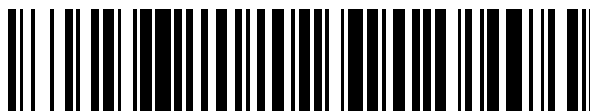


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 571**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2013 PCT/US2013/041656**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13173761**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2013 E 13790269 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 2850103**

54 Título: **Proteínas de unión al antígeno ST2**

30 Prioridad:

18.05.2012 US 201261649147 P

15.03.2013 US 201361792619 P

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

13.04.2021

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)

One Amgen Center Drive

Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es:

SMITH, DIRK E.;

FOLTZ, IAN;

KING, CHADWICK T.;

LIM, AI CHING;

CLARK, RUTILIO;

COMEAU, MICHAEL R.;

KETCHEM, RANDAL R.;

SHI, DONGHUI;

MIN, XIAOSHAN y

WANG, ZHULUN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 818 571 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

Proteínas de unión al antígeno ST2

5 Antecedentes de la invención

ST2 es un receptor de unión para la interleucina-33 (IL-33), una citocina relacionada con IL-1 e IL-18 y también conocida como NF-HEV o IL-1F11. ST2 se expresa tanto como una variante soluble no señalizadora (ST2 soluble o sST2) como una forma transmembrana de longitud completa (FL ST2, por sus siglas en inglés, ST2 o ST2L) que media las respuestas celulares a IL-33. La última forma se expresa en una amplia gama de tipos celulares implicados en la inflamación patológica en una serie de situaciones de enfermedad. Estos incluyen linfocitos, particularmente los linfocitos T auxiliares que expresan IL-5 e IL-13, linfocitos citotóxicos naturales (NK, por sus siglas en inglés) y linfocitos T citotóxicos naturales (NKT, por sus siglas en inglés), así como muchas de las llamadas células inmunitarias innatas, tal como los mastocitos, basófilos, eosinófilos, macrófagos y células auxiliares innatas (también conocidas como nuocitos (Neill, Wong et al. 2010)). La unión de IL-33 a ST2 en estas células conduce al reclutamiento de un correceptor ampliamente expresado conocido como proteína accesoria IL-1R (AcP) y a la activación de la señalización proinflamatoria, similar a IL-1 e IL-18. Por tanto, la IL-33 es capaz de activar directamente las células que expresan ST2 o potenciar su activación en presencia de otros estímulos activadores. Ejemplos de respuestas celulares inducidas por IL-33 incluyen la producción de citocinas inflamatorias, tales como IL-5, IL-6, IL-13, TNF, IFN- γ y GM-CSF, así como la producción de quimiocinas, tales como CXCL8, CCL17 y CCL24. También se ha demostrado que IL-33 potencia las respuestas alérgicas agudas al aumentar la activación de mastocitos y basófilos desencadenada por la señalización del receptor de IgE u otros activadores de mastocitos y basófilos. IL-33 también potenciará el reclutamiento, supervivencia y propiedades adhesivas de las células inmunitarias que expresan ST2 y, por lo tanto, es importante para provocar y mantener la inflamación celular en los tejidos locales.

Las acciones proinflamatorias de IL-33 sobre las células inmunitarias innatas y adaptativas culminan para promover una serie de procesos patológicos. En los pulmones, estas incluyen inflamación de las vías respiratorias aumentada, producción de moco, hiperreactividad de las vías respiratorias y remodelación fibrótica. La IL-33 también puede contribuir a la inflamación localizada en las articulaciones, así como a la hipernociación cutánea y articular, al promover la producción de citocinas proinflamatorias (Verri, Guerrero et al. 2008; Xu, Jiang et al. 2008). El exceso de IL-33 se ha relacionado con el depósito patológico de colágeno y la fibrosis y también contribuye al daño epitelial en el contexto de la enfermedad inflamatoria del intestino. A través de sus potentes efectos sobre basófilos y mastocitos sensibilizados con IgE, IL-33 también puede desencadenar un shock anafiláctico (Pushparaj, Tay et al. 2009) y puede desempeñar un papel importante en la aparición de enfermedades alérgicas. Muchas de estas enfermedades son de naturaleza crónica y progresiva y difíciles de tratar y existe la necesidad de tratamientos más eficaces.

De acuerdo con sus efectos biológicos documentados, existen varias líneas de evidencia de que la vía IL-33/ST2 contribuye a la enfermedad humana. Por ejemplo, la expresión anormalmente alta de IL-33 se encuentra en enfermedades que implican inflamación en los tejidos mucosos e inflamación articular. Estos incluyen asma (Prefontaine, Lajoie-Kadoch et al. 2009; Prefontaine, Nadiguel et al. 2010), enfermedad inflamatoria del intestino (Beltran, Nunez et al. 2010; Pastorelli, Garg et al. 2010; Sponheim, Pollheimer et al. 2010) y artritis reumatoide (Palmer, Talabot-Ayer et al. 2009; Matsuyama, Okazaki et al. 2010). La expresión de IL-33 está elevada en piel psoriásica (Theoharides, Zhang et al. 2010) y la piel de pacientes con dermatitis atópica (Pushparaj, Tay et al. 2009) y también está aumentada en situaciones patológicas de fibrosis, tal como la esclerosis sistémica (Yanaba, Yoshizaki et al. 2011) (Manetti, Ibbá-Manneschi et al. 2009) y fibrosis hepática (Marvie, Lisbonne et al. 2009). La concentración de ST2 soluble circulante también está elevada en numerosas situaciones de enfermedad, indicando además una relación entre esta vía de citocinas y estas enfermedades. Los ejemplos incluyen asma (Kuroiwa, Arai et al. 2001; Oshikawa, Kuroiwa et al. 2001; Ali, Zhang et al. 2009), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Hacker, Lambers et al. 2009), fibrosis pulmonar (Tajima, Oshikawa et al. 2003), sepsis y trauma (Brunner, Krenn et al. 2004), infección por VIH (Miyagaki, Sugaya et al. 2011), lupus eritematoso sistémico (Mok, Huang et al. 2010), enfermedad inflamatoria del intestino (Beltran, Nunez et al. 2010) así como la artritis reumatoide, esclerosis, granulomatosis de Wegener y enfermedad de Behçet (Kuroiwa, Arai et al. 2001) y enfermedad cardiovascular (Shah y Januzzi 2010). IL-33 potencia la inflamación eosinofílica y existe evidencia de que esta vía está implicada en la enfermedad asociada a eosinófilos, tal como rinosinusitis y poliposis nasal (Plager, Kahl et al. 2010) y bronquitis eosinofílica (Oshikawa, Kuroiwa et al. 2001).

Los estudios genéticos proporcionan pruebas adicionales que relacionan la vía de IL-33/ST2 con enfermedades humanas, que han identificado polimorfismos de genes de IL-33 y/o ST2 en la población general que están significativamente asociados con un mayor riesgo de enfermedad o parámetros de gravedad de la enfermedad. Varios estudios extensos de asociación de todo el genoma han relacionado la variación genética en ST2 (IL1RL1) o IL-33 con un mayor riesgo de asma (Gudbjartsson, Bjornsdottir et al. 2009; Moffatt, Gut et al. 2010; Wu, Romieu et al. 2010) y otros estudios han relacionado genéticamente esta vía con una mayor gravedad del asma (Ali, Zhang et al. 2009) e hiperreactividad bronquial (Reijmerink, Postma et al. 2008). Hallazgos similares han implicado genéticamente esta vía en trastornos alérgicos tal como dermatitis atópica (Shimizu, Matsuda et al. 2005), rinosinusitis (Sakashita, Yoshimoto et al. 2008; Castaño R 2009) así como poliposis nasal (Buysschaert, Grulois et al. 2010).

En conjunto, estas relaciones con varias enfermedades humanas y la capacidad de este eje de citocinas para promover

muchas formas de inflamación dañina implican que esta es una diana útil para la intervención terapéutica.

Sumario de la invención

5 La invención proporciona proteínas de unión a antígeno anti-ST2, específicamente anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos, que tienen propiedades susceptibles de producción comercial y uso terapéutico en seres humanos. Las proteínas de unión a antígeno anti-ST2 son particularmente útiles en métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con el eje IL-33/ST2. En el presente documento se proporcionan anticuerpos de unión a ST2 que se unen a ST2 con alta afinidad y bloquean eficazmente la unión de IL-33, reduciendo, de este modo, la señalización mediada por IL-33 en la célula.

En un primer aspecto, la proteína de unión al antígeno ST2 comprende a) un dominio variable de cadena ligera como se establece en el SEQ ID NO: 96 y b) un dominio variable de cadena pesada como se establece en el SEQ ID NO: 30.

15 La proteína de unión al antígeno ST2 descrita en el presente documento puede unirse a ST2 humano con una afinidad menor que o igual a 1×10^{-10} M.

20 La proteína de unión al antígeno ST2 inhibe la unión de ST2 humano a IL-33 humana y reduce la señalización de ST2 mediada por IL-33 humana en células que expresan ST2 humano.

La proteína de unión al antígeno ST2 descrita en el presente documento puede reducir la señalización de ST2 de mono cynomolgus mediada por IL-33 en células de mono cynomolgus que expresan ST2.

25 El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos preferidos incluyen aquellos anticuerpos que comprenden una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID: 85 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 19.

30 En un aspecto adicional, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de la invención.

También se describe en el presente documento un vector de expresión que comprende uno o más ácidos nucleicos aislados del aspecto anterior. En determinadas realizaciones, el vector de expresión codifica una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, o tanto una cadena ligera como una cadena pesada de anticuerpo.

35 La invención proporciona además una célula hospedadora recombinante que comprende uno o más ácidos nucleicos aislados del aspecto anterior unidos operativamente a un promotor, incluyendo células hospedadoras recombinantes que comprenden uno o más vectores de expresión descritos anteriormente. En realizaciones preferidas, la célula hospedadora recombinante secreta un anticuerpo que se une a ST2. Las células hospedadoras preferidas son células hospedadoras de mamífero, incluidas las líneas celulares CHO.

45 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario o inflamatorio, seleccionado de asma, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Behcet, rinosinusitis, poliposis nasal, bronquitis eosinofílica y enfermedad cardiovascular.

50 La invención proporciona además un método para preparar una proteína de unión al antígeno ST2 de la invención mediante el cultivo de una célula hospedadora recombinante como anteriormente y el aislamiento de la proteína de unión al antígeno ST2 de dicho cultivo.

Breve descripción de los dibujos

55 FIG. 1 El tratamiento con mAb de ST2 inhibió significativamente la IL-5 inducida por IL-33 del líquido de lavado broncoalveolar (BALF, por sus siglas en inglés) en ratones Balb/cy C57B1/6.

FIG. 2 El tratamiento con mAb de ST2 es eficaz en un modelo de asma inducido por alérgenos de cucarachas (CRA, por sus siglas en inglés). Los ratones tratados con anticuerpo de ST2 tenían significativamente menos eosinófilos en BALF que los ratones tratados con Ig de control de isotipo.

60 FIG. 3 mAb de ST2 en la inhibición de la producción de IL-5 inducida por IL-33 humana a partir de linfocitos T CD4+ de diversos donantes. La línea (-) representa el valor de control positivo de IL-33 humana en combinación con IL-2 humana sin inhibición. El (+++++) representa el valor de control positivo de IL-2 humana. La línea (- -) representa el valor de control de medios.

FIG. 4 Respuesta a la dosis de IL-33 humana en el ensayo de células NK humanas.

65 FIG. 5 Reducción de la actividad de IL-33 en un ensayo de células NK humanas causada por Ab2 frente a anticuerpos de ST2 disponibles comercialmente. Se obtuvieron los clones HB12, FB9 y 2A5 de MBL International Corporation. El clon B4E6 se obtuvo de MD Biosciences. El clon 97203 se obtuvo de R&D Systems.

FIG. 6 La ubicación de las regiones de ST2 unidas por Ab2 de acuerdo con lo determinado por HDX (véase el Ejemplo 12). La región correspondiente a los aminoácidos 15-26 del dominio extracelular de ST2 está resaltada en rojo y la región correspondiente a los aminoácidos 70-76 del dominio extracelular de ST2 está resaltada en magenta.

FIG. 7 Estructura general del complejo ST2/sc-dsFv de Ab2. Se muestran dos moléculas sc-dsFv de Ab2 en representación con dibujo y se colorea en cian/azul o amarillo claro/dorado para el par de cadena ligera (LC, por sus siglas en inglés)/cadena pesada (HC, por sus siglas en inglés) respectivamente. Se muestran dos moléculas ST2 en dibujos magenta y verde.

FIG. 8 Interfaz de enlace. ST2 se muestra en dibujos de color amarillo. La cadena pesada y la cadena ligera de Ab2 se muestran en dibujos color gris y trigo. Los bucles de las CDR para cadena pesada y cadena ligera están coloreados en el siguiente orden: CDR1: rojo (HC) o rojo claro (LC); CDR2: verde (HC) o verde claro (LC); y CDR3: azul (HC) o celeste (LC).

FIG. 9 Mapa de potencial electrostático de superficie de ST2 y sc-dsFv de Ab2. FIG. 9A) Complementariedad de carga y superficie de ST2 y sc-dsFv de Ab2. La interfaz de enlace está resaltada en un círculo. FIG. 9B) Izquierda: Ab2 (dibujo color gris/trigo) se une al parche con carga positiva en ST2 (superficie); Derecha: ST2 (dibujo de color amarillo) se une al parche ácido de sc-dsFv de Ab2 (superficie). Para el mapa de potencial electrostático, la superficie roja representa carga negativa y la superficie azul representa carga positiva.

FIG. 10 Restos dentro de los dominios variables de Ab2 que forman una interfaz con ST2 cuando se unen al antígeno. Las regiones CDR están encuadradas. Los restos dentro de la interfaz se muestran en negrita. Los restos que forman enlaces de hidrógeno o puentes de sal con aminoácidos dentro de ST2 están en cursiva.

Descripción detallada

Los encabezados de sección usados en el presente documento tienen fines organizativos solamente, y no deben considerarse como limitantes de la materia objeto descrita.

Pueden usarse técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo y transformación de tejidos, purificación de proteínas, etc. Pueden realizarse reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza frecuentemente en la técnica o como se describe en el presente documento. Los siguientes procedimientos y técnicas pueden llevarse a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la memoria descriptiva. Véase, p. ej., Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y las técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica y química médica y farmacéutica que se describen en el presente documento son los conocidos y frecuentemente usados en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para síntesis química, análisis químicos, preparación, formulación y suministro de productos farmacéuticos y tratamiento de pacientes.

ST2

Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento se unen a ST2. ST2 se expresa tanto como una variante soluble no señalizadora (ST2 soluble o sST2) como una forma transmembrana de longitud completa (FL ST2, ST2 o ST2L). En el presente documento, se proporciona una secuencia de aminoácidos de ST2L humano a modo de ejemplo en la Tabla 1. La proteína se compone de varios dominios: Los aminoácidos 1-18 corresponden a la secuencia líder que puede escindirse durante el procesamiento de la proteína en células de mamífero; los aminoácidos 19-331 corresponden al dominio extracelular; los aminoácidos 332-350 corresponden al dominio transmembrana; y los aminoácidos 351-556 corresponden al dominio intracelular. En realizaciones preferidas, la proteína de unión a antígeno se une al dominio extracelular de ST2L y previene la interacción de ST2 con IL-33. En la Tabla 1 se proporciona una secuencia de aminoácidos de IL-33 humana a modo de ejemplo.

