuencia de dosis máxima que evite efectos secundarios no deseables significativos. Una dosis semanal total es 45 en general al menos 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, más generalmente al menos 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, muy generalmente al menos 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, típicamente al menos 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, más típicamente al menos 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, muy típicamente al menos 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, preferiblemente al menos 0,2 mg/kg, más preferiblemente al menos 1,0 mg/kg, lo más preferible es que sea al menos 2,0 mg/kg, óptimamente al menos 10 mg/kg, más óptimamente al menos 25 mg/kg y lo más óptimo es que sea al menos 50 mg/kg (véase, por ejemplo, Yang, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 349: 427-434; Herold, *et al.* (2002) *New Engl. J. Med.* 346: 1692-1698; Liu, *et al.* (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67: 451-456 y Portielji, *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 133-144). La dosis deseada de un agente terapéutico de molécula pequeña, por 50 ejemplo, un mimético de péptido, producto natural o compuesto químico orgánico, es aproximadamente la misma que la de un anticuerpo o polipéptido, en una base de moles/kg.

55 Una cantidad eficaz para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se esté tratando, la salud general del paciente, el método, la vía y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, Maynard, *et al.* (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Ratón, FL y Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, Reino Unido).

60 Sujetos veterinarios, experimentales o de investigación típicos, incluyen monos, perros, gatos, ratas, ratones, conejos, cobayas, caballos y seres humanos.

65 La determinación de la dosis adecuada la realiza el médico, por ejemplo, usando parámetros o factores conocidos o que se sospecha en la técnica que afectan el tratamiento o que se predice que afectan el tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad un poco menor que la dosis óptima y se aumenta en aumentos pequeños a partir de entonces hasta que se logre el efecto deseado u óptimo con respecto a cualquier efecto secundario negativo. Medidas de diagnóstico importantes incluyen las de los síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de cito-

quinas inflamatorias producidas. Preferiblemente, un agente biológico que se usará se obtiene de la misma especie que el animal elegido como diana para el tratamiento, reduciendo al mínimo de esta manera una respuesta humoral al reactivo.

5 En la técnica se conocen bien los métodos para la co-administración o el tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citoquina, esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico o radiación (véase, por ejemplo, Hardman, *et al.* (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA y Chabner y Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). Una cantidad eficaz de agente terapéutico disminuirá los síntomas típicamente en al menos el 10%; habitualmente en al menos el 20%; preferiblemente al menos el aproximadamente el 30%; más preferiblemente al menos el 40% y lo más preferible es que sea en al menos el 50%.

15 V. Equipos y Reactivos de Diagnóstico

Se describen proteínas de IL-23, fragmentos de las mismas, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, en un equipo de diagnóstico. Se proporcionan también composiciones de unión, que incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, para la detección de IL-23 y receptor de IL-23 y metabolitos y productos de degradación de los mismos. Típicamente, el equipo tendrá un compartimento que contiene un polipéptido p19 o un fragmento antigénico del mismo, una composición de unión para el mismo o un ácido nucleico, por ejemplo, una sonda o cebador de ácido nucleico. La sonda o cebador de ácido nucleico hibrida específicamente en condiciones rigurosas a un ácido nucleico que codifica p19 o IL-23R.

25 El equipo puede comprender, por ejemplo, un reactivo y un compartimento, un reactivo e instrucciones de uso o un reactivo con un compartimento e instrucciones de uso. El reactivo puede comprender p19, el complejo de p19 y p40, IL-23R, el complejo de IL-23R y IL-12Rbeta1 o un fragmento antigénico del mismo, una composición de unión o un ácido nucleico. Un equipo para la determinación de la unión de un compuesto de ensayo, por ejemplo, adquirido a partir de una muestra biológica o de una biblioteca química, puede comprender un compuesto de control, un compuesto marcado y un método para la separación del compuesto marcado libre del compuesto marcado unido.

35 Se pueden usar ensayos de diagnóstico con matrices biológicas tales como células vivas, extractos de células, lisados de células, células fijadas, cultivos de células, fluidos corporales o muestras forenses. Los anticuerpos conjugados útiles para propósitos de diagnóstico o equipo, incluyen anticuerpos acoplados a colorantes, isótopos, enzimas y metales (véase, por ejemplo, Le Doussal, *et al.* (1991) *New Engl. J. Med.* 146: 169-175; Gibellini, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160: 3891-3898; Hsing y Bishop (1999) *New Engl. J. Med.* 162: 2804-2811; y Everts, *et al.* (2002) *New Engl. J. Med.* 168: 883-889). Existen diversos formatos de ensayo, tales como radioinmunoensayos (RIA), ELISA y laboratorio en una microplaca (Patentes de Estados Unidos N° 6.176.962 y 6.517.234).

40 Se describen polipéptidos y ácidos nucleicos de IL-23 e IL-23R, fragmentos de los mismos, en un equipo de diagnóstico, por ejemplo, para el diagnóstico de afecciones proliferativas, cáncer, tumores y trastornos precancerosos, por ejemplo, displasia.

45 También se describen composiciones de unión, que incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, para la detección de p19, el complejo de p19 y p40, IL-23R, el complejo de IL-23R e IL-12Rbeta1 y metabolitos y productos de degradación de los mismos. Típicamente, el equipo tendrá un compartimento que contiene un polipéptido de IL-23 o IL-23R o un fragmento antigénico del mismo, una composición de unión al mismo o un ácido nucleico, tal como una sonda de ácido nucleico, cebador o sonda fluorescible (véase, por ejemplo, Rajendran, *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31: 5700-5713; Cockerill (2003) *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127: 1112-1120; Zammattéo, *et al.* (2002) *Biotech. Annu. Rev.* 8: 85-101; y Klein (2002) *Trends Mol. Med.* 8: 257-260).

55 Un método de diagnóstico puede comprender poner en contacto una muestra de un sujeto, por ejemplo, un sujeto de ensayo, con una composición de unión que se une específicamente a un polipéptido o ácido nucleico de p19, el complejo de p19 y p40, IL-23R y el complejo de IL-23R e IL-12Rbeta1. El método puede comprender además poner en contacto una muestra de un sujeto de control, sujeto normal o tejido o fluido normal del sujeto de ensayo, con la composición de unión. Además, el método puede comprender adicionalmente comparar la unión específica de la composición al sujeto de ensayo con la unión específica de la composición al sujeto normal, sujeto de control o tejido o fluido normal del sujeto de ensayo. La expresión o actividad de una muestra de ensayo o sujeto de ensayo puede compararse con la de una muestra de control o sujeto de control. Una muestra de control puede comprender, por ejemplo, una muestra de tejido no afectada o no inflamada en un paciente que sufre de un trastorno inmune. La expresión o actividad de un sujeto de control o muestra de control se puede proporcionar como un valor predeterminado, por ejemplo, adquirido a partir de un grupo de sujetos de control estadísticamente apropiado.

VI. Usos

Se describen métodos de uso de agonistas y antagonistas de IL-23, para el tratamiento y diagnóstico de afecciones y trastornos inflamatorios, por ejemplo, enfermedades neoplásicas, cánceres, tumores, angiogénesis, afecciones precancerosas tales como displasias, anorexia, caquexia y caquexia del cáncer, mediante la modulación de la respuesta inmune.