IL-33 señala a través de un receptor heterodimérico que comprende ST2L y AcP. En la Tabla 1 se proporciona una secuencia de aminoácidos de AcP humana a modo de ejemplo. Esta proteína también se compone de varios dominios: Los aminoácidos 1-20 corresponden a la secuencia líder que puede escindirse durante el procesamiento de la proteína en células de mamífero; los aminoácidos 21-367 corresponden al dominio extracelular; los aminoácidos 368-388 corresponden al dominio transmembrana; y los aminoácidos 389-570 corresponden al dominio intracelular. En realizaciones a modo de ejemplo, una proteína de unión al antígeno ST2 se une a ST2L y previene la señalización mediada por IL-33 en células que expresan ST2L y AcP.

Tabla 1

Secuencia de aminoácidos de ST2 humano (SEQ ID NO:1)	
MGFWILAILTILMYSTAAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIP TQERNRVFASGQLLKFLPAXVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDY LMYSTVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPELWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVM EDAGDYTCFKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKNA NLTCACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSNGLACLDMLVRI ADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSIYCHAVCSVFLMLINVLVII LKMFWIEATLLWRDIAKPYKTRNDGKLYDAYVVYPRNYKSSTDGASRVEHFVHQILP DVLENKCGYTLCIYGRDMLPGEDVVTAVETNIRKSRRHIFILTPQITHNKEFAYEQEVA LHCALIQNDKAVILIEMEALSELDMQLQAEALQDSLQHLMKVQGTIKWREDHIANKRS LNSKFWKHVRYQMPVPSKIPRKASSLTPLAAQKQ X = E o A	
Secuencia de aminoácidos de AcP humana (SEQ ID NO: 2)	
MTLLWCVVSLYFYGILQSDASERCDDWGLDTMRQIQVFEDPARIKCPLFEHFLKFNY STAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNITCML RNTTYCSKVAFFLEVVKDSCFNPMKLPVHKLIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTI TWYMGCYKIQNFNNVIPEGMNLISNNGNYTCVVTPENGRTFHLTRTLTVKV VGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDD ITIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVQKV PAPRYTVELACGFGATVLLVVILIVVYHVYWLEMVLFYRAHFGTDETILDGKEYDIYV SYARNAEEEEFVLLTLRGVLENEFGYKLCIFDRDSLPGGIVTDETLFSFIQKSRLLVLS PNYVLQGTQALLELKAGLENMASRGNINVILVQYKAVKETKVKELKRAKTVLTVIKW KGEKSKYPQGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSSSDEQGLSYSSLKNV	
Secuencia de aminoácidos de IL-33 humana (SEQ ID NO:3)	
MKPKMKYSTNKISTAKWKNTASKALCFKLGKSQQKAKEVCPMYFMKLRSGLMIKKE ACYFRRETTKRPSLKTGRKHKRHLVLAACQQQSTVECFAGISGVQKYTRALHDSSIT GISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIVVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNESG DGVVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNMHSCVSVF ECKTDPGVFIGVDNHLALIKVDSSENLCTENILFKLSET	

Las realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención se unen tanto a ST2 humano como de mono cynomolgus con alta afinidad, incluyendo aquellos que se unen con alta afinidad y bloquean la interacción de IL-33 de mono cynomolgus con ST2 de mono cynomolgus. Estas características permiten estudios informativos de toxicología en primates no humanos.

En la Tabla 2 se proporciona una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de ST2L de mono cynomolgus. La proteína se compone de varios dominios: los aminoácidos 1-18 corresponden a la secuencia líder que puede escindirse durante el procesamiento de la proteína en células de mamífero; los aminoácidos 19-331 corresponden al dominio extracelular; los aminoácidos 332-350 corresponden al dominio transmembrana; y los aminoácidos 351-556 corresponden al dominio intracelular.

En la Tabla 2 se proporciona una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de AcP de mono cynomolgus. La proteína se compone de varios dominios: los aminoácidos 1-20 corresponden a la secuencia líder que se puede escindir durante el procesamiento de la proteína en células de mamífero; los aminoácidos 21-367 corresponden al dominio extracelular; los aminoácidos 368-388 corresponden al dominio transmembrana; y los aminoácidos 389-570 corresponden al dominio intracelular.

En la Tabla 2 se proporciona una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de IL-33 de mono cynomolgus.

Tabla 2

Secuencia de aminoácidos de ST2 de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 4)
MGLWILAILTILVYSTAAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQKSSYIVDWYYSQTNKSIPT QERNRVFASGQLLKFLPAEVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQPDENVDPYL MYSTVSGSEKNSKIYCPIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYKAHKSFLVIDNVMTD DAGDYTCCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSTRFPVIRAPAHNETKEVEIGENTN LTCSACFGKGAQFLATVQWQLNGNKITDFSEPRIQQEEGQNQSFSNGLACVNTVLRIA DVKEEDLLRLYDCLALNLHGLRRHTIRLSRKNPIDHQSTYCIIVCSVLLMLINILVILK TFWIEATLLWRDIAPYKTRNDGKLYDAYVIYPRNYTSSADGASRVEYFVHQILPDVL ENKCGYTLCIYGRDMLPGEDVVTAVETNIRKSRRHIFILTPQITHSEEFAYEQEVALHS ALIQNDISKVILIEMEALSELDMQLQAEALQDSLRLMEVQGTIKWREDHVANKRSLNS KFWKHVRYQMPVPSKMPRKASSLTSALAAQKQ
Secuencia de aminoácidos de AcP de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 5)
MTLLWCVVSLYFYGILQSDASERCDDWGLDTMRQIQVFEDPARIKCPLFEHFLKFNY STAHSAGLTLIYWTRQDRDLEEPINFRLENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNYTCML RNTTYCSKVAFPLEVVQKDSFCNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTI TWYMGCKYKIQNFNNVIPEGMNLFLIAFISNNGNYTCVVTPENGRTFHLTRTLTVKV VGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDD IPIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSDELKRSYVCHARSAKGEVAKAATVKQKV PAPRYTVELACGFGATVLLVILIVVYHVYWLEMVLFYRAHFGTDETILDGKEYDIYV SYARNAEEEEFVLLTLRGVLENEFGYKLCIFDRDSLPGGIVTDETLFSIQKSRRLVVL PNYVLQGTQALLELKAGLENMASQGNINVLVQYKAVKETKVKELKRAKTVLTVIK WKGEKSKYPQGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSSSEQGLSYSSLKNV
Secuencia de aminoácidos de IL-33 de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 6)
MKPKMKYSTNKISTAKRKNTASKALCFKLKGSQQKAKEVCHVYFMKLRSGLMIKKE ACYFRRETTKRPSLKTGGKHKHGLVLAACQQQSTVECFAFGISGVPKYTRALHDSSIT GISPITESLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKDKKKDKVLLSYYESQHPSSSESG DGVGDKMLMVTLSPTKDFWLQANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNRSFNCVSVF ECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDHSENLSSENILFKLSEI

Proteínas de Unión al Antígeno ST2

- 5 En el presente documento se describen proteínas de unión a antígeno que se unen específicamente a ST2. Ejemplos de proteínas de unión al antígeno comprenden péptidos y/o polipéptidos que se unen específicamente a ST2. Dichos péptidos o polipéptidos pueden incluir opcionalmente una o más modificaciones postraduccionales. Ejemplos de proteínas de unión a antígeno incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, como se define de diversas maneras en el presente documento, que se unen específicamente a ST2. Estos incluyen anticuerpos que se unen específicamente a ST2 humano, incluidos aquellos que inhiben la unión de IL-33 y/o la activación de ST2.

Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento se unen específicamente a ST2. "Se une específicamente", como se usa en el presente documento, significa que la proteína de unión a antígeno se une preferentemente a ST2 sobre otras proteínas. En algunas realizaciones, "se une específicamente" significa que la proteína de unión al antígeno ST2 tiene una mayor afinidad por ST2 que por otras proteínas. Las proteínas de unión al antígeno ST2 que se unen específicamente a ST2 pueden tener una afinidad de unión por ST2 humano menor que o igual a 1×10^{-7} M, menor que o igual a 2×10^{-7} M, menor que o igual a 3×10^{-7} M, menor que o igual a 4×10^{-7} M, menor que o igual a 5×10^{-7} M, menor que o igual a 6×10^{-7} M, menor que o igual a 7×10^{-7} M, menor que o igual a 8×10^{-7} M, menor que o igual a 9×10^{-7} M, menor que o igual a 1×10^{-8} M, menor que o igual a 2×10^{-8} M, menor que o igual a 3×10^{-8} M, menor que o igual a 4×10^{-8} M, menor que o igual a 5×10^{-8} M, menor que o igual a 6×10^{-8} M, menor que o igual a 7×10^{-8} M, menor que o igual a 8×10^{-8} M, menor que o igual a 9×10^{-8} M, menor que o igual a 1×10^{-9} M, menor que o igual a 2×10^{-9} M, menor que o igual a 3×10^{-9} M, menor que o igual a 4×10^{-9} M, menor que o igual a 5×10^{-9} M, menor que o igual a 6×10^{-9} M, menor que o igual a 7×10^{-9} M, menor que o igual a 8×10^{-9} M, menor que o igual a 9×10^{-9} M, menor que o igual a 1×10^{-10} M, menor que o igual a 2×10^{-10} M, menor que o igual a 3×10^{-10} M, menor que o igual a 4×10^{-10} M, menor que o igual a 5×10^{-10} M, menor que o igual a 6×10^{-10} M, menor que o igual a 7×10^{-10} M, menor que o igual a 8×10^{-10} M, menor que o igual a 9×10^{-10} M, menor que o igual a 1×10^{-11} M, menor que o igual a 2×10^{-11} M, menor que o igual a 3×10^{-11} M, menor que o igual a 4×10^{-11} M, menor que o igual a 5×10^{-11} M, menor que o igual a 6×10^{-11} M, menor que o igual a 7×10^{-11} M, menor que o igual a 8×10^{-11} M, menor que o igual a 9×10^{-11} M, menor que o igual a 1×10^{-12} M, menor que o igual a 2×10^{-12} M, menor que o igual a 3×10^{-12} M, menor que o igual a 4×10^{-12} M, menor que o igual a 5×10^{-12} M, menor que o igual a 6×10^{-12} M, menor que o igual a 7×10^{-12} M, menor que o igual a 8×10^{-12} M, o menor que o igual a 9×10^{-12} M.

Los métodos para medir la afinidad de unión de una proteína de unión a antígeno son bien conocidos en la técnica.

Los métodos de uso habitual para la determinación de la afinidad incluyen Resonancia de Plasmón Superficial (SPR, por sus siglas en inglés) (Morton y Myszka "Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors" *Methods in Enzymology* (1998) 295, 268-294), Interferometría de biocapa, (Abdiche et al "Determining Kinetics and Affinities of Protein Interactions Using a Parallel Real-time Label-free Biosensor, the Octet" *Analytical Biochemistry* (2008) 377, 209-217), ensayo de exclusión cinética (KinExA) (Darling y Brault "Kinetic exclusion assay technology: characterization of molecular interactions" *Assay and Drug Dev Tech* (2004) 2, 647-657), calorimetría isotérmica (Pierce et al" *Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions* "Methods (1999) 19, 213-221) y ultracentrifugación analítica (Lebowitz et al "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review" *Protein Science* (2002), 11:2067-2079). El ejemplo 3 proporciona métodos a modo de ejemplo.

Se entiende que cuando se hace referencia a los diversos ejemplos de anticuerpos de unión a ST2 en el presente documento, también abarca los fragmentos de unión a ST2 de los mismos. Un fragmento de unión a ST2 comprende cualquiera de los fragmentos o dominios de los anticuerpos descritos en el presente documento que conserva la capacidad de unirse específicamente a ST2. El fragmento de unión a ST2 puede estar en cualquiera de los armazones descritos en el presente documento.

En determinados ejemplos terapéuticos, una proteína de unión al antígeno ST2 inhibe la unión de ST2 a IL-33 y/o inhibe una o más actividades biológicas asociadas con la unión de ST2 a IL-33, p. ej., la señalización mediada por IL-33. Se dice que tales proteínas de unión a antígeno son "neutralizantes". En determinados ejemplos, la proteína de unión al antígeno ST2 neutralizante se une específicamente a ST2 e inhibe la unión de ST2 a IL-33 desde cualquier punto entre el 10 % y el 100 %, tal como en al menos aproximadamente un 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % o más. Por ejemplo, las proteínas de unión al antígeno ST2 se pueden probar para determinar su capacidad neutralizante determinando la capacidad de la proteína de unión a antígeno para bloquear la unión de IL-33 a ST2 o IL-33 a los correceptores ST2 y AcP, véanse, p. ej., los ensayos de bloqueo de IL-33 del Ejemplo 6. De manera alternativa, las proteínas de unión al antígeno ST2 se pueden probar para determinar su capacidad neutralizante en un ensayo que mide el efecto de la presencia de la proteína de unión al antígeno ST2 en un ensayo que mide una función biológica mediada por IL-33. Por ejemplo, la capacidad de IL-33 para inducir una respuesta biológica, tales como señalización intracelular o aumento de la expresión de ARNm de mediadores o secreción de mediadores como citocinas y quimiocinas de células tales como eosinófilos, basófilos, linfocitos T, mastocitos, células NK, células NKT, neutrófilos o células auxiliares innatas. De manera alternativa, la capacidad de IL-33 para promover la diferenciación, proliferación, supervivencia, quimiotaxis, cambio de forma o propiedades adhesivas de células tales como eosinófilos, basófilos, linfocitos T, mastocitos, células NK, células NKT, neutrófilos o células auxiliares innatas. De manera alternativa, la capacidad de IL-33 para inducir la expresión en la superficie celular de determinados marcadores de activación celular, tales como CD11b, en células tales como eosinófilos, basófilos, linfocitos T, mastocitos, células NK, células NKT, neutrófilos o células auxiliares innatas. En los ejemplos 7-10 se proporcionan métodos a modo de ejemplo.

Ejemplos de proteínas de unión a antígeno pueden comprender una estructura de armazón, como se define de diversas maneras en el presente documento, con una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los ejemplos incluyen además proteínas de unión a antígeno que comprenden una estructura de armazón con uno o más dominios variables de anticuerpo, ya sea pesado o ligero. Los ejemplos incluyen anticuerpos que comprenden un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en Dominio Variable de Cadena Ligera (LCv, por sus siglas en inglés) de Ab1, LCv de Ab2, LCv de Ab3, LCv de Ab4, LCv de Ab5, LCv de Ab6, LCv de Ab7, LCv de Ab8, LCv de Ab9, LCv de Ab10, LCv de Ab11, LCv de Ab30, LCv de Ab32 y LCv de Ab33 (SEQ ID NO: 95-105, 163-165, respectivamente) y/o un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en Dominio variable de cadena pesada (HCv, por sus siglas en inglés) de Ab1, HCv de Ab2, HCv de Ab3, HCv de Ab4, HCv de Ab5, HCv de Ab6, HCv de Ab7, HCv de Ab8, HCv de Ab9, HCv de Ab10, HCv de Ab11, HCv de Ab30, HCv de Ab32 y HCv de Ab33 (SEQ ID NO: 29-39, 145-147, respectivamente), y fragmentos, derivados, muteínas y variantes de los mismos.

Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab1 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 84.

Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab2 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 85.

Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab3 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 86.

Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab4 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 87.

Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab5 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 88.

Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab6 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 89.

- 5 Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab7 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 90.

Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab8 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 91.

- 10 Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab9 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 92.

- 15 Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab10 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 93.

Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab11 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 94.

- 20 Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab30 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 160.

Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab32 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 161.

- 25 Una cadena ligera a modo de ejemplo que comprende el LCv de Ab33 es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 162.

- 30 Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab1 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 18.

Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab2 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 19.

- 35 Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab3 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 20.

Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab4 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 21.

- 40 Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab5 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 22.

- 45 Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab6 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 23.

Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab7 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 24.

- 50 Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab8 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 25.

Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab9 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 26.

- 55 Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab10 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 27.

- 60 Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab11 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 28.

Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab30 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 142.

- 65 Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab32 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 143.

Una cadena pesada a modo de ejemplo que comprende el HCv de Ab33 es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 144.

- 5 Los ejemplos adicionales de armazones que se prevén incluyen: fibronectina, neocarzinostatina CBM4-2, lipocalinas, receptores de linfocitos T, dominio de proteína-A (proteína Z), Im9, proteínas TPR, dominios de dedos de zinc, pVIII, polipéptido pancreático aviar, GCN4, dominio WW, dominio 3 de homología de Src, dominios PDZ, TEM-1 beta-lactamasa, tiorredoxina, nucleasa estafilocócica, dominios de dedos PHD, CL-2, BPTI, APPI, HPSTI, ecotina, LACI-D1, LDTI, MTI-II, toxinas de escorpión, péptido defensina-A de insecto, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, citocromo b-562, dominios del receptor de Ldl, gamma-cristalina, ubiquitina, transferrina y dominios de tipo lectina de tipo C. Los armazones no de anticuerpos y su uso como agentes terapéuticos se revisan en Gebauer y Skerra, Curr. Opin. Chem. Biol., 13:245-255 (2009) y Binz et al., Nat. Biotech., 23(10):1257-1268 (2005).

- 15 En el presente documento se describen anticuerpos que comprenden los siguientes dominios variables: LCv de Ab1/HCv de Ab1 (SEQ ID NO: 95/SEQ ID NO: 29), LCv de Ab2/HCv de Ab2 (SEQ ID NO: 96/SEQ ID NO: 30), LCv de Ab3/HCv de Ab3 (SEQ ID NO: 97/SEQ ID NO: 31), LCv de Ab4/HCv de Ab4 (SEQ ID NO: 98/SEQ ID NO: 32), LCv de Ab5/HCv de Ab5 (SEQ ID NO: 99/SEQ ID NO: 33), LCv de Ab6/HCv de Ab6 (SEQ ID NO: 100/SEQ ID NO: 34), LCv de Ab7/HCv de Ab7 (SEQ ID NO: 101/SEQ ID NO: 35), LCv de Ab8/HCv de Ab8 (SEQ ID NO: 102/SEQ ID NO: 36), LCv de Ab9/HCv de Ab9 (SEQ ID NO: 103/SEQ ID NO: 37), LCv de Ab10/HCv de Ab10 (SEQ ID NO: 104/SEQ ID NO: 38), LCv de Ab11/HCv de Ab11 (SEQ ID NO: 105/SEQ ID NO: 39), LCv de Ab30/HCv de Ab30 (SEQ ID NO: 163/SEQ ID NO: 145), LCv de Ab32/HCv de Ab32 (SEQ ID NO: 164/SEQ ID NO: 146), LCv de Ab33/HCv de Ab33 (SEQ ID NO: 165/SEQ ID NO: 147), y combinaciones de los mismos, así como fragmentos, derivados, muteínas y variantes de los mismos.

- 25 Los anticuerpos a modo de ejemplo descritos en el presente documento incluyen Ab1 (SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 18), Ab2 (SEQ ID NO:85/SEQ ID NO:19), Ab3 (SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:20), Ab4 (SEQ ID NO:87/SEQ ID NO:21), Ab5 (SEQ ID NO:88/SEQ ID NO:22), Ab6 (SEQ ID NO:89/SEQ ID NO:23), Ab7 (SEQ ID NO:90/SEQ ID NO:24), Ab8 (SEQ ID NO:91/SEQ ID NO:25), Ab9 (SEQ ID NO:92/SEQ ID NO:26), Ab10 (SEQ ID NO:93/SEQ ID NO:27), Ab11 (SEQ ID NO:94/SEQ ID NO:28), Ab30 (SEQ ID NO:160/SEQ ID NO:142), Ab32 (SEQ ID NO: 161/SEQ ID NO: 143) y Ab33 (SEQ ID NO: 162/SEQ ID NO: 144).

- 35 Generalmente, cada dominio variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo comprende tres CDR. El dominio variable de cadena pesada comprende una CDR1 de cadena pesada (HCDR1), una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) y una CDR3 de cadena pesada (HCDR3). El dominio variable de cadena ligera comprende una CDR1 de cadena ligera (LCDR1), una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) y una CDR3 de cadena ligera (LCDR3). En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno comprende una o más CDR contenidas dentro de los dominios variables preferidos descritos en el presente documento.

- 40 Ejemplos de tales CDR incluyen, pero sin limitación:

- 45 las CDR del LCv de Ab1: LCDR1 (SEQ ID NO:106), LCDR2 (SEQ ID NO: 117) y LCDR3 (SEQ ID NO: 128);
las CDR del LCv de Ab2: LCDR1 (SEQ ID NO:107), LCDR2 (SEQ ID NO: 118) y LCDR3 (SEQ ID NO: 129);
las CDR del LCv de Ab3: LCDR1 (SEQ ID NO:108), LCDR2 (SEQ ID NO: 119) y LCDR3 (SEQ ID NO: 130);
las CDR del LCv de Ab4: LCDR1 (SEQ ID NO:109), LCDR2 (SEQ ID NO: 120) y LCDR3 (SEQ ID NO: 131);
las CDR del LCv de Ab5: LCDR1 (SEQ ID NO:110), LCDR2 (SEQ ID NO: 121) y LCDR3 (SEQ ID NO: 132);
las CDR del LCv de Ab6: LCDR1 (SEQ ID NO:111), LCDR2 (SEQ ID NO: 122) y LCDR3 (SEQ ID NO: 133);
las CDR del LCv de Ab7: LCDR1 (SEQ ID NO:112), LCDR2 (SEQ ID NO: 123) y LCDR3 (SEQ ID NO: 134);
las CDR del LCv de Ab8: LCDR1 (SEQ ID NO:113), LCDR2 (SEQ ID NO: 124) y LCDR3 (SEQ ID NO: 135);
las CDR del LCv de Ab9: LCDR1 (SEQ ID NO:114), LCDR2 (SEQ ID NO: 125) y LCDR3 (SEQ ID NO: 136);
50 las CDR del LCv de Ab10: LCDR1 (SEQ ID NO:115), LCDR2 (SEQ ID NO: 126) y LCDR3 (SEQ ID NO: 137);
las CDR del LCv de Ab11: LCDR1 (SEQ ID NO:116), LCDR2 (SEQ ID NO: 127) y LCDR3 (SEQ ID NO: 138);
las CDR del LCv de Ab30: LCDR1 (SEQ ID NO:166), LCDR2 (SEQ ID NO: 169) y LCDR3 (SEQ ID NO: 172);
las CDR del LCv de Ab32: LCDR1 (SEQ ID NO:167), LCDR2 (SEQ ID NO: 170) y LCDR3 (SEQ ID NO: 173);
las CDR del LCv de Ab33: LCDR1 (SEQ ID NO:168), LCDR2 (SEQ ID NO: 171) y LCDR3 (SEQ ID NO: 174);
55 las CDR del HCv de Ab1: HCDR1 (SEQ ID NO:40), HCDR2 (SEQ ID NO: 51) y HCDR3 (SEQ ID NO: 62);
las CDR del HCv de Ab2: HCDR1 (SEQ ID NO:41), HCDR2 (SEQ ID NO: 52) y HCDR3 (SEQ ID NO: 63);
las CDR del HCv de Ab3: HCDR1 (SEQ ID NO:42), HCDR2 (SEQ ID NO: 53) y HCDR3 (SEQ ID NO: 64);
las CDR del HCv de Ab4: HCDR1 (SEQ ID NO:43), HCDR2 (SEQ ID NO: 54) y HCDR3 (SEQ ID NO: 65);
las CDR del HCv de Ab5: HCDR1 (SEQ ID NO:44), HCDR2 (SEQ ID NO: 55) y HCDR3 (SEQ ID NO: 66);
60 las CDR del HCv de Ab6: HCDR1 (SEQ ID NO:45), HCDR2 (SEQ ID NO: 56) y HCDR3 (SEQ ID NO: 67);
las CDR del HCv de Ab7: HCDR1 (SEQ ID NO:46), HCDR2 (SEQ ID NO: 57) y HCDR3 (SEQ ID NO: 68);
las CDR del HCv de Ab8: HCDR1 (SEQ ID NO:47), HCDR2 (SEQ ID NO: 58) y HCDR3 (SEQ ID NO: 69);
las CDR del HCv de Ab9: HCDR1 (SEQ ID NO:48), HCDR2 (SEQ ID NO: 59) y HCDR3 (SEQ ID NO: 70);
las CDR del HCv de Ab10: HCDR1 (SEQ ID NO:49), HCDR2 (SEQ ID NO: 60) y HCDR3 (SEQ ID NO: 71);
65 las CDR del HCv de Ab11: HCDR1 (SEQ ID NO:50), HCDR2 (SEQ ID NO: 61) y HCDR3 (SEQ ID NO: 72);
las CDR del HCv de Ab30: HCDR1 (SEQ ID NO:148), HCDR2 (SEQ ID NO: 151) y HCDR3 (SEQ ID NO: 154);

las CDR del HCv de Ab32: HCDR1 (SEQ ID NO:149), HCDR2 (SEQ ID NO: 152) y HCDR3 (SEQ ID NO: 155); y las CDR del HCv de Ab33: HCDR1 (SEQ ID NO:150), HCDR2 (SEQ ID NO: 153) y HCDR3 (SEQ ID NO: 156).

En algunos ejemplos, la proteína de unión a antígeno comprende: A) un polipéptido, p. ej., una cadena ligera, que comprende una LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167 y 168; una LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170 y 171; y/o una LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173 y 174; y/o B) un polipéptido, p. ej., una cadena pesada, que comprende una HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 y 150; una HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 y 153; y/o una HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 y 156.

En ejemplos adicionales, la proteína de unión a antígeno comprende A) una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de cualquiera de LCv de Ab1, LCv de Ab2, LCv de Ab3, LCv de Ab4, LCv de Ab5, LCv de Ab6, LCv de Ab7, LCv de Ab8, LCv de Ab9, LCv de Ab10, LCv de Ab11, LCv de Ab30, LCv de Ab32 y LCv de Ab33 y B) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de cualquiera de HCv de Ab1, HCv de Ab2, HCv de Ab3, HCv de Ab4, HCv de Ab5, HCv de Ab6, HCv de Ab7, HCv de Ab8, HCv de Ab9, HCv de Ab10, HCv de Ab11, HCv de Ab30, HCv de Ab32 y HCv de Ab33.

En determinados ejemplos, las CDR no incluyen más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, o no más de seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de una CDR a modo de ejemplo expuesta en el presente documento.

En el presente documento se describen anticuerpos que comprenden un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 y 165. En el presente documento se describen anticuerpos que comprenden un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 y 147. En el presente documento se describen además anticuerpos que comprenden A) un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 y 165, y B) un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 y 147.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier región constante conocida en la técnica. La región constante de cadena ligera puede ser, por ejemplo, una región constante de la cadena ligera de tipo kappa o lambda, p. ej., una región constante de cadena ligera de tipo kappa o lambda humana. La región constante de cadena pesada puede ser, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de tipo alfa-, delta-, épsilon-, gamma- o mu-, p. ej., una región constante de cadena pesada de tipo alfa-, delta-, épsilon-, gamma- o mu- humana. En una realización, la región constante de cadena ligera o pesada es un fragmento, derivado, variante o muteína de una región constante de origen natural.

Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 y 165 que tengan no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve, o no más de diez adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos. Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 y 147 que tengan no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve, o no más de diez adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos. Anticuerpos adicionales descritos en el presente documento incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 y 165 que tengan no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve, o no más de diez adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos, y B) una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 y 147 que tengan no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve, o no más de diez adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos.

En una variación, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste

- en las SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 y 165. En otra variación, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 y 147. En una variación adicional más, la proteína de unión a antígeno comprende A) una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 y 165, y B) una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 y 147.
- En determinados ejemplos, la proteína de unión a antígeno comprende una CDR3 de cadena ligera y/o de cadena pesada. En algunos ejemplos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 y 156. En determinados ejemplos, la secuencia de aminoácidos incluye no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, o no más de seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia a modo de ejemplo expuesta en las SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 y 156. Por lo tanto, los ejemplos descritos en el presente documento incluyen proteína de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 y 156.
- En determinados ejemplos, la proteína de unión a antígeno comprende una CDR2 de cadena ligera y/o de cadena pesada. En algunos ejemplos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 y 153. En determinados ejemplos, la secuencia de aminoácidos incluye no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, o no más de seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia a modo de ejemplo expuesta en las SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 y 153. Por lo tanto, los ejemplos descritos en el presente documento incluyen proteína de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 y 153.
- En determinados ejemplos, la proteína de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena ligera y/o de cadena pesada. En algunos ejemplos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 y 150. En determinados ejemplos, la secuencia de aminoácidos incluye no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, o no más de seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia a modo de ejemplo expuesta en las SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 y 150. Por lo tanto, los ejemplos incluyen proteína de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 y 150.
- Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento comprenden los armazones de los anticuerpos tradicionales, incluyendo anticuerpos humanos y monoclonales, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, minicuerpos,

anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (en ocasiones denominados en el presente documento "miméticos de anticuerpo"), anticuerpos quiméricos, fusiones de anticuerpos (en ocasiones denominadas "conjugados de anticuerpos") y fragmentos de cada uno, respectivamente. Las CDR descritos anteriormente, que incluyen varias combinaciones de las CDR, puede injertarse en cualquiera de los siguientes armazones.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a las diversas formas de proteínas monoméricas o multiméricas que comprenden una o más cadenas polipeptídicas que se unen específicamente a un antígeno, como se describe de diversas maneras en el presente documento. En determinadas realizaciones, los anticuerpos se producen mediante técnicas de ADN recombinante. En realizaciones adicionales, los anticuerpos se producen por escisión enzimática o química de anticuerpos de origen natural. En otro aspecto, el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en: a) un anticuerpo humano; b) un anticuerpo humanizado; c) un anticuerpo quimérico; d) un anticuerpo monoclonal; e) un anticuerpo policlonal; f) un anticuerpo recombinante; g) un fragmento de unión a antígeno; h) un anticuerpo monocatenario; i) un diacuerpo; j) un triacuerpo, k) un tetracuerpo, l) un fragmento Fab; m) fragmento F(ab')₂, n) un anticuerpo IgA, o) un anticuerpo IgD, p) un anticuerpo IgE, q) un anticuerpo IgG1, r) un anticuerpo IgG2, s) un anticuerpo IgG3, t) un anticuerpo IgG4 y u) un anticuerpo IgM.