Se describen métodos de tratamiento o de diagnóstico de una afección o trastorno proliferativo, por ejemplo, cáncer del útero, cérvix, mama, próstata, testículos, pene, tracto gastrointestinal, por ejemplo, esófago, orofaringe, estómago, intestinos delgado o grueso, colon o recto, riñón, célula renal, vejiga, hueso, médula ósea, piel, cabeza o cuello, hígado, vesícula biliar, corazón, pulmón, páncreas, glándula salival, glándula suprarrenal, tiroides, cerebro, ganglios, sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP) y sistema inmune, por ejemplo, bazo o timo. Se describen métodos de tratamiento, por ejemplo, de tumores inmunógenos, tumores no inmunógenos, tumores latentes, cánceres inducidos por virus, por ejemplo, cánceres de células epiteliales, cánceres de células endoteliales, carcinoma de células escamosas, virus del papiloma, adenocarcinomas, linfomas, carcinomas, melanomas, leucemias, mielomas, sarcomas, teratocarcinomas, cánceres inducidos químicamente, metástasis y angiogénesis. La invención contempla también la reducción de la tolerancia a un antígeno de célula tumoral o célula cancerosa, por ejemplo, modulando la actividad de una célula T reguladora (Treg) (véase, por ejemplo, Ramirez-Montagut, *et al.* (2003) *Oncogene* 22: 3180-3187; Sawaya, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 349: 1501-1509; Farrar, *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162: 2842-2849; Le, *et al.* (2001) *J. Immunol.* 167: 6765-6772; Cannistra y Niloff (1996) *New Engl. J. Med.* 334: 1030-1038; Osborne (1998) *New Engl. J. Med.* 339: 1609-1618; Lynch y Chapelle (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 919-932; Enzinger y Mayer (2003) *New Engl. J. Med.* 349: 2241-2252; Forastiere, *et al.* (2001) *New Engl. J. Med.* 345: 1890-1900; Izbicki, *et al.* (1997) *New Engl. J. Med.* 337: 1188-1194; y Holland, *et al.* (eds.) (1996) *Cancer Medicine Encyclopedia of Cancer*, 4ª ed., Academic Press, San Diego, CA).

Se describen métodos para el tratamiento de una afección proliferativa, cáncer, tumor o afección precancerosa tal como una displasia, con un agonista o antagonista de IL-23, con al menos un agente terapéutico o de diagnóstico adicional. El al menos un agente terapéutico o de diagnóstico adicional puede ser, por ejemplo, una citoquina o antagonista de citoquina, tal como IL-12, interferón-alfa o receptor del factor de crecimiento anti-epidérmico, doxorubicina, epirubicina, un anti-folato, por ejemplo, metotrexato o fluorouracilo, irinotecano, ciclofosfamida, radioterapia, terapia hormonal o anti-hormonal, por ejemplo, andrógeno, estrógeno, anti-estrógeno, flutamida o dietilestilbestrol, cirugía, tamoxifeno, ifosfamida, mitolactol, un agente alquilante, por ejemplo, melfalán o cis-platino, etopósido, vinorelbina, vinblastina, vindesina, un glucocorticoide, un antagonista del receptor de histamina, un inhibidor de angiogénesis, radiación, un sensibilizante de radiación, antraciclina, alcaloide de vinca, taxano, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel, un inhibidor del ciclo celular, por ejemplo, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, un anticuerpo monoclonal, un complejo de anticuerpo monoclonal y toxina, un adyuvante de células T, trasplante de médula ósea o células presentadoras de antígeno, por ejemplo, terapia de células dendríticas. Se pueden proporcionar vacunas, por ejemplo, como una proteína soluble o como un ácido nucleico que codifique la proteína (véase, por ejemplo, Le, *et al.*, citado anteriormente; Greco y Zellefsky (eds.) (2000) *Radiotherapy of Prostate Cancer*, Harwood Academic, Amsterdam; Shapiro y Recht (2001) *New Engl. J. Med.* 344: 1997-2008; Hortobagyi (1998) *New Engl. J. Med.* 339: 974-984; Catalona (1994) *New Engl. J. Med.* 331: 996-1004; Naylor y Hadden (2003) *Int. Immunopharmacol.* 3: 1205-1215; The Int. Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group (2004) *New Engl. J. Med.* 350: 351-360; Slamon, *et al.* (2001) *New Engl. J. Med.* 344: 783-792; Kudelka, *et al.* (1998) *New Engl. J. Med.* 338: 991-992 y van Netten, *et al.* (1996) *New Engl. J. Med.* 334: 920-921).

Se describen métodos para el tratamiento y diagnóstico de anorexia y caquexia, incluyendo caquexia del cáncer. La caquexia es un síndrome de agotamiento que aparece en muchas enfermedades, incluyendo cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón y del tracto gastrointestinal superior. La caquexia aparece en casi la mitad de los pacientes con cáncer. El diagnóstico de la caquexia es mediante una historia de pérdida de peso sustancial, pérdida del apetito y debilidad profunda, en el contexto de enfermedad avanzada y agotamiento muscular (pérdida de masa corporal magra). Se han asociado citoquinas, por ejemplo, IL-6, IL-1, FNTalfa e IFNgamma con la caquexia (véase, por ejemplo, MacDonald, *et al.*, citado anteriormente; Rubin, citado anteriormente; Tisdale, citado anteriormente; Lelli, *et al.*, citado anteriormente; y Argiles, *et al.*, citado anteriormente).

Se proporcionan también métodos para el tratamiento de hematopoyesis extramedular (EMH) del cáncer. Se describe EMH (véase, por ejemplo, Rao, *et al.* (2003) *Leuk. Lymphoma* 44: 715-718; y Lane, *et al.* (2002) *J. Cutan. Pathol.* 29: 608-612).

El tracto gastrointestinal comprende, por ejemplo, los labios, boca, esófago, estómago, intestino delgado, apéndice, intestino grueso, colon, ano y recto. El tracto respiratorio comprende, por ejemplo, la tráquea, bronquiólos, bronquios, pulmones y alvéolos. El sistema reproductivo incluye, por ejemplo, los testículos, pene, ovarios, útero y trompas de Falopio. El sistema endocrino incluye, por ejemplo, la pituitaria, hipotálamo, glándula pineal, glándula tiroides, paratiroides, páncreas endocrino, islotes, gónadas y glándula suprarrenal.

El amplio alcance de esta invención se aprecia mejor con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales tienen por objeto limitar la invención a las realizaciones específicas.

Ejemplos

I. Métodos Generales

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

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

Están disponibles métodos para citometría de flujo, incluyendo separación de células activadas por fluorescencia (FACS) (véase, por ejemplo, Owens, *et al.* (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2ª ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; y Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Están disponibles reactivos fluorescentes adecuados
30 para la modificación de ácidos nucleicos, incluyendo cebadores y sondas de ácido nucleico, polipéptidos y anticuerpos para uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico (Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO).

35 Se describen métodos convencionales de histología del sistema inmune (véase, por ejemplo, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, Nueva York, NY; Hiatt, *et al.* (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Filadelfia, PA; y Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, Nueva York, NY).

40 Se describen métodos para el tratamiento y diagnóstico de cáncer (véase, por ejemplo, Alison (ed.) (2001) *The Cancer Handbook*, Grove's Dictionaries, Inc., St. Louis, MO; Oldham (ed.) (1998) *Principles of Cancer Biotherapy*, 3ª ed., Kluwer Academic Publ., Hingham, MA; Thompson, *et al.* (eds.) (2001) *Textbook of Melanoma*, Martin Dunitz, Ltd., Londres, Reino Unido; Devita, *et al.* (eds.) (2001) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6ª ed., Lippincott, Filadelfia, PA; Holland, *et al.* (eds.) (2000) *Holland-Frei Cancer Medicine*, BC Decker, Filadelfia, PA; Garrett y Sell (eds.) (1995) *Cellular Cancer Markers*, Humana Press, Totowa, NJ; MacKie (1996) *Skin Cancer*, 2ª ed., Mosby, St. Louis; Moertel (1994) *New Engl. J. Med.* 330: 1136-1142; Engleman (2003) *Semin. Oncol.* 30 (3 Supl. 8): 23-29; y Mohr, *et al.* (2003) *Onkologie* 26: 227-233).

45 Están disponibles paquetes de software y bases de datos para la determinación, por ejemplo, de fragmentos antígenicos, secuencias líder, plegamiento de proteínas, dominios funcionales, sitios de glicosilación y alineamientos de secuencias (véase, por ejemplo, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16: 741-742; Wren, *et al.* (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68: 177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133: 17-21; y von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14: 4683-4690).

II. Ratones e Inducción de Tumores

60 Se generaron ratones sin p19 de IL-23, como se describe en Cua, *et al.*, citado anteriormente. Ratones que carecían específicamente de IL-23 (ratones p19KO; ratones knockout de p19; ratones p19^{-/-}), ratones p19^{+/-} y ratones de control de tipo silvestre p19^{+/+}, tenían un fondo de B6/129 F2.

65 Se indujeron químicamente tumores de piel en ratones de tipo silvestre (wt) o sin IL-23 (ratones p19KO). Se iniciaron tumores usando 50 microgramos de 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) seguido de etapas de promoción que consisten en dos tratamientos de 30 microgramos cada uno de TPA por semana (véase, por ejemplo, Oft, *et al.* (2002) *Nat. Cell. Biol.* 4: 487-494).