Una región o dominio variable comprende al menos tres CDR de cadena pesada o ligera embebidas dentro de una región marco (regiones marco designadas FR1, FR2, FR3 y FR4. Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD. Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales comprenden generalmente un tetrámero. Cada tetrámero se compone generalmente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" y una "pesada". La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo de los anticuerpos tal como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La IgG tiene varias subclases, incluyendo, pero sin limitación IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases, incluyendo, pero sin limitación IgM1 e IgM2. Las realizaciones de la invención incluyen todas las clases y subclases de anticuerpos que incorporan los dominios variables de las proteínas de unión a antígeno de la invención.

Algunos anticuerpos de origen natural, como los que se encuentran en los camellos y las llamas, son dímeros que consisten en dos cadenas pesadas y no incluyen cadenas ligeras. También se describen en el presente documento anticuerpos dimericos de dos cadenas pesadas, o fragmentos de los mismos, que se pueden unir a ST2.

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera muestran generalmente la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, es decir, las regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR son las responsables principalmente del reconocimiento y la unión al antígeno. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean mediante las regiones marco, lo que permite la unión a un epítipo específico. De N-terminal a C-terminal, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. La asignación de los aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat.

Las CDR constituyen los principales puntos de contacto de superficie para la unión al antígeno. La CDR3 o la cadena ligera y, particularmente, la CDR3 de la cadena pesada puede constituir los determinantes más importantes en la unión al antígeno dentro de las regiones variables de cadena ligera y pesada. En algunos anticuerpos, la CDR3 de cadena pesada parece constituir el área principal de contacto entre el antígeno y el anticuerpo. Los esquemas de selección *in vitro* en los que se varía solamente la CDR3 se pueden usar para variar las propiedades de unión de un anticuerpo o determinar qué restos contribuyen a la unión de un antígeno.

Los anticuerpos de origen natural generalmente incluyen una secuencia señal, que dirige el anticuerpo hacia la vía celular para la secreción de proteínas y que normalmente no está presente en el anticuerpo maduro. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención puede codificar una secuencia señal de origen natural o una secuencia señal heteróloga como se describe a continuación.

En un ejemplo, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo que comprende de una a seis de las CDR a modo de ejemplo descritas en el presente documento. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier tipo, incluyendo anticuerpo IgM, IgG (que incluye IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgD, IgA o IgE. En una realización específica, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo de tipo IgG, p. ej., un anticuerpo IgG1.

En algunos ejemplos, por ejemplo, cuando la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo con cadenas ligeras y pesadas completas, las CDR son todas de la misma especie, p. ej., humanas. De manera alternativa, por ejemplo, en ejemplos en los que la proteína de unión a antígeno contiene menos de seis CDR de las secuencias descritas anteriormente, las CDR adicionales pueden ser de otras especies o pueden ser CDR humanas diferentes de las representadas en las secuencias a modo de ejemplo. Por ejemplo, las regiones HCDR3 y LCDR3 de las secuencias apropiadas identificadas en el presente documento pueden usarse con HCDR1, HCDR2, LCDR1 y LCDR2 seleccionándose opcionalmente de secuencias de anticuerpos de especies alternativas o humanos, o combinaciones

de las mismas. Por ejemplo, las CDR descritas en el presente documento pueden reemplazar las regiones CDR de anticuerpos quiméricos o humanizados comercialmente relevantes.

Los ejemplos específicos utilizan componentes de armazón de las proteínas de unión a antígeno que son componentes humanos. En algunos ejemplos, sin embargo, los componentes de armazón pueden ser una mezcla de diferentes especies. Como tal, si la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo, tal anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto los "anticuerpos quiméricos" como los "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos quiméricos" comprenden tradicionalmente la región o regiones variables de un ratón (o rata, en algunos casos) y la región o regiones constantes de un ser humano.

"Anticuerpos humanizados" generalmente se refiere a anticuerpos no humanos a los que se les han intercambiado las regiones marco de dominio variable por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. Por lo general, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto una o más CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto dentro de una o más CDR. Las CDR, algunos o la totalidad están codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en el marco de la hoja beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad está determinada por las CDR injertadas. La creación de tales anticuerpos se describe en, p. ej., el documento WO 92/11018, Jones 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536. Los anticuerpos humanizados también se pueden generar utilizando ratones con un sistema inmunitario modificado por ingeniería genética. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. En las realizaciones a modo de ejemplo descritas en el presente documento, las CDR identificadas son humanas y, por tanto, tanto los anticuerpos humanizados como los quiméricos en este contexto incluyen algunas CDR no humanas; por ejemplo, se pueden generar anticuerpos humanizados que comprenden las regiones HCDR3 y LCDR3, siendo una o más de las otras regiones CDR de un origen de especie diferente.

En una realización, la proteína de unión al antígeno ST2 es un anticuerpo multiespecífico y, en particular, un anticuerpo biespecífico, también denominados a veces "diacuerpos". Estos son anticuerpos que se unen a dos o más antígenos diferentes o epítomos diferentes en un solo antígeno. En determinadas realizaciones, un anticuerpo biespecífico se une a ST2 y a un antígeno en una célula efectora humana (p. ej., linfocito T). Dichos anticuerpos son útiles para dirigir una respuesta de células efectoras contra células que expresan ST2, tal como una célula tumoral que expresa ST2. En realizaciones preferidas, el antígeno de la célula efectora humana es CD3. Patente de Estados Unidos N.º 7.235.641. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Uno de tales métodos implica modificar por ingeniería la porción Fc de las cadenas pesadas como para crear "botones" y "ojales" que facilitan la formación de heterodímeros de las cadenas pesadas cuando se coexpresan en una célula. Documento US 7.695.963. Otro método también implica modificar por ingeniería la porción Fc de la cadena pesada, pero utiliza la dirección electrostática para estimular la formación de heterodímeros y evitar la formación de homodímeros de las cadenas pesadas cuando se coexpresa en una célula. Documento WO 09/089.004.

En una realización, la proteína de unión al antígeno ST2 es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas similares a anticuerpos minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio CH3. Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061.

Como se describe en el presente documento, la proteína de unión al antígeno ST2 es un anticuerpo de dominio; véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.248.516. Los anticuerpos de dominio (dAb, por sus siglas en inglés) son dominios de unión funcional de anticuerpos, que corresponden a las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL) de los anticuerpos humanos. Los dAb tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa, o menos de una décima parte del tamaño de un anticuerpo completo. Los dAb se expresan bien en varios hospedadores, incluyendo los sistemas celulares bacterianos, de levaduras y de células de mamífero. Además, los dAb son muy estables y conservan la actividad incluso después de haber sido sometidos a condiciones adversas, tal como liofilización o desnaturalización por calor. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; Número de serie de EE. UU. 2004/0110941; la Patente Europea 0368684; la Patente de Estados Unidos 6.696.245, los documentos WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609.

En una realización, la proteína de unión al antígeno ST2 es un fragmento de anticuerpo, que es un fragmento de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento que conservan la especificidad de unión a ST2 en la medida en que la realización se encuentre cubierta por las reivindicaciones. En diversas realizaciones, las proteínas de unión a anticuerpos comprenden, pero sin limitación, un F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv, o fragmentos Fv monocatenarios. Como mínimo, un anticuerpo, tal como se entiende en el presente documento, comprende un polipéptido que puede unirse específicamente a ST2 que comprende la totalidad o parte de una región variable de cadena ligera o pesada, tal como una o más CDR.

Ejemplos adicionales de fragmentos de anticuerpos que se unen a ST2 incluyen, pero sin limitación, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546) que consiste en una sola variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en los que

un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883), (viii) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión génica (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; documento WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448). Los fragmentos de anticuerpos se pueden modificar. Por ejemplo, las moléculas se pueden estabilizar mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245). En algunos ejemplos, los componentes que no son CDR de estos fragmentos son secuencias humanas.

En una realización, la proteína de unión al antígeno ST2 es un anticuerpo completamente humano. En esta realización, como se describe anteriormente, las estructuras específicas comprenden cadenas ligeras y pesadas completas representadas que comprenden las regiones CDR. Los ejemplos adicionales utilizan una o más de las CDR descritas en el presente documento, con las otras CDR, regiones marco, regiones J y D, regiones constantes, etc., procedentes de otros anticuerpos humanos. Por ejemplo, las CDR descritas en el presente documento pueden reemplazar las CDR de cualquier número de anticuerpos humanos, particularmente anticuerpos relevantes comercialmente

Los anticuerpos monocatenarios pueden formarse uniendo fragmentos de dominio variable de cadena pesada y ligera (región Fv) a través de un puente de aminoácidos (enlazador peptídico corto), dando como resultado una cadena polipeptídica única. Dichos Fv monocatenarios (scFv) se han preparado fusionando el ADN que codifica un enlazador peptídico entre los ADN que codifican los dos polipéptidos de dominio variable (V_L y V_H). Los polipéptidos resultantes pueden plegarse sobre sí mismos para formar monómeros de unión a antígeno, o pueden formar multímeros (p. ej., dímeros, trímeros y tetrameros), dependiendo de la longitud de un enlazador flexible entre los dos dominios variables (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Al combinar diferentes polipéptidos que comprenden V_L y V_H, se pueden formar scFv multiméricos que se unen a diferentes epítomos (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos monocatenarios incluyen las descritas en la Patente de Estados Unidos N.º 4.946.778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87. Se describen en el presente documento anticuerpos monocatenarios derivados de los anticuerpos proporcionados en el presente documento (incluidos, pero sin limitación, scFv que comprenden las combinaciones de dominios variables de LCv de Ab1 LCv/HCv de Ab1 (SEQ ID NO: 95/SEQ ID NO: 29), LCv de Ab2/HCv de Ab2 (SEQ ID NO: 96/SEQ ID NO: 30), LCv de Ab3/HCv de Ab3 (SEQ ID NO: 97/SEQ ID NO: 31), LCv de Ab4/HCv de Ab4 (SEQ ID NO: 98/SEQ ID NO: 32), LCv de Ab5/HCv de Ab5 (SEQ ID NO: 99/SEQ ID NO: 33), LCv de Ab6/HCv de Ab6 (SEQ ID NO: 100/SEQ ID NO: 34), LCv de Ab7/HCv de Ab7 (SEQ ID NO: 101/SEQ ID NO: 35), LCv de Ab8/HCv de Ab8 (SEQ ID NO: 102/SEQ ID NO: 36), LCv de Ab9/HCv de Ab9 (SEQ ID NO: 103/SEQ ID NO: 37), LCv de Ab10 LCv/HCv de Ab10 (SEQ ID NO: 104/SEQ ID NO: 38) y LCv de Ab11/HCv de Ab11 (SEQ ID NO: 105/SEQ ID NO: 39), LCv de Ab30/HCv de Ab30 (SEQ ID NO: 163/SEQ ID NO: 145), LCv de Ab32/HCv de Ab32 (SEQ ID NO: 164/SEQ ID NO: 146), LCv de Ab33/HCv de Ab33 (SEQ ID NO: 165/SEQ ID NO: 147), y combinaciones de los mismos.

En una realización, la proteína de unión al antígeno ST2 es una proteína de fusión de anticuerpos (a veces denominada en el presente documento "conjugado de anticuerpos"). La pareja conjugada puede ser proteica o no proteica; esta última generalmente se genera usando grupos funcionales en la proteína de unión a antígeno y en la pareja conjugada. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con una sustancia química (fármaco) no proteica para formar un conjugado de anticuerpo fármaco.

También se describe en el presente documento una proteína de unión al antígeno ST2 que es un análogo de anticuerpo, a veces denominados "anticuerpos sintéticos". Por ejemplo, varios trabajos utiliza armazones de proteínas alternativos o armazones artificiales con CDR injertadas. Dichos armazones incluyen, pero sin limitación, mutaciones introducidas para estabilizar la estructura tridimensional de la proteína de unión, así como armazones totalmente sintéticos que consisten, por ejemplo, en polímeros biocompatibles. Véase, por ejemplo, Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volumen 53, Issue 1:121-129. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. Además, se pueden utilizar miméticos de anticuerpos peptídicos ("PAM, por sus siglas en inglés"), así como trabajos basados en miméticos de anticuerpos que utilizan componentes de fibronectina como un almacén.

Por "proteína", como se usa en el presente documento, se entiende al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. Los dos o más aminoácidos unidos covalentemente pueden unirse mediante un enlace peptídico. La proteína puede estar compuesta de aminoácidos de origen natural y enlaces peptídicos, por ejemplo, cuando la proteína se produce de forma recombinante utilizando sistemas de expresión y células hospedadoras, como se describe a continuación. De manera alternativa, la proteína puede incluir aminoácidos sintéticos (p. ej., homofenilalanina, citrulina, ornitina y norleucina), o estructuras peptidomiméticas, es decir, "análogos de péptidos o proteínas", tal como los peptoides (véase, Simon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:9367), que pueden ser resistente a proteasas o a otras condiciones fisiológicas y/o de almacenamiento. Dichos aminoácidos sintéticos pueden incorporarse en particular cuando se sintetiza la proteína de unión a antígeno *in vitro* por métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Además, puede usarse cualquier combinación de restos/ estructuras peptidomiméticos, sintéticos y de origen natural. "Aminoácido" también incluye restos de aminoácidos tales como prolina e hidroxiprolina. El "grupo R" o la "cadena lateral" de los aminoácidos pueden estar en la configuración (L) o (S). En un ejemplo específico, los aminoácidos están en la configuración (L) o (S).

En determinados aspectos, la presente solicitud describe proteínas de unión a antígeno recombinantes que se unen a ST2 y, en algunos ejemplos, un ST2 humano recombinante o una porción del mismo. En este contexto, una "proteína recombinante" es una proteína preparada usando técnicas recombinantes que usan cualquier técnica y método conocidos en la técnica, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante como se describe en el presente documento. Los métodos y técnicas para la producción de proteínas recombinantes se conocen bien en la técnica. Los ejemplos incluyen proteínas de unión a antígeno recombinantes que se unen a ST2 de tipo silvestre y variantes de las mismas.