ES 2 330 220 T3

En estudios de tumores con ratones Ep2X1B1-nu/nu, los tumores hacen metástasis, mientras que no ocurre caquexia. Los ratones mueren, por ejemplo, de hematopoyesis extramedular (EMH). En estudios de tumores con ratones Ep2XB1-Balb/c, no ocurre metástasis tumoral, aparentemente debido al sistema inmune intacto en estos ratones.

5

III. Expresión de Subunidades de p19 e IL-23R

La expresión de la subunidad p19 de IL-23 y la subunidad IL-23R del receptor de IL-23 estaba elevada en varios cánceres, tumores y líneas de células, por ejemplo, cáncer del tracto gastrointestinal, tracto reproductivo, piel y mamario (Tabla 1).

15

TABLA 1

*Expresión de subunidades de p19 e IL-23R mediante análisis Taqman[®], con respecto a ubiquitina (1.0).
Los valores son de tejidos normales enfermos y adyacentes, donde se indica*

20

Expresión de p19 de humano			
Colon normal, adyacente	4,8	adenocarcinoma de fase I del colon	30,5
Colon normal, adyacente	2,0	adenocarcinoma de fase II del colon	73,4
Colon normal, adyacente	0,8	adenocarcinoma de fase II del colon	18,1
Colon normal, adyacente	0,21	adenocarcinoma de fase III del colon	34,0
Piel normal, adyacente	2,2	melanoma II de piel de humano	21,8
Piel normal, adyacente	6,7	melanoma nodular II de piel de humano	16,4
Piel normal, adyacente	8,4	melanoma nodular II de piel de humano	26,8
Piel normal, adyacente	9,3	melanoma de extensión superficial II de piel de humano	75,1
Útero, adyacente	1,6	cistadenocarcinoma seroso papilar de ovario	55,0
Ovario, adyacente	1,9	cistadenocarcinoma seroso papilar de ovario	17,7
Mama, adyacente	8,2	carcinoma medular IIB mamario	32,0
Mama, adyacente	0,6	carcinoma IIA mamario, conducto de infiltración	3,1
Mama, adyacente	0,2	carcinoma IIA mamario, conducto de infiltración	3,9

65

Expresión de IL-23R de humano	
monocito/PBMC en reposo	10,0
línea de células SR de leucemia, leucocitos	415,8
línea de células K562 de leucemia, leucocitos	396,7
línea de células MOLT-4 de leucemia, leucocitos	0,0
línea de células HL60 TB de leucemia, leucocitos	374,1

Se extrajo ARN de tejidos o sedimentos celulares usando columnas RNeasy® (Qiagen, Valencia, CA) y se trató con DNasa I (Promega, Madison, WI). Se preparó ADNc y se usó como molde para PCR cuantitativa en tiempo real. Se analizó el ADNc (25 ng) para la expresión de una variedad de genes usando el Sistema de Detección de Secuencias GeneAmp®5700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). El análisis de las muestras de ADNc de tejido de colon y ovario normal y tumoral se normalizó para la expresión del gen constitutivo, ubiquitina.

IV. Los Antagonistas de p19 Previenen o Reducen los Tumores

Se erradicaron o se redujeron los tumores inducidos por células tumorales inyectadas o mediante carcinogénesis química en ratones tratados con antagonistas de IL-23, por ejemplo, mediante tratamiento con anticuerpo anti-p19 o mediante ablación genética de la subunidad p19 (p19KO). p19 es una subunidad sólo de IL-23, mientras que p40 es una subunidad de IL-23 e IL-12. Por el contrario, el tratamiento con una IL-12, en algunas condiciones, empeoró los tumores, es decir, dio como resultado un aumento en el volumen tumoral, con respecto a ratones de control.

Los tumores en ratones produjeron cáncer, caquexia del cáncer, hematopoyesis extramedular y muerte. El tratamiento de ratones Balb/c que portan tumores con anticuerpo anti-p19 dio como resultado parada de los aumentos en el volumen tumoral, mientras que el tratamiento con anticuerpo anti-p40 provocó ganancia de peso del animal, probablemente una reversión de la caquexia, pero un aumento en el volumen tumoral (Tabla 2).

TABLA 2

Crecimiento de tumores en ratones Balb/c inoculados con células cancerosas Ep2 (conocidas también como células XTb) (células mamarias de ratón transformadas con ras)

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño del tumor (mm ³)		
	Día 1	Día 11	Día 21
Anticuerpo isotipo (8D5)	0 mm ³	225 m ³	500 mm ³
Anticuerpo anti-p19 (29A2)	0	200	250
Anticuerpo anti-p40 (C17.8)	0	250	1150

Se indujeron muerte por cáncer y caquexia del cáncer en ratones, donde el anticuerpo anti-p40 previno la muerte y la pérdida de peso. Se inyectaron 1×10^6 células tumorales EpXT (s.c.) a ratones. Los ratones desnudos que portaban tumores (Ep2XB1 nu/nu) murieron de metástasis pulmonar mortal, ocurriendo las muertes en los días 22-42 después de la inyección. Los ratones Balb/c Exp2XB1 que portaban tumores murieron en aproximadamente los días 22-49 después de la inyección, donde los ratones Balb/c murieron en ausencia de metástasis pulmonar. Se indicó caquexia por la aparición de disminución en el peso corporal (antes de la muerte). Ocurrió pérdida de peso progresiva, comenzando en aproximadamente el día 16. El peso inicial en el día 1 fue de 22-23 gramos, mientras que el peso al morir estaba en el intervalo de 16-18 gramos.

ES 2 330 220 T3

El tratamiento con anticuerpo fue con anticuerpo anti-p40 de rata C17.8 (1 mg/semana). Con el tratamiento con anticuerpo, los ratones Ep2XB1-Balb/C (ratones inmunocompetentes) sobrevivieron hasta aproximadamente el día 64, después de lo cual ocurrieron las muertes hasta el día 85. El tratamiento con anticuerpo anti-p40 dio como resultado también el mantenimiento del peso corporal (a aproximadamente 17 gramos) en la mitad de los ratones, con un aumento progresivo en el peso corporal de los ratones restantes, hasta un máximo, dentro del periodo de tiempo del experimento, de 22-23 gramos. De esta manera, el anticuerpo anti-p40 dio como resultado mejora de la salud, de acuerdo con el tiempo de supervivencia y la ganancia de peso corporal otra vez, aunque anti-p40 podría dar como resultado también deterioro de la salud, como se muestra mediante un aumento en el tamaño tumoral (Tabla 2).

Se indujo químicamente cáncer mediante tratamiento con DMBA (50 microgramos) y 2 x 30 microgramos de 13-acetato de tetradecanoilforbol (TPA) por semana (Gschwendt, *et al.* (1991) *Trends Biochem Sci.* 16: 167-169). Se aplicaron tratamientos de carcinogénesis química a ratones de tipo silvestre B6/129 y a ratones p19KO. Los ratones de tipo silvestre desarrollaron rápidamente tumores, pero los ratones p19KO no adquirieron tumores (Tabla 3).

TABLA 3

Los Ratones p19KO Resisten la Carcinogénesis Química

	Inicio con DMBA (50 microgramos); Promoción con TPA (2 x 30 microgramos/semana durante 13 semanas)		Inicio con DMBA (50 microgramos); Promoción con TPA (2 x 30 microgramos/semana durante 20 semanas)	
	Primera aparición de tumores (después de TPA)	Número de tumores por ratón	Primera aparición de tumores (después de TPA)	Número de tumores por ratón
Ratón de tipo silvestre B2/129	8 semanas	11	8 semanas	8
Ratón p19KO	Ninguno encontrado en el periodo de tiempo examinado	0	Ninguno encontrado en el periodo de tiempo examinado	0

Estudios separados demostraron que p19KO previno la formación de tumores, mientras que p35KO empeoró la formación de tumores (tabla 4).