"Que consiste esencialmente en" significa que la secuencia de aminoácidos puede variar en aproximadamente un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 % con respecto a la secuencia enumerada SEQ ID NO: y aún conserva la actividad biológica, tal como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son proteínas aisladas o proteínas sustancialmente puras. Una proteína "aislada" no está acompañada por al menos parte del material con el que normalmente está asociada en su estado natural, por ejemplo, constituyendo al menos aproximadamente el 5 %, o al menos aproximadamente el 50 % en peso de la proteína total en una muestra dada. Se entiende que la proteína aislada puede constituir del 5 al 99,9 % en peso del contenido total de proteína dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, la proteína se puede producir en una concentración significativamente mayor mediante el uso de un promotor inducible o un promotor de alta expresión, de modo que la proteína se produce a niveles de concentración aumentados. La definición incluye la producción de una proteína de unión a antígeno en una amplia variedad de organismos y/o células hospedadoras que se conocen en la técnica.

Para las secuencias de aminoácidos, la identidad y/o similitud de secuencia se determina mediante el uso de técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, el algoritmo de alineación de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, preferentemente utilizando la configuración predeterminada o mediante inspección. Preferentemente, FastDB calcula el porcentaje de identidad en función de los siguientes parámetros: penalización por falta de coincidencia de 1; penalización por hueco de 1; penalización por tamaño de hueco de 0,33; y penalización por unión de 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, págs. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones progresivas por pares. También traza un árbol que muestra las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del procedimiento de alineación progresiva de Feng y Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; el método es similar al descrito por Higgins y Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Parámetros útiles de PILEUP incluyen un peso de hueco predeterminado de 3,00, un peso predeterminado de la longitud de hueco de 0,10 y los huecos finales ponderados.

Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en: Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; y Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877. Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. WU-BLAST-2 usa diversos parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se configuran a los valores por defecto. Los parámetros ajustables se fijan con los siguientes valores: lapso de solapamiento=1, fracción de solapamiento=0,125, umbral de palabra (T)=11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y la composición de la base de datos particular contra la cual se busca la secuencia de interés; sin embargo, los valores pueden ajustarse para aumentar la sensibilidad.

Un algoritmo útil adicional es BLAST con huecos de acuerdo con lo informado por Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. BLAST con huecos utiliza puntuaciones de sustitución BLOSUM-62; parámetro de umbral T establecido en 9; el método de dos hits para desencadenar extensiones sin huecos, carga longitudes de hueco de coste de Ka de 10+k; X_u establecido en 16 y X_g establecido en 40 para la etapa de búsqueda de la base de datos y en 67 para la etapa de salida de los algoritmos. Las alineaciones con huecos se desencadenan mediante una puntuación correspondiente a aproximadamente 22 bits.

Por lo general, la homología, similitud o identidad de los aminoácidos, entre las CDR variantes individuales es de al menos un 80 % con respecto a las secuencias representadas en el presente documento, y más generalmente con homologías o identidades preferentemente crecientes de al menos un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y casi 100 %. De manera similar, el "porcentaje (%) de identidad de secuencia de los ácidos nucleicos" con respecto a la secuencia de los ácidos nucleicos de las proteínas de unión identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de restos de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los

restos de nucleótidos en la secuencia codificante de la proteína de unión a antígeno. Un método específico utiliza el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 configurado con los parámetros predeterminados, con el intervalo de solapamiento y la fracción de solapamiento establecidos en 1 y 0,125, respectivamente.

Por lo general, la homología, similitud o identidad de las secuencias de los ácidos nucleicos entre las secuencias de nucleótidos que codifican las CDR variantes individuales y las secuencias de nucleótidos representadas en el presente documento es de al menos un 80 %, y más generalmente con homologías o identidades preferentemente crecientes de al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % y casi 100 %.

Por lo tanto, una "CDR variante" es una con la homología, similitud o identidad especificada, con la CDR precursora descrita en el presente documento, y comparte la función biológica, incluyendo, pero sin limitación, al menos el 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la especificidad y/o actividad de la CDR original.

Aunque el sitio o región para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la mutación *per se* no es necesario que esté predeterminada. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio determinado, la mutagénesis aleatoria se puede llevar a cabo en el codón o región diana y las variantes de CDR de la proteína de unión a antígeno expresadas se exploran para la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para realizar mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, mutagénesis del cebador M13 y mutagénesis por PCR. La exploración de los mutantes se realiza usando ensayos de actividades de proteínas de unión a antígeno, tal como la unión a ST2.

Las sustituciones de aminoácidos normalmente son de restos individuales; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente uno (1) a aproximadamente veinte (20) restos de aminoácidos, aunque se pueden tolerar inserciones considerablemente más grandes. Las eliminaciones varían de aproximadamente uno (1) a aproximadamente veinte (20) restos de aminoácidos, aunque en algunos casos las eliminaciones pueden ser mucho mayores.

Pueden usarse sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para llegar a una variante o derivado final. Generalmente estos cambios se realizan en unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula, particularmente la inmunogenicidad y especificidad de la proteína de unión a antígeno. Sin embargo, se pueden tolerar cambios mayores en determinadas circunstancias. Las sustituciones conservativas se realizan generalmente de acuerdo con el siguiente cuadro que se muestra en la TABLA 3.

Tabla 3

Sustituciones A modo de ejemplo de Restos Originales	
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Los cambios sustanciales en la función o identidad inmunitaria se realizan seleccionando sustituciones que son menos conservativas que las mostradas en la TABLA 3. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones que afecten de manera más significativa: la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la alteración, por ejemplo, la estructura alfa-helicoidal o de hoja beta; la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades de los polipéptidos son aquellas en las que (a) un resto hidrófilo, p. ej., serilo o treonilo, se sustituye por (o mediante) un resto hidrófobo, p. ej., leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se sustituye por (o mediante) cualquier otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, p. ej., lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye

por (o mediante) un resto electronegativo, p. ej., glutamilo o aspartilo; o (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, p. ej., fenilalanina, se sustituye por (o mediante) uno que no tiene una cadena lateral, p. ej., glicina.

Las variantes muestran generalmente la misma actividad biológica cualitativa y provocarán la misma respuesta inmunitaria que el análogo de origen natural, aunque también se seleccionan variantes para modificar las características de las proteínas de unión al antígeno según sea necesario. De manera alternativa, la variante puede diseñarse de manera que se altere la actividad biológica de la proteína de unión a antígeno. Por ejemplo, los sitios de glicosilación se pueden alterar o eliminar como se analiza en el presente documento.

Otros derivados de anticuerpos de ST2 dentro del alcance de esta invención incluyen conjugados covalentes o de agregación de anticuerpos de ST2, o fragmentos de los mismos, con otras proteínas o polipéptidos, tal como por la expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados al extremo N o al extremo C de un polipéptido de anticuerpo de ST2. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido de señal heteróloga (o líder), p. ej., el líder del factor alfa de levadura, o un péptido tal como una etiqueta de epítipo. Las proteínas de fusión que contienen anticuerpos de ST2 pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación del anticuerpo de ST2 (p. ej., poli-His). Un polipéptido de anticuerpo de ST2 también se puede unir al péptido FLAG como se describe en Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988 y en la Patente de Estados Unidos 5.011.912. El péptido FLAG es altamente antigénico y proporciona un epítipo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal específico (mAb, por sus siglas en inglés), permitiendo un ensayo rápido y una purificación fácil de la proteína recombinante expresada. Los reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en las que el péptido FLAG se fusiona con un polipéptido dado están disponibles comercialmente (Sigma, St. Louis, MO).

En una realización, se prepara un oligómero usando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión que comprenden determinados polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (que incluyen el dominio Fc) se ha descrito, p. ej., por Ashkenazi et al., 1991, *PNAS USA* 88:10535; Byrn et al., 1990, *Nature* 344:677; y Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en *Current Protocols in Immunology*, Supl. 4, páginas 10.19.1 - 10.19.11.

Una realización de la presente invención está dirigida a un dímero que comprende dos proteínas de fusión creadas fusionando un fragmento de unión a ST2 de un anticuerpo de ST2, de acuerdo con las reivindicaciones, a la región Fc de un anticuerpo. El dímero se puede producir, por ejemplo, insertando una fusión génica que codifica la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, expresando la fusión génica en las células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante, y permitiendo que la proteína de fusión expresada se junte de forma muy similar a las moléculas de anticuerpos, tras lo cual se forman enlaces disulfuro entre cadenas entre los restos Fc para producir el dímero.

El término "polipéptido de Fc" como se usa en el presente documento incluye formas nativas y muteínas de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. También se incluyen formas truncadas de tales polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización. Las proteínas de fusión que comprenden restos Fc (y oligómeros formados a partir de ellos) ofrecen la ventaja de una purificación fácil mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de Proteína A o Proteína G.

Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, es un polipéptido monocatenario que se extiende desde la región bisagra N-terminal al extremo C natural de la región Fc de un anticuerpo IgG humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la Patente de Estados Unidos 5.457.035 y en Baum et al., 1994, *EMBO J.* 13:3992-4001. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia Fc natural presentada en el documento WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muteína muestra una afinidad reducida por los receptores de Fc.

En otras realizaciones, la porción variable de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de ST2 puede sustituirse por la porción variable de una cadena pesada y ligera de un anticuerpo.

Otro método para preparar derivados oligoméricos de anticuerpos de ST2 implica el uso de una cremallera de leucina. Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión al ADN (Landschulz et al., 1988, *Science* 240:1759), y desde entonces se han encontrado en varias proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran los péptidos de origen natural y derivados de los mismos que dimerizan o trimerizan. Ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada de la proteína D del surfactante de pulmón (SPD) se describe en Hoppe et al., 1994, *FEBS Letters* 344:191. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a la misma se describe en Fanslow et al., 1994, *Semin. Immunol.* 6:267-78. En un enfoque, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un fragmento de anticuerpo de ST2 o derivado fusionado a un péptido de cremallera de leucina se expresan en células hospedadoras adecuadas, y los fragmentos o derivados oligoméricos del anticuerpo de ST2 solubles que se forman se recuperan del sobrenadante de cultivo.

Las modificaciones covalentes de las proteínas de unión a antígeno se incluyen dentro del alcance de esta invención y generalmente, pero no siempre, se realizan postraduccionalmente. Por ejemplo, se introducen en la molécula varios tipos de modificaciones covalentes de la proteína de unión a antígeno haciendo reaccionar restos de aminoácidos

5 específicos de la proteína de unión a antígeno con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los restos N o C terminales.

Los restos de cisteinilo se hacen reaccionar muy frecuentemente con α -haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos

10 de cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozolil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, 3-nitro-2-piridil disulfuro, 2-piridil disulfuro de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los restos de histidilo se derivatizan por reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. También es útil el bromuro de parabromofenacilo; la

15 reacción se realiza preferentemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

Los restos lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos succínicos u otros anhídridos de ácidos carboxílicos. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los restos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar restos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato

20 de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasas con glicilato.

Los restos de arginilo se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de los restos de arginina requiere que la reacción

25 se realice en condiciones alcalinas debido al alto pK_a del grupo funcional guanidina. Adicionalmente, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como con el grupo épsilon-amino de la arginina.

Se puede realizar la modificación específica de restos de tirosilo, con particular interés en la introducción de marcadores espectrales en restos de tirosilo por reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Muy frecuentemente, se utilizan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados

30 3-nitro, respectivamente. Los restos de tirosilo se yodan usando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de cloramina T descrito anteriormente.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidas ($R'-N=C=N-R'$), donde R y R 'son opcionalmente grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Adicionalmente, los restos de aspartilo y glutamilo se

35 convierten en restos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular proteínas de unión a antígeno en una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su uso en varios métodos. Los agentes de reticulación usados frecuentemente incluyen, p. ej., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por

40 ejemplo, ésteres de ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato) y maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano.

Los agentes derivatizantes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato producen intermedios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. De manera alternativa, se emplean matrices reactivas

45 insolubles en agua tales como hidratos de carbono activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las Patentes de Estados Unidos N.º 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 para la inmovilización de proteínas.

Los restos glutaminilo y asparaginilo son frecuentemente desamidados a los restos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. De manera alternativa, estos restos se desamidan en condiciones ligeramente

50 ácidas. Cualquiera de las formas de estos restos cae dentro del alcance de esta invención.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de los grupos hidroxilo de los restos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (TE Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, págs. 79-86), acetilación de

55 la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente de la proteína de unión a antígeno incluida dentro del alcance de esta invención comprende alterar el patrón de glicosilación de la proteína. Como se conoce en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (por ejemplo, la presencia o ausencia de restos de aminoácidos

60 de glicosilación particulares, analizados a continuación) como de la célula u organismo hospedadora en el que se produce la proteína. Los sistemas de expresión particulares se analizan a continuación.

Normalmente, la glicosilación de polipéptidos está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto

65

de hidrato de carbono con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripeptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa, a un hidroxiaminoácido, más frecuentemente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Se realiza convenientemente la adición de sitios de glucosilación a la proteína de unión a antígeno alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución por, uno o más resto de serina o treonina en la secuencia de partida (para sitios de glicosilación ligados a O). Para facilitar, la secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a antígeno se altera preferentemente a través de cambios a nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido diana en bases preseleccionadas de modo que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otros medios para aumentar el número de restos de hidratos de carbono en la proteína de unión a antígeno son mediante el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción de la proteína en una célula hospedadora que tenga capacidades de glicosilación para la glicosilación ligada a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, los azúcares pueden estar unidos a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrido libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306.

La eliminación de restos de hidratos de carbono presentes en la proteína de unión a antígeno de partida se puede realizar química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o a un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o la totalidad de los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacto el polipéptido. La desglicosilación química está descrita por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos de hidratos de carbono en polipéptidos se puede lograr mediante el uso de varias endo y exoglicosidasas como se describe por Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glicosilación en sitios potenciales de glicosilación se puede evitar mediante el uso del compuesto tunicamicina como se describe por Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glucósido.

Otro tipo de modificación covalente de la proteína de unión a antígeno comprende enlazar la proteína de unión a antígeno a diversos polímeros no proteicos, incluyendo, pero sin limitación, diversos polioles tales como polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las Patentes de Estados Unidos N.º 4640835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. Además, como se conoce en la técnica, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos en diversas posiciones dentro de la proteína de unión a antígeno para facilitar la adición de polímeros tales como PEG.

En algunas realizaciones, la modificación covalente de las proteínas de unión a antígeno de la invención comprende la adición de uno o más marcadores.

El término "grupo de marcado" significa cualquier marcador detectable. Ejemplos de grupos de marcado adecuados incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), grupos fluorescentes (p. e., FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), grupos enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotínico, o epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomo). En algunas realizaciones, el grupo de marcado está acoplado a la proteína de unión a antígeno a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir posibles impedimentos estéricos. Se conocen en la técnica diversos métodos para marcar proteínas y se pueden usar para realizar la presente invención.

En general, los marcadores se dividen en varias clases, dependiendo del ensayo en el que se vayan a detectar: a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados; b) marcadores magnéticos (por ejemplo, partículas magnéticas); c) restos activos redox; d) colorantes ópticos; grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomos, etc.). En algunas realizaciones, el grupo de marcado está acoplado a la proteína de unión a antígeno a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir posibles impedimentos estéricos. Se conocen en la técnica diversos métodos para marcar proteínas y se pueden usar para realizar la presente invención.

Los marcadores específicos incluyen colorantes ópticos, incluyendo, pero sin limitación, cromóforos, fósforos y fluoróforos, siendo este último específico en muchos casos. Los fluoróforos pueden ser fluorescentes de "molécula pequeña" o fluorescentes proteicos.

Por "marcador fluorescente" se entiende cualquier molécula que pueda detectarse a través de sus propiedades fluorescentes inherentes. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero sin limitación, fluoresceína, rodamina, tetrametil rodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, Verde malacita, estilbena, Amarillo Lucifer, Cascade BlueJ, Rojo Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, verde Oregón, los colorantes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, Oregón), FITC, Rodamina y Rojo Texas (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Se describen colorantes ópticos adecuados, incluyendo fluoróforos, en Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

Los marcadores fluorescentes proteicos adecuados también incluyen, pero sin limitación, proteína fluorescente verde, incluyendo una Renilla, Ptilosarcus, o especies de Aequorea de GFP (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Número de Registro Genbank U55762), proteína azul fluorescente (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8º piso, Montreal, Quebec, Canadá H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferasa (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β galactosidasa (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) y Renilla (documentos WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, Patentes de Estados Unidos N.º 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558).

Las proteínas de unión a antígeno a modo de ejemplo descritas en el presente documento tienen propiedades en función del epítipo distinto de ST2 unido por la proteína de unión a antígeno. El término "epítipo" significa los aminoácidos de una molécula diana que se ponen en contacto con una proteína de unión a antígeno, p. ej., un anticuerpo, cuando la proteína de unión a antígeno se une a la molécula diana. Un epítipo puede ser contiguo o no contiguo (p. ej., (i) en un polipéptido monocatenario, resto de aminoácidos que no son contiguos entre sí en la secuencia polipeptídica pero que dentro del contexto de la molécula diana están unidos por la proteína de unión a antígeno, o (ii) en un receptor multimérico que comprende dos o más componentes individuales, p. ej., ST2 y AcP, los restos de aminoácidos están presentes en uno o más de los componentes individuales, pero todavía están unidos por la proteína de unión a antígeno. Los determinantes epitópicos pueden incluir agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o sulfonilo y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Por lo general, las proteínas de unión a antígeno específicas para una molécula diana particular reconocerán preferentemente un epítipo en la molécula diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

Los métodos para caracterizar el epítipo unido por una proteína de unión a antígeno son bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, binning (competencia cruzada) (Miller et al "Epitope binning of murine monoclonal antibodies by a multiplexed pairing assay" J Immunol Methods (2011) 365, 118-25), mapeo de péptidos (por ejemplo, PEPSPOT™) (Albert et al "The B-cell Epitope of the Monoclonal Anti-Factor VIII Antibody ESH8 Characterized by Peptide Array Analysis" 2008 Thromb Haemost 99, 634-7), métodos de mutagénesis tales como quimeras (Song et al "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" J. Virol. (2010) 84, 6935-6942), barrido de alanina (Cunningham and Wells "High-resolution epitope mapping of HGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis" Science (1989) 244, 1081- 1085), barrido de arginina (Lim et al "A diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythropoietin receptor" Biochemistry (2010) 49, 3797-3804), métodos de intercambio de HD (Coates et al "Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, proteólisis en línea, cromatografía líquida y espectrometría de masas "Rapid Commun. Mass Spectrom. (2009) 23 639-647), Métodos de saturación cruzada por RMN (Morgan et al "Precise epitope mapping of malaria parasite inhibitory antibodies by TROSY NMR crosssaturation" Biochemistry (2005) 44, 518-23) y cristalografía (Gerhardt et al "Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody" J. Mol. Biol (2009) 394, 905-21). Los métodos varían en el nivel de detalle que proporcionan en cuanto a los aminoácidos que comprenden el epítipo.

Las proteínas de unión a antígeno incluyen aquellas que tienen un epítipo solapante con una proteína de unión a antígeno a modo de ejemplo descrita en el presente documento, p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 o Ab33. En determinados ejemplos, la proteína de unión a antígeno tiene un epítipo idéntico al de las proteínas de unión a antígeno a modo de ejemplo. En otros ejemplos, la proteína de unión a antígeno se une solo a un subconjunto de los mismos aminoácidos que la proteína de unión a antígeno a modo de ejemplo.

En determinados ejemplos, la proteína de unión al antígeno ST2 tiene un epítipo idéntico o solapante como Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 o Ab33 y comprende a) un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad o es idéntico a la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ

ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO: 164 o SEQ ID NO: 165; b) un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad o es idéntico a la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 147; o c) el dominio variable de cadena ligera de a) y el dominio variable de cadena pesada de b).

[illegible]

En determinados ejemplos, la proteína de unión al antígeno ST2 tiene un epítipo idéntico o solapante como Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 o Ab33 y comprende a) un dominio variable de cadena ligera que no tiene más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO: 164 o SEQ ID NO: 165; b) un dominio variable de cadena pesada que no tiene más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 147; o c) el dominio variable de cadena ligera de a) y el dominio variable de cadena pesada de b).

En determinados ejemplos, la proteína de unión al antígeno ST2 tiene un epítipo idéntico o solapante como Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 o Ab33 y comprende un dominio variable de cadena ligera que no tiene más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la

[illegible]

En determinados ejemplos, la proteína de unión al antígeno ST2 tiene un epítipo idéntico o solapante como Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 o Ab33 y comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende a) una LCD R1 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia L C D R1 establecida en el SEQ ID NO: 106; una L C D R2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia L C D R2 establecida en el SEQ ID NO: 117; y una L C D R3 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia L C D R3 establecida en el SEQ ID NO: 128; b) una L C D R1 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia L C D R1 establecida en el SEQ ID NO: 107; una L C D R2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia L C D R2 establecida en el SEQ ID NO: 118; y una L C D R3 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia L C D R3 establecida en el SEQ ID NO: 129; c) una L C D R1 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia L C D R1 establecida en el SEQ ID NO: 108; una L C D R2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia L C D R2 establecida en el SEQ ID NO: 119; y una L C D R3

[illegible]

que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR1 establecida en el SEQ ID NO: 45; una HCDR2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR2 establecida en el SEQ ID NO: 56; y una HCDR3 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR3 establecida en el SEQ ID NO: 67; u) una HCDR1 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR1 establecida en el SEQ ID NO: 46; una HCDR2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR2 establecida en el SEQ ID NO: 57; y una HCDR3 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR3 establecida en el SEQ ID NO: 68; v) una HCDR1 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR1 establecida en el SEQ ID NO: 47; una HCDR2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR2 establecida en el SEQ ID NO: 58; y una HCDR3 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR3 establecida en el SEQ ID NO: 69; w) una HCDR1 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR1 establecida en el SEQ ID NO: 48; una HCDR2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR2 establecida en el SEQ ID NO: 59; y una HCDR3 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR3 establecida en el SEQ ID NO: 70; x) una HCDR1 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR1 establecida en el SEQ ID NO: 49; una HCDR2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR2 establecida en el SEQ ID NO: 60; y una HCDR3 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR3 establecida en el SEQ ID NO: 71; y) una HCDR1 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR1 establecida en el SEQ ID NO: 50; una HCDR2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR2 establecida en el SEQ ID NO: 61; y una HCDR3 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR3 establecida en el SEQ ID NO: 72; z) una HCDR1 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR1 establecida en el SEQ ID NO: 148; una HCDR2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR2 establecida en el SEQ ID NO: 151; y una HCDR3 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR3 establecida en el SEQ ID NO: 154; aa) una HCDR1 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR1 establecida en el SEQ ID NO: 149; una HCDR2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR2 establecida en el SEQ ID NO: 152; y una HCDR3 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR3 establecida en el SEQ ID NO: 155; o bb) una HCDR1 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR1 establecida en el SEQ ID NO: 150; una HCDR2 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR2 establecida en el SEQ ID NO: 153; y una HCDR3 que no tiene más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR3 establecida en el SEQ ID NO: 156.

Las proteínas de unión al antígeno ST2 preferidas descritas inmediatamente arriba incluyen aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de a) y el dominio variable de cadena pesada de o); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de b) y el dominio variable de cadena pesada de p); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de c) y el dominio variable de cadena pesada de q); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de d) y el dominio variable de cadena pesada de r); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de e) y el dominio variable de cadena pesada de s); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de f) y el dominio variable de cadena pesada de t); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de g) y el dominio variable de cadena pesada de u); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de h) y el dominio variable de cadena pesada de v); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de i) y el dominio variable de cadena pesada de w); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de j) y el dominio variable de cadena pesada de x); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de k) y el dominio variable de cadena pesada de y); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de l) y el dominio variable de cadena pesada de z); aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de m) y el dominio variable de cadena pesada de aa); y aquellas que comprenden el dominio variable de cadena ligera de n) y el dominio variable de cadena pesada de bb).

Las proteínas de unión a antígeno que tienen un epítipo idéntico o un epítipo solapante con frecuencia competirán de forma cruzada por la unión al antígeno. Por lo tanto, en determinados ejemplos, una proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento compite de forma cruzada con Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 o Ab33. Por "Competencia cruzada" o "competencia cruzada" se entiende que las proteínas de unión a antígeno compiten por el mismo epítipo o sitio de unión en una diana. Dicha competencia se puede determinar mediante un ensayo en el que la proteína de unión a antígeno de referencia (por ejemplo, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo) evita o inhibe la unión específica de una proteína de unión a antígeno de prueba y viceversa. Se pueden utilizar numerosos tipos de ensayos de unión competitiva para determinar si una molécula de prueba compite con una molécula de referencia por la unión. Ejemplos de ensayos que pueden emplearse incluyen radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competencia en sándwich (véase, p. ej., Stahli et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253), EIA con biotina-avidina directo en fase sólida (véase, p. ej., Kirkland

et al., (1986) J. Immunol. 137:3614-3619) ensayo marcado directamente en fase sólida, ensayo en sándwich marcado directamente en fase sólida, Luminex (Jia et al "A novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies" J. Immunological Methods (2004) 288, 91-98) y resonancia de plasmón superficial ((Song et al "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" J. Virol. (2010) 84, 6935-6942). En el Ejemplo 5 se describe un método a modo de ejemplo para determinar la competencia cruzada. Normalmente, cuando una proteína de unión a antígeno competitiva está presente en exceso, inhibirá la unión específica de una proteína de unión a antígeno de referencia a un antígeno común en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %. En algunos casos, la unión se inhibe en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, el 99 % o más.

Ab2 se une a ST2 humano y de cyo con alta afinidad y bloquea la unión de IL-33 a ST2, bloqueando así la señalización de ST2 mediada por IL-33. Anticuerpos con epítomos idénticos a, similares o solapantes con Ab2 pueden compartir estas características excepcionales. En ejemplos preferidos, una proteína de unión al antígeno ST2 compite de forma cruzada con Ab2 para unirse a ST2. Las proteínas de unión al antígeno ST2 a modo de ejemplo que compiten de forma cruzada con Ab2 incluyen Ab1, Ab3, Ab5, Ab7, Ab8 y Ab30 (véase el Ejemplo 5). Si se intenta encontrar anticuerpos que se unen a un epíteto solapante, similar o idéntico al de Ab2, se puede explorar uno o más anticuerpos para determinar la competencia cruzada con Ab2. Asimismo, al hacer variantes de un anticuerpo que reacciona de forma cruzada con Ab2, se pueden explorar tales anticuerpos para determinar si la competencia cruzada se mantiene después de la variación, sugiriendo que el epítipo de la variante no se altera significativamente de la molécula precursora. Por lo tanto, en determinados ejemplos, la solicitud describe variantes de anticuerpos que compiten de forma cruzada con Ab2 para unirse a ST2.

Además de competir entre sí, anticuerpos con epítomos solapantes, similares o idénticos pueden verse afectados por mutagénesis de ST2 de manera similar. Determinadas mutaciones pueden inhibir la unión de un anticuerpo; otras pueden potenciar o activar la unión. En el Ejemplo 11, se realizó una mutagénesis por barrido de arginina/alanina en una porción del dominio extracelular de ST2 y se determinó el efecto sobre los anticuerpos a modo de ejemplo. Se incluyen, con la presente divulgación, proteínas de unión a ST2 que tienen características tales que se ven afectadas de una manera similar a un anticuerpo a modo de ejemplo de la mutagénesis.

En determinados ejemplos, la unión de una proteína de unión al antígeno ST2 está inhibida por una mutación única en ST2, en donde la mutación única se selecciona del grupo que consiste en L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R e V176R. En ejemplos preferidos, cualquiera de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más nueve o más, diez o más, o todas las mutaciones únicas del grupo inhiben individualmente la unión de la proteína de unión a ST2. En otros ejemplos, la unión de una proteína de unión al antígeno ST2 se activa mediante una mutación única en ST2, en donde la mutación única se selecciona del grupo que consiste en L53R, R72A e S73R. En ejemplos preferidos, todas las mutaciones únicas del grupo activan individualmente la unión de la proteína de unión a ST2. En ejemplos preferidos, la proteína de unión al antígeno ST2 comparte los atributos de Ab2 y se inhiben por cualquiera de L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R y V176R y se activan por cualquiera de L53R, R72A, S73R.

Otro método para caracterizar un anticuerpo basándose en su epítipo es el intercambio amida de hidrógeno/deuterio (HDX). HDX se ha utilizado ampliamente para estudiar la conformación y dinámica de proteínas, interacciones proteína-ligando e interacciones proteína-proteína (Zhang y Smith 1993, Engen y Smith 2001). La detección por espectrometría de masas proporciona una herramienta poderosa para determinar el alcance del intercambio, porque el reemplazo de un solo hidrógeno por deuterio da como resultado un aumento de masa de 1 Da por cada intercambio. El alcance de HDX se puede medir fácilmente a nivel de péptidos mediante el análisis del producto de la digestión proteolítica de proteínas mediante cromatografía de líquidos junto con espectrometría de masas en tándem en condiciones controladas (Engen y Smith 2001, Baerga-Ortiz, Hughes et al. 2002, Codreanu, Ladner et al. 2002, Hamuro, Coales et al. 2006, Coales, Tuske et al. 2009, Zhang, Zhang et al. 2012).

La comparación de los perfiles de antígeno HDX entre los productos de digestión proteolíticos de ST2 con la ausencia y la presencia de un anticuerpo (estado libre frente a unido) puede revelar los sitios de interacción. Específicamente, cuando el anticuerpo se une a ST2, los hidrógenos de amida accesibles a disolventes en ST2 libre pueden protegerse y, como resultado, se observan tasas de cambio más lentas. Por lo tanto, las regiones que ganaron menos deuterio en presencia del anticuerpo que en su ausencia son epítomos de unión potenciales. Otros factores, incluyendo la tasa de cambio en el estado libre, conocimiento de la estructura de la proteína del antígeno, así como los resultados de otros esfuerzos de mapeo de epítomos, se consideran cuando se determinan los epítomos.