TABLA 4

Influencia de p19KO frente a p35KO sobre la carcinogénesis química

	Número promedio de tumores por ratón
C57/129 de tipo silvestre	10,0
p19KO (C57/129)	0,0
C57B/6 de tipo silvestre	4,5
p35KO (C57/129)	11,0

ES 2 330 220 T3

Se determinó la expresión de las subunidades de IL-23 y las subunidades de IL-12 en células y tejidos, después de tratamiento con carcinógenos. DMBA solo, TPA solo y DMBA con TPA, indujeron la expresión de la subunidad p19 de IL-23 y estos agentes químicos se aplicaron al dorso del ratón. Por ejemplo, dos días después del tratamiento con DMBA, se produjo un aumento en la expresión de p19 de 1,5 (no tratados) a 6,3 (a t = 2 días). La expresión de p40 aumentó, pero fue relativamente baja en este intervalo de tiempo (0,1 no tratados; 0,4 a t = 2 días). Cinco horas después del tratamiento con TPA, se produjo un aumento en la expresión de p19 (2,5 control; 15,5 con tratamiento con TPA), pero relativamente poco cambio en la expresión de p40 (2,0 control; 3,5 con tratamiento con TPA). Cinco horas después del tratamiento con DMBA más TPA se produjeron grandes aumentos en la expresión de p19 (6,0 control; 32,0 DMBA + TPA), pero niveles moderados de expresión de p40 (2,0 control; 4,0 DMBA + TPA).

Se determinó también la respuesta de queratinocitos humanos a, por ejemplo, DMBA, TPA y lipopolisacárido (LPS) (Tabla 5). TPA indujo específicamente p19, con poca o ninguna inducción de p40, la subunidad común de IL-23 e IL-12. LPS indujo p19, indicando un papel en IL-23 en la respuesta innata. Receptores de tipo toll que unen LPS se encuentran en queratinocitos (véase, por ejemplo, Song, *et al.* (2002) *J. Invest. Dermatol.* 119: 424-432). El etopósido es un agente anticanceroso que inhibe la topoisomerasa II e induce apoptosis (véase, por ejemplo, Robertson, *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 32438-32443; y Karpinich, *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 277: 16547-16552).

TABLA 5

Respuesta de Queratinocitos Humanos a Diversos Aditivos. N.D. significa no detectado

Aditivo	p19	p40	p35	Subunidad EBI3 de IL-27 (p28 + EBI3)
Control	1,1	N.D.	0,4	0,01
DMBA	1,0	N.D.	N.D.	N.D.
TPA	1,9	N.D.	0,2	1,25
LPS	4,45	0,05	0,35	0,25
Etopósido	2,5	0,4	1,75	0,6

Se ensayaron anticuerpos anti-p19 para determinar su efecto sobre el modelo de células de cáncer mamario de ratones 4T1. Se trató a ratones con anticuerpo mIgG1 de control (27F11) o con anticuerpo anti-p19 (29A2). Se controló el crecimiento tumoral los días 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11. Se administraron anticuerpos (1 mg/dosis) los días 2, 5, 8 y 10. El día 4, el tamaño tumoral del ratón tratado con anticuerpo de control fue de aproximadamente 175 mm³, mientras que el tamaño tumoral del ratón tratado con anticuerpo anti-p19 fue de aproximadamente 135 mm³. De esta manera, el anticuerpo anti-p19 es eficaz en el tratamiento de un modelo de cáncer mamario. Después del día 4, los tumores en ambos grupos crecieron a aproximadamente la misma velocidad, indicando que la dosis del anticuerpo no fue suficiente para contrarrestar a la IL-23 expresada por el tumor en períodos de tiempo posteriores.

La histología del modelo de cáncer mamario de ratones Ep2 demostró co-localización de IL-23R y células NK, determinada mediante tinción para p19, que reside unida a IL-23R y mediante tinción para CD49B, un marcador para células NK. Esta co-localización se encontró en la parte central del tumor, es decir, en la región necrótica. La histología del cáncer mamario de ratones Ep2 demostró también co-localización de p19 y células T. Se determinó localización de células T mediante tinción para CD3. Esta co-localización se encontró en la parte periférica del tumor.

V. Lista de Identificadores de Secuencias

SEC ID N°: 1 es la secuencia de ácido nucleico de IL-23p19 de humano.

SEC ID N°: 2 es la secuencia de aminoácidos de IL-23p19 de humano.

SEC ID N°: 3 es la secuencia de ácido nucleico de IL-23p19 de ratón.

SEC ID N°: 4 es la secuencia de aminoácidos de IL-23p19 de ratón.

SEC ID N°: 5 es la secuencia de ácido nucleico del receptor de IL-23 de humano.

SEC ID N°: 6 es la secuencia de aminoácidos del receptor de IL-23 de humano.

SEC ID N°: 7 es la secuencia de aminoácidos de IL-12Rbeta1 de humano.

ES 2 330 220 T3

SEC ID N°: 8 es la secuencia de aminoácidos de p40 de IL-12 de humano.

SEC ID N°: 9 es la secuencia de aminoácidos de p40 de IL-12 de ratón.

5 SEC ID N°: 10 es hiperquina IL-23 de ratón.

SEC ID N°: 11 es hiperquina IL-23 de humano.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 330 220 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un antagonista de IL-23 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores que comprenden células tumorales, en el que el antagonista de IL-23 comprende:
- (a) un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de p19 (SEC ID N°: 2); o
 - 10 (b) un ácido nucleico antisentido o ARN de interferencia pequeño (siARN) que se une específicamente a un ácido nucleico que codifica p19 (SEC ID N°: 1).
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el antagonista de IL-23 inhibe o previene el crecimiento tumoral.
- 15 3. El uso de la reivindicación 1, en el que las células tumorales expresan p19 de IL-23.
4. El uso de la reivindicación 1, en el que el antagonista comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo.
- 20 5. El uso de la reivindicación 1, en el que el antagonista comprende un ácido nucleico antisentido o ARN de interferencia pequeño (siARN).
6. El uso de la reivindicación 1, en el que el antagonista comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.
- 25 7. El uso de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo.
8. El uso de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo es un fragmento de anticuerpo Fab, Fv o F(ab')₂.
- 30 9. El uso de la reivindicación 1, en el que las células tumorales son:
- a) células de cáncer de colon;
 - 35 b) células de cáncer de ovarios;
 - c) células de cáncer mamario; o
 - d) células de melanoma.
- 40 10. El uso de un antagonista de IL-23 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que sufre de un cáncer o tumor, en el que el antagonista de IL-23 comprende:
- (a) un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de p19 (SEC ID N°: 2); o
 - 45 (b) un ácido nucleico antisentido o ARN de interferencia pequeño (siARN) que se une específicamente a un ácido nucleico que codifica p19 (SEC ID N°: 1).
- 50 11. El uso de la reivindicación 10, en el que el antagonista de IL-23 inhibe:
- a) crecimiento del cáncer o tumor;
 - b) caquexia;
 - 55 c) anorexia; o
 - d) angiogénesis.
- 60 12. El uso de la reivindicación 10, en el que el antagonista comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo.
13. El uso de la reivindicación 10, en el que el antagonista comprende un ácido nucleico antisentido o ARN de interferencia pequeño (siARN).
- 65 14. El uso de la reivindicación 12, en el que el antagonista comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.

ES 2 330 220 T3

15. El uso de la reivindicación 14, en el que el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo.

5 16. El uso de la reivindicación 14, en el que el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo es un fragmento de anticuerpo Fab, Fv o F(ab')₂.

17. El uso de la reivindicación 10, en el que el cáncer o tumor es de:

- 10
- a) tracto gastrointestinal;
 - b) tracto respiratorio;
 - c) sistema reproductivo; o
 - 15 d) sistema endocrino.

18. El uso de la reivindicación 10, en el que el cáncer o tumor es:

- 20
- a) cáncer de colon;
 - b) cáncer de ovarios;
 - c) un melanoma; o
 - 25 d) cáncer mamario.

19. Un método para determinar si células tumorales expresan IL-23 que comprende poner en contacto una muestra de un sujeto con un antagonista de IL-23 que comprende:

- 30
- (a) un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de p19 (SEC ID N°: 2); o
 - (b) un ácido nucleico antisentido o ARN de interferencia pequeño (siARN) que se une específicamente a un ácido nucleico que codifica p19 (SEC ID N°: 1).
- 35

20. El método de la reivindicación 19, en el que el antagonista comprende un ácido nucleico antisentido o ARN de interferencia pequeño que se une específicamente al polinucleótido de SEC ID N°: 1.

21. Un equipo para determinar si células tumorales expresan IL-23 que comprende:

- 40
- a) un compartimento; y
 - b) un antagonista de IL-23 que comprende (i) un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de p19 (SEC ID N°: 2) o (ii) un ácido nucleico antisentido o ARN de interferencia pequeño (siARN) que se une específicamente a un ácido nucleico que codifica p19 (SEC ID N°: 1).
- 45

22. El equipo de la reivindicación 21, en el que el antagonista comprende un anticuerpo que se une específicamente a p19 (SEC ID N°: 2).

50

55

60

65

ES 2 330 220 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Schering Corporation
Ofc, Martin
5 McClanahan, Terrill K

<120> USOS DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE IL-23; REACTIVOS RELACIONADOS

10 <130> DX06022WO01

<150> U.S. 60/453.672
<151> 10-03-2003

15 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.1

20 <210> 1
<211> 570
<212> ADN

25 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS

30 <222> (1)..(567)
<223>

<220>
35 <221> péptido maduro
<222> (64)..(567)
<223>

40

45

50

55

60

65

ES 2 330 220 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 330 220 T3

```

<210> 3
<211> 1203
<212> ADN
5 <213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
10 <222> (113)..(700)
<223>

<220>
15 <221> péptido maduro
<222> (176)..(700)
<223>

20 <400> 3

25
cgcttagaag tcggactaca gagttagact cagaaccaa ggaggtggat aggggggtcca 60
caggcctggt gcagatcaca gagccagcca gatctgagaa gcaggaaca ag atg ctg 118
30                                     Met Leu
                                     -20

gat tgc aga gca gta ata atg cta tgg ctg ttg ccc tgg gtc act cag 166
35 Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val Thr Gln
                                     -15          -10          -5

ggc ctg gct gtg cct agg agt agc agt cct gac tgg gct cag tgc cag 214
40 Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys Gln
                                     -1  1          5          10

cag ctc tct cgg aat ctc tgc atg cta gcc tgg aac gca cat gca cca 262
45 Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala Pro
   15          20          25

gcg gga cat atg aat cta cta aga gaa gaa gag gat gaa gag act aaa 310
50 Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr Lys
   30          35          40          45

aat aat gtg ccc cgt atc cag tgt gaa gat ggt tgt gac cca caa gga 358
55 Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly
   50          55          60

60

65

```

ES 2 330 220 T3

```

ctc aag gac aac agc cag ttc tgc ttg caa agg atc cgc caa ggt ctg 406
Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly Leu
      65                      70                      75
5
gct ttt tat aag cac ctg ctt gac tct gac atc ttc aaa ggg gag cct 454
Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu Pro
      80                      85                      90
10
gct cta ctc cct gat agc ccc atg gag caa ctt cac acc tcc cta cta 502
Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu Leu
      95                      100                      105
15
gga ctc agc caa ctc ctc cag cca gag gat cac ccc cgg gag acc caa 550
Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr Gln
110                      115                      120                      125
20
cag atg ccc agc ctg agt tct agt cag cag tgg cag cgc ccc ctt ctc 598
Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu Leu
      130                      135                      140
25
cgt tcc aag atc ctt cga agc ctc cag gcc ttt ttg gcc ata gct gcc 646
Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala Ala
      145                      150                      155
30
cgg gtc ttt gcc cac gga gca gca act ctg act gag ccc tta gtg cca 694
Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val Pro
      160                      165                      170
35
aca gct taaggatgcc caggttccca tggctaccat gataagacta atctatcagc 750
Thr Ala
      175
40
ccagacatct accagttaat taaccatta ggacttgtgc tgttcttggt tcgtttgttt 810
tgcgtgaagg gcaaggacac cattattaa gagaaaagaa acaaacccca gagcaggcag 870
45
ctggctagag aaaggagctg gagaagaaga ataaagtctc gagcccttgg ccttgaagc 930
gggcaagcag ctgctgtggc tgaggggaag ggggcggtgg catcgagaaa ctgtgagaaa 990
accagagca tcagaaaaag tgagcccagg ctttgccat tatctgtaag aaaaacaaga 1050
50
aaaggggaac attatacttt cctgggtggc tcagggaaat gtgcagatgc acagtactcc 1110
agacagcagc tctgtacctg cctgctctgt ccctcagttc taacagaatc tagtcactaa 1170
55
gaactaacag gactaccaat acgaactgac aaa 1203

```

```

60 <210> 4
    <211> 196
    <212> PRT
65 <213> Mus musculus

```

ES 2 330 220 T3

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 Val Pro Thr Ala
175

<210> 5

<211> 2859

ES 2 330 220 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5 <220>

<221> CDS

<222> (119)..(2005)

<223>

10

<220>

<221> péptido maduro

<222> (188)..(2005)

15

<223>

<400> 5

20

gtggtacggg aattccattg tggtgggcag ccaacaaggg tggcagcctg gctctgaagt 60

25

ggaattatgt gcttcaaaca ggttgaaaga gggaaacagt cttttcctgc ttccagac 118

atg aat cak gtc act att caa tgg gat gca gta ata gcc ctt tac ata 166

30

Met Asn Xaa Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile
-20 -15 -10

ctc ttc agc tgg tgt cat gga gga att aca aat ata aac tgc tct ggc 214

35

Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly
-5 -1 1 5

cac atc tgg gta gaa cca gcc aca att ttt aag atg ggt atg aat atc 262

40

His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile
10 15 20 25

tct ata tat tgc caa gca gca att aag aac tgc caa cca agg aaa ctt 310

45

Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu
30 35 40

cat ttt tat aaa aat ggc atc aaa gaa aga ttt caa atc aca agg att 358

50

His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile
45 50 55

aat aaa aca aca gct cgg ctt tgg tat aaa aac ttt ctg gaa cca cat 406

Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His
60 65 70

gct tct atg tac tgc act gct gaa tgt ccc aaa cat ttt caa gag aca 454

55

Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr
75 80 85

ctg ata tgt gga aaa gac att tct tct gga tat ccg cca gat att cct 502

65

ES 2 330 220 T3

	Leu	Ile	Cys	Gly	Lys	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Tyr	Pro	Pro	Asp	Ile	Pro	
	90					95					100					105	
5	gat	gaa	gta	acc	tgt	gtc	att	tat	gaa	tat	tca	ggc	aac	atg	act	tgc	550
	Asp	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Ile	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Gly	Asn	Met	Thr	Cys	
					110					115					120		
10	acc	tgg	aat	gct	rgg	aag	ctc	acc	tac	ata	gac	aca	aaa	tac	gtg	gta	598
	Thr	Trp	Asn	Ala	Xaa	Lys	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	Thr	Lys	Tyr	Val	Val	
					125					130					135		
15	cat	gtg	aag	agt	tta	gag	aca	gaa	gaa	gag	caa	cag	tat	ctc	acc	tca	646
	His	Val	Lys	Ser	Leu	Glu	Thr	Glu	Glu	Glu	Gln	Gln	Tyr	Leu	Thr	Ser	
					140					145					150		
20	agc	tat	att	aac	atc	tcc	act	gat	tca	tta	caa	ggc	ggc	aag	aag	tac	694
	Ser	Tyr	Ile	Asn	Ile	Ser	Thr	Asp	Ser	Leu	Gln	Gly	Gly	Lys	Lys	Tyr	
								160							165		
25	ttg	ggt	tgg	gtc	caa	gca	gca	aac	gca	cta	ggc	atg	gaa	gag	tca	aaa	742
	Leu	Val	Trp	Val	Gln	Ala	Ala	Asn	Ala	Leu	Gly	Met	Glu	Glu	Ser	Lys	
								175				180				185	
30	caa	ctg	caa	att	cac	ctg	gat	gat	ata	gtg	ata	cct	tct	gca	gcc	gtc	790
	Gln	Leu	Gln	Ile	His	Leu	Asp	Asp	Ile	Val	Ile	Pro	Ser	Ala	Ala	Val	
					190							195				200	
35	att	tcc	agg	gct	gag	act	ata	aat	gct	aca	gtg	ccc	aag	acc	ata	att	838
	Ile	Ser	Arg	Ala	Glu	Thr	Ile	Asn	Ala	Thr	Val	Pro	Lys	Thr	Ile	Ile	
					205					210					215		
40	tat	tgg	gat	agt	caa	aca	aca	att	gaa	aag	ggt	tcc	tgt	gaa	atg	aga	886
	Tyr	Trp	Asp	Ser	Gln	Thr	Thr	Ile	Glu	Lys	Val	Ser	Cys	Glu	Met	Arg	
					220					225					230		
45	tac	aag	gct	aca	aca	aac	caa	act	tgg	aat	ggt	aaa	gaa	ttt	gac	acc	934
	Tyr	Lys	Ala	Thr	Thr	Asn	Gln	Thr	Trp	Asn	Val	Lys	Glu	Phe	Asp	Thr	
									240						245		
50	aat	ttt	aca	tat	gtg	caa	cag	tca	gaa	ttc	tac	ttg	gag	cca	aac	att	982
	Asn	Phe	Thr	Tyr	Val	Gln	Gln	Ser	Glu	Phe	Tyr	Leu	Glu	Pro	Asn	Ile	
									255						260		
55	aag	tac	gta	ttt	caa	gtg	aga	tgt	caa	gaa	aca	ggc	aaa	agg	tac	tgg	1030
	Lys	Tyr	Val	Phe	Gln	Val	Arg	Cys	Gln	Glu	Thr	Gly	Lys	Arg	Tyr	Trp	
						270						275				280	
60	cag	cct	tgg	agt	tca	ccg	ttt	ttt	cat	aaa	aca	cct	gaa	aca	ggt	ccc	1078
	Gln	Pro	Trp	Ser	Ser	Pro	Phe	Phe	His	Lys	Thr	Pro	Glu	Thr	Val	Pro	
										290					295		
65	cag	gtc	aca	tca	aaa	gca	ttc	caa	cat	gac	aca	tgg	aat	tct	ggg	cta	1126
	Gln	Val	Thr	Ser	Lys	Ala	Phe	Gln	His	Asp	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Leu	
						300									310		
65	aca	ggt	gct	tcc	atc	tct	aca	ggg	cac	ctt	act	tct	gac	aac	aga	gga	1174