La unión de Ab2 a ST2 se analizó mediante HDX como se describe en el Ejemplo 12. El análisis demostró que Ab2 se une a/altera la tasa de intercambio de la porción de la estructura de ST2 que comprende los aminoácidos 33-44 y 88-94 de los aminoácidos 19-322 del SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 15-26 y 70-76 de ST2 maduro, respectivamente). Anticuerpos con epítomos solapantes, epítomos similares o idénticos a Ab2 también se unirán a/alterarán la tasa de intercambio de aminoácidos dentro de 33-44 y 88-94 del SEQ ID NO: 1. En determinados ejemplos, una proteína de unión a ST2, p. ej., anticuerpo, protege cualquiera de los aminoácidos 33-44 del SEQ ID NO: 1 cuando se une a ST2 y se analiza por HDX. En otros ejemplos, cualquiera de los aminoácidos 88-94 está protegido. Ambos indican

solapamiento parcial de epítomos de unión con Ab2. En ejemplos preferidos, tanto cualquiera de 33-44 como cualquiera de 88-94 están protegidos. En determinados ejemplos, una proteína de unión a ST2, p. ej., anticuerpo, protege todos los aminoácidos 33-44 del SEQ ID NO: 1 cuando se une a ST2 y se analiza por HDX. En otros ejemplos, todos los aminoácidos 88-94 están protegidos. Ambos indican un epítomo de unión similar con Ab2. En ejemplos preferidos, tanto la totalidad de 33-44 como la totalidad de 88-94 están protegidos, indicando un epítomo idéntico o casi idéntico al de Ab2.

La unión de Ab2 a ST2 se analizó adicionalmente usando cristalografía de rayos X. La cristalografía de rayos X fue consistente con el análisis HDX. La interfaz entre el Ab y el antígeno se puede determinar/definir de varias formas. En el Ejemplo 13, la interfaz se determinó utilizando el diferencial de exposición al disolvente y por distancia. Los restos de ST2 que están dentro de la interfaz con Ab2 como se determina por las diferencias de exposición al disolvente o la distancia de menos de 5Å son (correspondientes a la posición en ST2 maduro (que carece de secuencia líder)) K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 e Y81. En determinados ejemplos, la proteína de unión de ST2 forma una interfaz con ST2 que se solapa con la de Ab2, incluyendo aquellos en los que cualquiera de K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 o Y81 están dentro de la interfaz. En algunos ejemplos, la proteína de unión a ST2 forma una interfaz con ST2 en donde P19, R20, Q21, G22, K23 y/o Y26 están dentro de la interfaz. En otros ejemplos, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 y/o Y81 están dentro de la interfaz. En ejemplos preferidos, K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 e Y81 están dentro de la interfaz.

La estructura cristalina indicó que determinados restos de aminoácidos formaron enlaces de hidrógeno o puentes de sal con aminoácidos con Ab2. Esos restos incluyen K1, R20, K23, Y26, T75, N77, R78 e T79. En determinados ejemplos, una proteína de unión al antígeno ST2 forma enlaces de hidrógeno o un puente de sal con uno o más de K1, R20, K23, Y26, T75, N77, R78 e T79.

La estructura cristalina proporciona además información sobre qué restos de Ab2 forman la interfaz con ST2. La FIG. 10 indica los restos en la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada que forman una interfaz con ST2. También se indican Los restos que forman enlaces de hidrógeno o puentes de sal con aminoácidos en ST2. Se puede utilizar esta información para diseñar variantes de Ab2, incluyendo aquellas que contienen dominios variables que tienen un 90 % de identidad, 95 % de identidad y 10 inserciones, eliminaciones y/o sustituciones o menos dentro del dominio variable de cadena ligera o cadena pesada de Ab2. Se puede desear mantener los aminoácidos dentro de la interfaz mientras se alteran los restos que no son de interfaz. Por lo tanto, se pueden diseñar y crear variantes de Ab2 con una o más adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos dentro de una o más CDR de Ab2 que mantienen la unión a ST2.

En algunos ejemplos, una proteína de unión a ST2 comprende una variante de la región variable de cadena ligera de Ab2 (SEQ ID NO: 96) en donde D28, I29, S30, N31, Y32, Y49, D50, N53, E55, T56, D91, D92, N93, F94 y/o L96 permanecen sin cambios o comprenden una sustitución conservativa de los mismos y/o una variante de la región variable de cadena pesada de Ab2 (SEQ ID NO: 30) en donde W33, I50, D57, R59, H99, G100, T101, S102, S103, D104, Y105 y/o Y106 permanecen sin cambios o comprenden una mutación conservativa. En ejemplos preferidos, D28, N31, D50, N53, E55, D91 y D92 de la región variable de cadena ligera permanecen sin cambios y S102, S103, D104 e Y105 de la cadena pesada permanecen sin cambios.

Polinucleótidos que Codifican Proteínas de Unión al Antígeno ST2

Dentro de la invención se abarcan los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de unión al antígeno ST2 de acuerdo con las reivindicaciones. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento incluyen aquellos que codifican las cadenas ligeras y pesadas a modo de ejemplo descritas en el presente documento.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab1 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 73.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab2 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 74.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab3 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 75.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab4 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 76.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab5 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 77.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab6 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 78.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab7 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 79.

- 5 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab8 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 80.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab9 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 81.

- 10 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab10 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 82.

- 15 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab11 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 83.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab30 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 157.

- 20 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab32 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 158.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la LC de Ab33 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 159.

- 25 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab1 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 7.

- 30 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab2 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 8.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab3 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 9.

- 35 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab4 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 10.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab5 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 11.

- 40 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab6 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 12.

- 45 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab7 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 13.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab8 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 14.

- 50 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab9 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 15.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab10 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 16.

- 55 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab11 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 17.

- 60 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab30 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 139.

Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab32 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 140.

- 65 Un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la HC de Ab33 es un ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en el SEQ ID NO: 141.

Los aspectos de la invención incluyen variantes de polinucleótidos (por ejemplo, debido a degeneración) que codifican las secuencias de aminoácidos de acuerdo con las reivindicaciones.

5 La presente divulgación incluye varios ejemplos que incluyen, pero sin limitación, los siguientes.

Un polinucleótido aislado, en donde dicho polinucleótido codifica uno o más polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

10 A.

1. una secuencia de dominio variable de cadena ligera que es al menos un 90 % idéntica a una secuencia de dominio variable de cadena ligera establecida en las SEQ ID NO: 95-105, 163-165;
- 15 2. una secuencia de dominio variable de cadena pesada que es al menos un 90 % idéntica a una secuencia de dominio variable de cadena pesada establecida en las SEQ ID NO: 29-39, 145-147;
3. un dominio variable de cadena ligera de (1) y un dominio variable de cadena pesada de (2); y

20 B. un dominio variable de cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2, CDR3 y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2, CDR3 que son iguales o difieren en no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos, en cada CDR de las siguientes secuencias:

1. una CDR1 (SEQ ID NO: 106), CDR2 (SEQ ID NO:117), CDR3 (SEQ ID NO: 128) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 40), CDR2 (SEQ ID NO:51), CDR3 (SEQ ID NO: 62) de cadena pesada de Ab1;
- 25 2. una CDR1 (SEQ ID NO: 107), CDR2 (SEQ ID NO:118), CDR3 (SEQ ID NO: 129) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 41), CDR2 (SEQ ID NO:52), CDR3 (SEQ ID NO: 63) de cadena pesada de Ab2;
3. una CDR1 (SEQ ID NO: 108), CDR2 (SEQ ID NO:119), CDR3 (SEQ ID NO: 130) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 42), CDR2 (SEQ ID NO:53), CDR3 (SEQ ID NO: 64) de cadena pesada de Ab3;
4. una CDR1 (SEQ ID NO: 109), CDR2 (SEQ ID NO:120), CDR3 (SEQ ID NO: 131) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 43), CDR2 (SEQ ID NO:54), CDR3 (SEQ ID NO: 65) de cadena pesada de Ab4;
- 30 5. una CDR1 (SEQ ID NO: 110), CDR2 (SEQ ID NO:121), CDR3 (SEQ ID NO: 132) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 44), CDR2 (SEQ ID NO:55), CDR3 (SEQ ID NO: 66) de cadena pesada de Ab5;
6. una CDR1 (SEQ ID NO: 111), CDR2 (SEQ ID NO:122), CDR3 (SEQ ID NO: 133) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 45), CDR2 (SEQ ID NO:56), CDR3 (SEQ ID NO: 67) de cadena pesada de Ab6;
7. una CDR1 (SEQ ID NO: 112), CDR2 (SEQ ID NO:123), CDR3 (SEQ ID NO: 134) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 46), CDR2 (SEQ ID NO:57), CDR3 (SEQ ID NO: 68) de cadena pesada de Ab7;
- 35 8. una CDR1 (SEQ ID NO: 113), CDR2 (SEQ ID NO:124), CDR3 (SEQ ID NO: 135) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 47), CDR2 (SEQ ID NO:58), CDR3 (SEQ ID NO: 69) de cadena pesada de Ab8;
9. una CDR1 (SEQ ID NO: 114), CDR2 (SEQ ID NO:125), CDR3 (SEQ ID NO: 136) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 48), CDR2 (SEQ ID NO:59), CDR3 (SEQ ID NO: 70) de cadena pesada de Ab9;
- 40 10. una CDR1 (SEQ ID NO: 115), CDR2 (SEQ ID NO:126), CDR3 (SEQ ID NO: 137) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 49), CDR2 (SEQ ID NO:60), CDR3 (SEQ ID NO: 71) de cadena pesada de Ab10;
11. una CDR1 (SEQ ID NO: 116), CDR2 (SEQ ID NO:127), CDR3 (SEQ ID NO: 138) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 50), CDR2 (SEQ ID NO:61), CDR3 (SEQ ID NO: 72) de cadena pesada de Ab11;
- 45 12. una CDR1 (SEQ ID NO: 166), CDR2 (SEQ ID NO:169), CDR3 (SEQ ID NO: 172) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 148), CDR2 (SEQ ID NO:151), CDR3 (SEQ ID NO: 154) de cadena pesada de Ab30;
13. una CDR1 (SEQ ID NO: 167), CDR2 (SEQ ID NO:170), CDR3 (SEQ ID NO: 173) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 149), CDR2 (SEQ ID NO:152), CDR3 (SEQ ID NO: 155) de cadena pesada de Ab32; y
- 50 14. una CDR1 (SEQ ID NO: 168), CDR2 (SEQ ID NO:171), CDR3 (SEQ ID NO: 174) de cadena ligera o una CDR1 (SEQ ID NO: 150), CDR2 (SEQ ID NO:153), CDR3 (SEQ ID NO: 156) de cadena pesada de Ab33.

En ejemplos preferidos, el polipéptido codificado por el ácido nucleico aislado es un componente de una proteína de unión a antígeno que se une a ST2.

55 Se pueden obtener secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, para usarse como sondas o cebadores para el aislamiento de ácidos nucleicos o como secuencias de consulta para búsquedas en bases de datos, mediante "traducción inversa" a partir de las secuencias de aminoácidos, o mediante la identificación de regiones de identidad de aminoácidos con polipéptidos para los que se ha identificado la secuencia de ADN codificante. El procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) bien conocido se puede emplear para aislar y amplificar una secuencia de ADN que codifica proteínas de unión al antígeno ST2 o una combinación deseada de fragmentos polipeptídicos de proteínas de unión al antígeno ST2. Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados de la combinación de fragmentos de ADN se emplean como cebadores 5' y 3'. Los oligonucleótidos pueden contener adicionalmente sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, para facilitar la inserción de la combinación amplificada de fragmentos de ADN en un vector de expresión. Las técnicas de PCR se describen en Saiki et al., Science 239:487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), págs. 189-196; y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen ADN y ARN tanto en forma monocatenaria como bicatenaria, así como las correspondientes secuencias complementarias. El ADN incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN sintetizado químicamente, ADN amplificado por PCR y combinaciones de los mismos. Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen genes de longitud completa o moléculas de ADNc, así como una combinación de fragmentos de los mismos. Los ácidos nucleicos de la invención proceden preferentemente de fuentes humanas, pero la invención incluye los procedentes de especies no humanas, también.

Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico que se ha separado de secuencias genéticas adyacentes presentes en el genoma del organismo del cual se aisló el ácido nucleico, en el caso de ácidos nucleicos aislados de fuentes de origen natural. En el caso de ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente a partir de una plantilla o químicamente, tal como los productos de PCR, moléculas de ADNc u oligonucleótidos, por ejemplo, se entiende que los ácidos nucleicos resultantes de tales procesos son ácidos nucleicos aislados. Una molécula de ácido nucleico aislada se refiere a una molécula de ácido nucleico en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ácido nucleico más grande. En una realización preferida, los ácidos nucleicos están sustancialmente libres de material endógeno contaminante. La molécula de ácido nucleico se ha obtenido preferentemente de ADN o ARN aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación y recuperación de las secuencias de nucleótidos que lo componen mediante métodos bioquímicos convencionales (tales como los descritos en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Dichas secuencias se proporcionan y/o construyen preferentemente en forma de un marco de lectura abierto ininterrumpido mediante secuencias internas no traducidas, o intrones, que están generalmente presentes en genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducido pueden estar presentes en 5' o 3' de un marco de lectura abierto, donde los mismos no interfieren con la manipulación o expresión de la región codificante.