ES 2 330 220 T3

	Thr	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Thr	Gly	His	Leu	Thr	Ser	Asp	Asn	Arg	Gly	
	315						320					325					
5	gac	att	gga	ctt	tta	ttg	gga	atg	atc	gtc	ttt	gct	gtt	atg	ttg	tca	1222
	Asp	Ile	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Met	Ile	Val	Phe	Ala	Val	Met	Leu	Ser	
	330					335					340					345	
10	att	ctt	tct	ttg	att	ggg	ata	ttt	aac	aga	tca	ttc	cga	act	ggg	att	1270
	Ile	Leu	Ser	Leu	Ile	Gly	Ile	Phe	Asn	Arg	Ser	Phe	Arg	Thr	Gly	Ile	
					350					355					360		
15	aaa	aga	agg	atc	tta	ttg	tta	ata	cca	aag	tgg	ctt	tat	gaa	gat	att	1318
	Lys	Arg	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Pro	Lys	Trp	Leu	Tyr	Glu	Asp	Ile	
				365					370					375			
20	cct	aat	atg	aaa	aac	agc	aat	gtt	gtg	aaa	atg	cta	cag	gaa	aat	agt	1366
	Pro	Asn	Met	Lys	Asn	Ser	Asn	Val	Val	Lys	Met	Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	
			380					385					390				
25	gaa	ctt	atg	aat	aat	aat	tcc	agt	gag	cag	gtc	cta	tat	gtt	gat	ccc	1414
	Glu	Leu	Met	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser	Glu	Gln	Val	Leu	Tyr	Val	Asp	Pro	
			395				400					405					
30	atg	att	aca	gag	ata	aaa	gaa	atc	ttc	atc	cca	gaa	cac	aag	cct	aca	1462
	Met	Ile	Thr	Glu	Ile	Lys	Glu	Ile	Phe	Ile	Pro	Glu	His	Lys	Pro	Thr	
	410					415					420					425	
35	gac	tac	aag	aag	gag	aat	aca	gga	ccc	ctg	gag	aca	aga	gac	tac	ccg	1510
	Asp	Tyr	Lys	Lys	Glu	Asn	Thr	Gly	Pro	Leu	Glu	Thr	Arg	Asp	Tyr	Pro	
					430					435					440		
40	caa	aac	tcg	cta	ttc	gac	aat	act	aca	gtt	gta	tat	att	cct	gat	ctc	1558
	Gln	Asn	Ser	Leu	Phe	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Val	Tyr	Ile	Pro	Asp	Leu	
				445					450					455			
45	aac	act	gga	tat	aaa	ccc	caa	att	tca	aat	ttt	ctg	cct	gag	gga	agc	1606
	Asn	Thr	Gly	Tyr	Lys	Pro	Gln	Ile	Ser	Asn	Phe	Leu	Pro	Glu	Gly	Ser	
			460					465					470				
50	cat	ctc	agc	aat	aat	aat	gaa	att	act	tcc	tta	aca	ctt	aaa	cca	cca	1654
	His	Leu	Ser	Asn	Asn	Asn	Glu	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Leu	Lys	Pro	Pro	
			475				480					485					
55	gtt	gat	tcc	tta	gac	tca	gga	aat	aat	ccc	agg	tta	caa	aag	cat	cct	1702
	Val	Asp	Ser	Leu	Asp	Ser	Gly	Asn	Asn	Pro	Arg	Leu	Gln	Lys	His	Pro	
	490					495					500					505	
60	aat	ttt	gct	ttt	tct	gtt	tca	agt	gtg	aat	tca	cta	agc	aac	aca	ata	1750
	Asn	Phe	Ala	Phe	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Asn	Ser	Leu	Ser	Asn	Thr	Ile	
					510					515					520		
65	ttt	ctt	gga	gaa	tta	agc	ctc	ata	tta	aat	caa	gga	gaa	tgc	agt	tct	1798
	Phe	Leu	Gly	Glu	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	Asn	Gln	Gly	Glu	Cys	Ser	Ser	
				525					530					535			
65	cct	gac	ata	caa	aac	tca	gta	gag	gag	gaa	acc	acc	atg	ctt	ttg	gaa	1846

ES 2 330 220 T3

	Pro	Asp	Ile	Gln	Asn	Ser	Val	Glu	Glu	Glu	Thr	Thr	Met	Leu	Leu	Glu	
			540					545					550				
5	aat	gat	tca	ccc	agt	gaa	act	att	cca	gaa	cag	acc	ctg	ctt	cct	gat	1894
	Asn	Asp	Ser	Pro	Ser	Glu	Thr	Ile	Pro	Glu	Gln	Thr	Leu	Leu	Pro	Asp	
		555				560					565						
10	gaa	ttt	gtc	tcc	tgt	ttg	ggg	atc	gtg	aat	gag	gag	ttg	cca	tct	att	1942
	Glu	Phe	Val	Ser	Cys	Leu	Gly	Ile	Val	Asn	Glu	Glu	Leu	Pro	Ser	Ile	
	570					575					580					585	
15	aat	act	tat	ttt	cca	caa	aat	att	ttg	gaa	agc	cac	ttc	aat	agg	att	1990
	Asn	Thr	Tyr	Phe	Pro	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu	Ser	His	Phe	Asn	Arg	Ile	
					590					595					600		
20	tca	ctc	ttg	gaa	aag	tagagctgtg	tggtcaaaat	caatatgaga	aagctgcctt								2045
	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys												
				605													
25	gcaatctgaa	cttgggtttt	cctgcaata	gaaattgaat	tctgcctctt	tttgaaaaa											2105
	atgtattcac	atacaaatct	tcacatggac	acatgttttc	atttccttg	gataaatacc											2165
	taggtagggg	attgctgggc	catatgataa	gcatatgttt	cagttctacc	aatcttgttt											2225
30	ccagagtagt	gacatttctg	tgctcctacc	atcaccatgt	aagaattccc	gggagctcca											2285
	tgcttttta	attttagcca	ttcttctgcc	tmatttctta	aaattagaga	attaaggtcc											2345
	cgaagggtga	acatgcttca	tggtcacaca	tacaggcaca	aaaacagcat	tatgtggacg											2405
35	cctcatgtat	ttttataga	gtcaactatt	tctctttat	tttccctcat	tgaaagatgc											2465
	aaaacagctc	tctattgtgt	acagaaaggg	taaataatgc	aaaatacctg	gtagtaaaat											2525
40	aaatgctgaa	aattttcctt	taaaatagaa	tcattaggcc	aggcgtggtg	gctcatgctt											2585
	gtaatcccag	cactttggta	ggctgaggtr	ggtggatcac	ctgagggtcag	gagttcgagt											2645
	ccagcctggc	caatatgctg	aaaccctgtc	tctactaaaa	ttacaaaaat	tagccggcca											2705
45	tggtggcagg	tgcttgtaat	cccagctact	tgggaggctg	aggcaggaga	atcacttgaa											2765
	ccaggaaggc	agaggttgca	ctgagctgag	attgtgccac	tgactccag	cctgggcaac											2825
50	aagagcaaaa	ctctgtctgg	aaaaaaaaaa	aaaa													2859

55 <210> 6
 <211> 629
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

60
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (-21)..(-21)

65 <223> 'Xaa' en el sitio -21 representa Gln o His.

ES 2 330 220 T3

<220>

<221> característica diversa

<222> (126)..(126)

5 <223> 'Xaa' en el sitio 126 representa Gly o Arg.

<400> 6

10

Met Asn Xaa Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile
 -20 -15 -10

15

Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly
 -5 -1 1 5

20

His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile
 10 15 20 25

25

Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu
 30 35 40

30

His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile
 45 50 55

35

Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His
 60 65 70

40

Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr
 75 80 85

45

Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro
 90 95 100 105

50

Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys
 110 115 120

55

Thr Trp Asn Ala Xaa Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val
 125 130 135

60

His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser
 140 145 150

65

ES 2 330 220 T3

Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr
 155 160 165
 5
 Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys
 170 175 180 185
 10
 Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val
 190 195 200
 15
 Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile
 205 210 215
 20
 Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg
 220 225 230
 25
 Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr
 235 240 245
 30
 Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile
 250 255 260 265
 35
 Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp
 270 275 280
 40
 Gln Pro Trp Ser Ser Pro Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro
 285 290 295
 45
 Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu
 300 305 310
 50
 Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly
 315 320 325
 55
 Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser
 330 335 340 345
 60
 Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile
 350 355 360
 65
 Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile
 365 370 375

ES 2 330 220 T3

5 Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser
 380 385 390
 10 Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro
 395 400 405
 15 Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr
 410 415 420 425
 20 Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro
 430 435 440
 25 Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu
 445 450 455
 30 Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser
 460 465 470
 35 His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro
 475 480 485
 40 Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro
 490 495 500 505
 45 Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile
 510 515 520
 50 Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser
 525 530 535
 55 Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu
 540 545 550
 60 Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp
 555 560 565
 65 Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile
 570 575 580 585
 70 Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile
 590 595 600
 75 Ser Leu Leu Glu Lys
 605

ES 2 330 220 T3

<210> 7

<211> 862

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

10

Met Ala His Thr Phe Arg Gly Cys Ser Leu Ala Phe Met Phe Ile Ile
1 5 10 15

15

Thr Trp Leu Leu Ile Lys Ala Lys Ile Asp Ala Cys Lys Arg Gly Asp
20 25 30

20

Val Thr Val Lys Pro Ser His Val Ile Leu Leu Gly Ser Thr Val Asn
35 40 45

25

Ile Thr Cys Ser Leu Lys Pro Arg Gln Gly Cys Phe His Tyr Ser Arg
50 55 60

30

Arg Asn Lys Leu Ile Leu Tyr Lys Phe Asp Arg Arg Ile Asn Phe His
65 70 75 80

35

His Gly His Ser Leu Asn Ser Gln Val Thr Gly Leu Pro Leu Gly Thr
85 90 95

40

Thr Leu Phe Val Cys Lys Leu Ala Cys Ile Asn Ser Asp Glu Ile Gln
100 105 110

45

Ile Cys Gly Ala Glu Ile Phe Val Gly Val Ala Pro Glu Gln Pro Gln
115 120 125

50

Asn Leu Ser Cys Ile Gln Lys Gly Glu Gln Gly Thr Val Ala Cys Thr
130 135 140

55

Trp Glu Arg Gly Arg Asp Thr His Leu Tyr Thr Glu Tyr Thr Leu Gln

60

65

ES 2 330 220 T3

	145	150	155	160
5	Leu Ser Gly Pro	Lys Asn Leu Thr Trp	Gln Lys Gln Cys Lys Asp Ile	
		165	170	175
10	Tyr Cys Asp Tyr	Leu Asp Phe Gly	Ile Asn Leu Thr Pro	Glu Ser Pro
		180	185	190
15	Glu Ser Asn Phe	Thr Ala Lys Val	Thr Ala Val Asn Ser	Leu Gly Ser
		195	200	205
20	Ser Ser Ser Leu	Pro Ser Thr Phe	Thr Phe Leu Asp	Ile Val Arg Pro
		210	215	220
25	Leu Pro Pro Trp	Asp Ile Arg Ile	Lys Phe Gln Lys	Ala Ser Val Ser
		225	230	235
			240	245
30	Arg Cys Thr Leu	Tyr Trp Arg Asp	Glu Gly Leu Val	Leu Leu Asn Arg
		245	250	255
35	Leu Arg Tyr Arg	Pro Ser Asn Ser	Arg Leu Trp Asn	Met Val Asn Val
		260	265	270
40	Thr Lys Ala Lys	Gly Arg His Asp	Leu Leu Asp Leu	Lys Pro Phe Thr
		275	280	285
45	Glu Tyr Glu Phe	Gln Ile Ser Ser	Lys Leu His Leu	Tyr Lys Gly Ser
		290	295	300
50	Trp Ser Asp Trp	Ser Glu Ser Leu	Arg Ala Gln Thr	Pro Glu Glu Glu
		305	310	315
			320	325
55	Pro Thr Gly Met	Leu Asp Val Trp	Tyr Met Lys Arg	His Ile Asp Tyr
		325	330	335
60	Ser Arg Gln Gln	Ile Ser Leu Phe	Trp Lys Asn Leu	Ser Val Ser Glu
		340	345	350
65	Ala Arg Gly Lys	Ile Leu His Tyr	Gln Val Thr Leu	Gln Glu Leu Thr
		355	360	365
70	Gly Gly Lys Ala	Met Thr Gln Asn	Ile Thr Gly His	Thr Ser Trp Thr

ES 2 330 220 T3

	370					375						380							
5	Thr	Val	Ile	Pro	Arg	Thr	Gly	Asn	Trp	Ala	Val	Ala	Val	Ser	Ala	Ala			
	385					390					395					400			
10	Asn	Ser	Lys	Gly	Ser	Ser	Leu	Pro	Thr	Arg	Ile	Asn	Ile	Met	Asn	Leu			
					405					410					415				
15	Cys	Glu	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Pro	Arg	Gln	Val	Ser	Ala	Asn	Ser	Glu			
				420					425					430					
20	Gly	Met	Asp	Asn	Ile	Leu	Val	Thr	Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Asp	Pro			
			435					440						445					
25	Ser	Ala	Val	Gln	Glu	Tyr	Val	Val	Glu	Trp	Arg	Glu	Leu	His	Pro	Gly			
		450					455						460						
30	Gly	Asp	Thr	Gln	Val	Pro	Leu	Asn	Trp	Leu	Arg	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn			
	465					470					475					480			
35	Val	Ser	Ala	Leu	Ile	Ser	Glu	Asn	Ile	Lys	Ser	Tyr	Ile	Cys	Tyr	Glu			
					485					490					495				
40	Ile	Arg	Val	Tyr	Ala	Leu	Ser	Gly	Asp	Gln	Gly	Gly	Cys	Ser	Ser	Ile			
				500					505					510					
45	Leu	Gly	Asn	Ser	Lys	His	Lys	Ala	Pro	Leu	Ser	Gly	Pro	His	Ile	Asn			
			515					520					525						
50	Ala	Ile	Thr	Glu	Glu	Lys	Gly	Ser	Ile	Leu	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Ile			
		530					535						540						
55	Pro	Val	Gln	Glu	Gln	Met	Gly	Cys	Leu	Leu	His	Tyr	Arg	Ile	Tyr	Trp			
	545					550					555					560			
60	Lys	Glu	Arg	Asp	Ser	Asn	Ser	Gln	Pro	Gln	Leu	Cys	Glu	Ile	Pro	Tyr			
					565					570					575				
65	Arg	Val	Ser	Gln	Asn	Ser	His	Pro	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro	Arg	Val			
				580					585					590					
70	Thr	Tyr	Val	Leu	Trp	Met	Thr	Ala	Leu	Thr	Ala	Ala	Gly	Glu	Ser	Ser			
			595					600					605						

ES 2 330 220 T3

His Gly Asn Glu Arg Glu Phe Cys Leu Gln Gly Lys Ala Asn Trp Met
 610 615 620
 5
 Ala Phe Val Ala Pro Ser Ile Cys Ile Ala Ile Ile Met Val Gly Ile
 625 630 635 640
 10
 Phe Ser Thr His Tyr Phe Gln Gln Lys Val Phe Val Leu Leu Ala Ala
 645 650 655
 15
 Leu Arg Pro Gln Trp Cys Ser Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Asn Ser
 660 665 670
 20
 Thr Cys Ala Lys Lys Tyr Pro Ile Ala Glu Glu Lys Thr Gln Leu Pro
 675 680 685
 25
 Leu Asp Arg Leu Leu Ile Asp Trp Pro Thr Pro Glu Asp Pro Glu Pro
 690 695 700
 30
 Leu Val Ile Ser Glu Val Leu His Gln Val Thr Pro Val Phe Arg His
 705 710 715 720
 35
 Pro Pro Cys Ser Asn Trp Pro Gln Arg Glu Lys Gly Ile Gln Gly His
 725 730 735
 40
 Gln Ala Ser Glu Lys Asp Met Met His Ser Ala Ser Ser Pro Pro Pro
 740 745 750
 45
 Pro Arg Ala Leu Gln Ala Glu Ser Arg Gln Leu Val Asp Leu Tyr Lys
 755 760 765
 50
 Val Leu Glu Ser Arg Gly Ser Asp Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Cys
 770 775 780
 55
 Pro Trp Thr Val Leu Pro Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr
 785 790 795 800
 60
 Leu Pro Ser Asn Ile Asp Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala
 805 810 815
 65
 Asp Ser Leu Glu Glu Leu Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe
 820 825 830

ES 2 330 220 T3

Pro Ser Ser Ser Leu His Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu
 835 840 845

5

Thr Leu Asp Gln Leu Lys Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu
 850 855 860

10

<210> 8

<211> 328

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

20

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
 1 5 10 15

25

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
 20 25 30

30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
 35 40 45

35

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
 50 55 60

40

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
 65 70 75 80

45

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
 85 90 95

50

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
 100 105 110

55

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
 115 120 125

60

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
 130 135 140

65

ES 2 330 220 T3

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
 145 150 155 160
 5
 Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
 165 170 175
 10
 Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
 180 185 190
 15
 Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
 195 200 205
 20
 Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
 210 215 220
 25
 Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
 225 230 235 240
 30
 Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
 245 250 255
 35
 Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
 260 265 270
 40
 Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
 275 280 285
 45
 Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
 290 295 300
 50
 Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
 305 310 315 320
 55
 Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
 325

<210> 9

<211> 335

60 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

65

ES 2 330 220 T3

<400> 9

5 Met Cys Pro Gln Lys Leu Thr Ile Ser Trp Phe Ala Ile Val Leu Leu
1 5 10 15

10 Val Ser Pro Leu Met Ala Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

15 Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu
35 40 45

20 Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln
50 55 60

25 Arg His Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys
65 70 75 80

30 Glu Phe Leu Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr
85 90 95

35 Leu Ser His Ser His Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asn Gly Ile Trp
100 105 110

40 Ser Thr Glu Ile Leu Lys Asn Phe Lys Asn Lys Thr Phe Leu Lys Cys
115 120 125

45 Glu Ala Pro Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln
130 135 140

50 Arg Asn Met Asp Leu Lys Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Pro
145 150 155 160

55 Asp Ser Arg Ala Val Thr Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys
165 170 175

60 Val Thr Leu Asp Gln Arg Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln
180 185 190

65 Glu Asp Val Thr Cys Pro Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu
195 200 205

ES 2 330 220 T3

Ala Leu Glu Ala Arg Gln Gln Asn Lys Tyr Glu Asn Tyr Ser Thr Ser
 210 215 220

5 Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln
 225 230 235 240

10 Met Lys Pro Leu Lys Asn Ser Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro
 245 250 255

15 Asp Ser Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Lys Phe Phe Val
 260 265 270

20 Arg Ile Gln Arg Lys Lys Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu Glu Gly Cys
 275 280 285

25 Asn Gln Lys Gly Ala Phe Leu Val Glu Lys Thr Ser Thr Glu Val Gln
 290 295 300

30 Cys Lys Gly Gly Asn Val Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Asn
 305 310 315 320

35 Ser Ser Cys Ser Lys Trp Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg Ser
 325 330 335

<210> 10
 40 <211> 531
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

45 <400> 10

50 Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp
 1 5 10 15

55 Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val
 20 25 30

60 Tyr Val Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val
 35 40 45

65 Asn Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser

ES 2 330 220 T3

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

ES 2 330 220 T3

Gly Cys Asn Gln Lys Gly Ala Phe Leu Val Glu Lys Thr Ser Thr Glu
 290 295 300
 5
 Val Gln Cys Lys Gly Gly Asn Val Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr
 305 310 315 320
 10
 Tyr Asn Ser Ser Cys Ser Lys Trp Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg
 325 330 335
 15
 Ser Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 340 345 350
 20
 Lys Leu Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys
 355 360 365
 25
 Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala
 370 375 380
 30
 Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr
 385 390 395 400
 35
 Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln
 405 410 415
 40
 Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly
 420 425 430
 45
 Leu Val Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu
 435 440 445
 50
 Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu
 450 455 460
 55
 Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr
 465 470 475 480
 60
 Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu
 485 490 495
 65
 Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala
 500 505 510

ES 2 330 220 T3

Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val
 515 520 525

5

Pro Thr Ala
 530

10

<210> 11

<211> 521

<212> PRT

15

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

20

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp
 1 5 10 15

25

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val
 20 25 30

30

Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val
 35 40 45

35

Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu
 50 55 60

40

Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln
 65 70 75 80

45

Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly
 85 90 95

50

Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly
 100 105 110

55

Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys
 115 120 125

60

Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys
 130 135 140

65

ES 2 330 220 T3

Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser
 145 150 155 160

5

Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr
 165 170 175

10

Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser
 180 185 190

15

Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu
 195 200 205

20

Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn
 210 215 220

25

Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro
 225 230 235 240

30

Asn Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val
 245 250 255

35

Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser
 260 265 270

40

Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys
 275 280 285

45

Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys
 290 295 300

50

Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser
 305 310 315 320

55

Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser Gly Ser Gly Ser Ser Arg
 325 330 335

60

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Leu Arg
 340 345 350

65

Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln Cys Gln Gln Leu
 355 360 365

ES 2 330 220 T3

	Ser	Gln	Lys	Leu	Cys	Thr	Leu	Ala	Trp	Ser	Ala	His	Pro	Leu	Val	Gly
	370			375				380								
5	His	Met	Asp	Leu	Arg	Glu	Glu	Gly	Asp	Glu	Glu	Thr	Thr	Asn	Asp	Val
	385			390				395					400			
10	Pro	His	Ile	Gln	Cys	Gly	Asp	Gly	Cys	Asp	Pro	Gln	Gly	Leu	Arg	Asp
				405				410					415			
15	Asn	Ser	Gln	Phe	Cys	Leu	Gln	Arg	Ile	His	Gln	Gly	Leu	Ile	Phe	Tyr
				420				425					430			
20	Glu	Lys	Leu	Leu	Gly	Ser	Asp	Ile	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Ser	Leu	Leu
	435			440				445								
25	Pro	Asp	Ser	Pro	Val	Ala	Gln	Leu	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser
	450			455				460								
30	Gln	Leu	Leu	Gln	Pro	Glu	Gly	His	His	Trp	Glu	Thr	Gln	Gln	Ile	Pro
	465			470				475					480			
35	Ser	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Pro	Trp	Gln	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Phe	Lys
				485				490					495			
40	Ile	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Ala	Phe	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Arg	Val	Phe
				500				505					510			
45	Ala	His	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	Pro							
	515			520												
50																
55																
60																
65																