También se describen en el presente documento ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones moderadamente rigurosas, y más preferentemente en condiciones muy rigurosas, a ácidos nucleicos que codifican proteínas de unión al antígeno ST2 como se describe en el presente documento. Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y la guía para diseñar condiciones adecuadas se establecen por Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., Capítulos 9 y 11; y *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4) y puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia basándose en, por ejemplo, la longitud y/o composición de bases del ADN. Una forma de lograr condiciones moderadamente rigurosas implica el uso de una solución de prelavado que contenga 5 x SSC, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de aproximadamente un 50 % de formamida, 6 X SSC y una temperatura de hibridación de 55 °C (u otras soluciones de hibridación similares, tal como una que contenga aproximadamente un 50 % de formamida, con una temperatura de hibridación de aproximadamente 42 °C) y condiciones de lavado de aproximadamente 60 °C, en 0,5 x SSC, SDS al 0,1 %. Por lo general, las condiciones muy rigurosas se definen como condiciones de hibridación como se indica anteriormente, pero con lavado a aproximadamente 68 °C, 0,2 x SSC, SDS al 0,1 %. SSPE (1xSSPE es NaCl 0,15 M, NaH₂PO₄ 10 mM y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) se pueden sustituir por SSC (1xSSC es NaCl 0,15 M y citrato de sodio 15 mM) en los tampones de hibridación y lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después de que se completa la hibridación. Debe entenderse que la temperatura de lavado y la concentración de sal de lavado se pueden ajustar según sea necesario para lograr un grado deseado de rigurosidad aplicando los principios básicos que gobiernan las reacciones de hibridación y la estabilidad de la doble hélice, como es conocido por los expertos en la materia y se describe más adelante (véase, p. ej., Sambrook et al., 1989). Al hibridar un ácido nucleico con un ácido nucleico diana de secuencia desconocida, se supone que la longitud del híbrido es la del ácido nucleico que se hibrida. Cuando se hibridan ácidos nucleicos de secuencia conocida, la longitud del híbrido se puede determinar alineando las secuencias de los ácidos nucleicos e identificando la región o regiones de complementariedad de secuencia óptima. La temperatura de hibridación para los híbridos que se prevé que tiene menos de 50 pares de bases de longitud debe ser de 5 a 10 °C menos que la temperatura de fusión (T_f) del híbrido, en donde la T_f se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, T_f (grados C) = 2(número de bases A+T) + 4(número de bases G+C). Para híbridos de más de 18 pares de bases de longitud, T_m (grados C) = 81,5 + 16,6 (log₁₀ [Na⁺]) + 0,41 (% G + C) - (600/N), en donde N es el número de bases en el híbrido y [Na⁺] es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ([Na⁺] para 1xSSC = 0,165 M). Preferentemente, cada uno de estos ácidos nucleicos que hibridan tiene una longitud de al menos 15 nucleótidos (o más preferentemente al menos 18 nucleótidos, o al menos 20 nucleótidos, o al menos 25 nucleótidos, o al menos 30 nucleótidos, o al menos 40 nucleótidos, o más preferentemente al menos 50 nucleótidos), o al menos el 25 % (más preferentemente al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, y más preferentemente al menos el 80 %) de la longitud del ácido nucleico de la presente invención. al que se hibrida, y tiene al menos el 60 % de identidad de secuencia (más preferentemente al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 %, y lo más preferentemente al menos el 99,5 %) con el ácido nucleico de la presente invención con el que se hibrida, donde la identidad de secuencia se determina comparando las secuencias de los ácidos nucleicos que hibridan cuando se alinean para maximizar el solapamiento y la identidad mientras se minimizan los huecos de secuencia como se describe con más detalle anteriormente.

Las variantes de acuerdo con la invención se preparan habitualmente mediante mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína de unión a antígeno, utilizando mutagénesis en casete o PCR u otras técnicas bien conocidas en la técnica, para producir ADN que codifica la variante, y a continuación expresar el ADN recombinante en cultivo celular como se describe en el presente documento. Sin embargo, los fragmentos de proteínas de unión a antígeno que comprenden CDR variantes que tienen hasta aproximadamente 100-150 restos se pueden preparar mediante síntesis *in vitro* utilizando técnicas establecidas. Las variantes muestran generalmente la misma actividad biológica cualitativa que el análogo de origen natural, p. ej., unión a ST2, aunque también se pueden seleccionar variantes que tengan características modificadas, como se describirá con más detalle a continuación.

Como observarán los expertos en la materia, debido a la degeneración del código genético, se puede producir una cantidad extremadamente grande de ácidos nucleicos, todos los cuales codifican las CDR (y cadenas pesadas y ligeras u otros componentes de la proteína de unión a antígeno) descritas en el presente documento. Por lo tanto, habiendo identificado una secuencia de aminoácidos particular, los expertos en la materia podrían producir cualquier número de ácidos nucleicos diferentes, simplemente modificando la secuencia de uno o más codones de una manera que no cambie la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

La presente invención también proporciona sistemas de expresión y construcciones en forma de plásmidos, vectores de expresión, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido de acuerdo con las reivindicaciones. Además, la invención proporciona células hospedadoras que comprenden dichos sistemas de expresión o construcciones.

Generalmente, los vectores de expresión usados en cualquiera de las células hospedadoras contendrán secuencias para el mantenimiento del plásmido y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Tales secuencias, denominadas colectivamente "secuencias flanqueantes" generalmente incluirán en determinadas realizaciones una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia de intrones completa que contiene un sitio de corte y empalme donante y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción de polipéptidos, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de polienlazador para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar, y un elemento marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se analiza a continuación.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia codificante de "etiqueta", es decir, una molécula oligonucleotídica ubicada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante de la proteína de unión al antígeno ST2; la secuencia oligonucleotídica codifica poliHis (tal como hexaHis) u otra "etiqueta" tal como FLAG, HA (hemaglutinina del virus de la gripe), o *myc*, para los que existen anticuerpos disponibles comercialmente. Esta etiqueta se fusiona normalmente con el polipéptido tras la expresión del polipéptido y puede servir como un medio para la purificación por afinidad o detección de la proteína de unión al antígeno ST2 de la célula hospedadora. Se puede lograr la purificación por afinidad, por ejemplo, mediante cromatografía en columna utilizando anticuerpos contra la etiqueta como matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta se puede eliminar posteriormente de la proteína de unión al antígeno ST2 purificada por diversos medios, tales como el uso de determinadas peptidasas para la escisión.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heterólogas (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula hospedadora), híbridas (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintéticas o naturales. Como tal, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional en, y pueda ser activada por, la maquinaria de la célula hospedadora.

Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta invención se pueden obtener mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica. Generalmente, las secuencias flanqueantes útiles en el presente documento se habrán identificado previamente mediante mapeo y/o mediante digestión con endonucleasas de restricción y, por tanto, pueden aislarse de la fuente de tejido adecuada utilizando las endonucleasas de restricción adecuadas. En algunos casos, puede conocerse la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante. En este punto, la secuencia flanqueante se puede sintetizar usando los métodos descritos en el presente documento para la síntesis o clonación de ácidos nucleicos.

Si se conoce la totalidad o solamente una parte de la secuencia flanqueante, se puede obtener usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o explorando una biblioteca genómica con una sonda adecuada tal como un oligonucleótido y/o un fragmento de secuencia flanqueante de la misma u otra especie. Cuando no se conoce la secuencia flanqueante, un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante puede aislarse de un fragmento más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento se puede lograr mediante digestión con endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN adecuado seguido de aislamiento mediante purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna de Qiagen® (Chatsworth, CA) u otros métodos conocidos por el experto en la materia. La selección de enzimas adecuadas para lograr este propósito resultará fácilmente evidente para un experto en la materia.

Un origen de replicación es generalmente parte de esos vectores de expresión procariotas adquiridos comercialmente, y el origen ayuda en la amplificación del vector en una célula hospedadora. Si el vector de elección no contiene un origen de sitio de replicación, uno puede sintetizarse químicamente basándose en una secuencia conocida y unirse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas y diversos orígenes víricos (p. ej., SV40, poliovirus, adenovirus, virus del estomatito vesicular (VSV) o papilomavirus tales como HPV o BPV) son útiles para clonar células hospedadoras procariotas; (b) complementan las deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos o definidos. Los marcadores seleccionables específicos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. De manera ventajosa, también se puede usar un gen de resistencia a neomicina para la selección en células hospedadoras tanto procariotas como eucariotas.

Una secuencia de terminación de la transcripción se ubica generalmente 3' en el extremo de una región codificante polipeptídica y sirve para terminar la transcripción. Normalmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico en GC seguido de una secuencia poli-T. Si bien la secuencia se clona fácilmente a partir de una biblioteca o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, también se puede sintetizar fácilmente usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos como los descritos en el presente documento.

El gen marcador seleccionable codifica una proteína que es necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula hospedadora cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células hospedadoras procariotas; (b) complementan las deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos o definidos. Los marcadores seleccionables específicos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. De manera ventajosa, también se puede usar un gen de resistencia a neomicina para la selección en células hospedadoras tanto procariotas como eucariotas.

Pueden usarse otros genes seleccionables para amplificar el gen que se va a expresar. La amplificación es el proceso en el que los genes que se requieren para la producción de una proteína crítica para el crecimiento o la supervivencia celular se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y genes de timidina cinasa sin promotor. Los transformantes de células de mamífero se colocan en presión de selección en donde solamente los transformantes están adaptados de forma única para sobrevivir en virtud del gen seleccionable presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas en condiciones en las que la concentración de agente de selección en el medio se incrementa sucesivamente, conduciendo, de este modo, a la amplificación tanto del gen seleccionable como del ADN que codifica otro gen, tal como un anticuerpo de proteína de unión a antígeno que se une al polipéptido ST2. Como resultado, a partir del ADN amplificado se sintetizan cantidades aumentadas de un polipéptido, tal como una proteína de unión al antígeno ST2.

Un sitio de unión al ribosoma suele ser necesario para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento se ubica generalmente en 3' del promotor y en 5' de la secuencia codificante del polipéptido que se va a expresar. En determinadas realizaciones, una o más regiones codificantes pueden estar unidas operativamente a un sitio interno de unión al ribosoma (IRES), permitiendo la traducción de dos marcos de lectura abiertos a partir de un solo transcrito de ARN.

En algunos casos, como cuando se desea la glicosilación en un sistema de expresión de células hospedadoras eucariotas, se pueden manipular las diversas pre o prosecuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de la peptidasa de un péptido señal particular, o añadir prosecuencias, que también pueden afectar la glicosilación. El producto proteico final puede tener, en la posición -1 (en relación con el primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales incidentes a la expresión, que puede que no se hayan eliminado por completo. Por ejemplo, el producto proteico final puede tener uno o dos restos de aminoácidos que se encuentran en el sitio de escisión de la peptidasa, unidos al extremo amino. De manera alternativa, el uso de algunos sitios de escisión enzimática puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima corta en dicha área dentro del polipéptido maduro.

Los vectores de expresión y clonación de la invención contendrán generalmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y unido operativamente a la molécula que codifica la proteína de unión al antígeno ST2. Los promotores son secuencias no transcritas ubicadas cadena arriba (es decir, 5') del codón de inicio de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controla la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician mayores niveles de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tal como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura. Los promotores constitutivos, por otro lado, transcriben uniformemente el gen al que están unidos operativamente, es decir, con poco o ningún control sobre la expresión génica. Un gran número de promotores, reconocidos por varios posibles células hospedadoras, son bien conocidos. Un promotor adecuado se une operativamente al ADN que codifica la cadena pesada o la cadena ligera que comprende una proteína de unión al

antígeno ST2 de la invención eliminando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora deseada en el vector.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores de levadura también son bien conocidos en la técnica. Los potenciadores de levadura se utilizan ventajosamente con promotores de levadura. Los promotores adecuados para su uso con células hospedadoras de mamíferos son bien conocidos e incluyen, pero sin limitación, aquellos obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferentemente virus simio 40 (SV40, por sus siglas en inglés). Otros promotores de mamíferos adecuados incluyen promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de actina.

Los promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, pero sin limitación: promotor temprano de SV40 (Benoist y Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); promotor de CMV (Thomsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); promotor de timidina cinasa del herpes (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); secuencias promotoras y reguladoras del gen de la metalotionina (Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); y promotores procariotas tal como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); o el promotor tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). También son de interés las siguientes regiones de control de la transcripción animal, que presentan especificidad tisular y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen elastasa I que está activa en las células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de la insulina que está activa en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); la región de control del gen de inmunoglobulinas que está activa en las células linfoides (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); la región de control del virus del tumor mamario de ratón que está activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); la región de control del gen de la albúmina que está activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, *Genes y Devel.* 1:268-276); la región de control del gen de la alfa-feto-proteína que está activa en el hígado (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); la región de control del gen de la alfa 1-antitripsina que está activa en el hígado (Kelsey et al., 1987, *Genes y Devel.* 1:161-171); la región de control del gen de la beta-globina que está activa en las células mieloides (Mogam et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); la región de control del gen de la proteína básica de mielina que está activa en las oligodendrocitos en el cerebro (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); la región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina que está activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que está activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Puede insertarse una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción del ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada que comprende una proteína de unión al antígeno ST2 de la invención por eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, generalmente alrededor de 10-300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor para incrementar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición, habiéndose encontrado en las posiciones tanto 5' como 3' de la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamíferos (p. ej., globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina). Generalmente, sin embargo, se utiliza un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio y los potenciadores de adenovirus conocidos en la técnica son elementos potenciadores a modo de ejemplo para la activación de promotores eucariotas. Mientras que un potenciador puede colocarse en el vector en 5' o 3' con respecto a una secuencia codificante, generalmente se localiza en un sitio 5' del promotor. Una secuencia que codifica una secuencia señal natural o heteróloga apropiada (secuencia líder o péptido señal) puede incorporarse en un vector de expresión, para promover la secreción extracelular del anticuerpo. La elección del péptido señal o líder depende del tipo de células hospedadoras en las que se va a producir el anticuerpo, y una secuencia señal heteróloga puede reemplazar la secuencia señal natural. Ejemplos de péptidos señal que son funcionales en células hospedadoras de mamíferos incluyen los siguientes: la secuencia señal para la interleucina-7 (IL-7) descrita en la Patente de Estados Unidos N.º 4.965.195; la secuencia señal para el receptor de interleucina-2 descrita en Cosman et al., 1984, *Nature* 312:768; el péptido señal del receptor de interleucina-4 descrito en la patente EP N.º 0367 566; el péptido señal del receptor de interleucina-1 de tipo I descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 4.968.607; el péptido señal del receptor de interleucina-1 de tipo II descrito en la patente EP N.º 0 460 846.

El vector puede contener uno o más elementos que faciliten la expresión cuando el vector se integra en el genoma de la célula hospedadora. Los ejemplos incluyen un elemento EASE (Aldrich et al. 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) y una región de unión a matriz (MAR, por sus siglas en inglés). Las MAR median la organización estructural de la cromatina y pueden aislar el vector integrado del efecto de "posición". Por lo tanto, las MAR son particularmente útiles cuando el vector se usa para crear transfectantes estables. Se conocen en la técnica varios ácidos nucleicos que contienen MAR naturales y sintéticos, p. ej., las Patentes de Estados Unidos N.º 6.239.328; 7.326.567; 6.177.612; 6.388.066; 6.245.974; 7.259.010; 6.037.525; 7.422.874; 7.129.062.

Los vectores de expresión de la invención se pueden construir a partir de un vector de partida tal como un vector

disponible comercialmente. Dichos vectores pueden contener o no todas las secuencias flanqueantes deseadas. Cuando una o más de las secuencias flanqueantes descritas en el presente documento no estén ya presentes en el vector, pueden obtenerse individualmente y unirse al vector. Los métodos utilizados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes son bien conocidos por los expertos en la materia.

Una vez que se ha construido el vector y se ha insertado en el sitio adecuado del vector una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera, una cadena pesada, o una cadena ligera y una cadena pesada que comprende una secuencia de unión al antígeno ST2, el vector completo puede insertarse en una célula hospedadora adecuada para amplificación y/o expresión de polipéptidos. La transformación de un vector de expresión para una proteína de unión al antígeno ST2 en una célula hospedadora seleccionada puede lograrse mediante métodos bien conocidos que incluyen transfección, infección, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano u otras técnicas conocidas. El método seleccionado dependerá en parte del tipo de célula hospedadora a utilizar. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos por el experto en la materia y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001, *supra*.

Una célula hospedadora, cuando se cultiva en condiciones adecuadas, sintetiza una proteína de unión al antígeno ST2 que posteriormente se puede recoger del medio de cultivo (si la célula hospedadora la secreta al medio) o directamente de la célula hospedadora que la produce (si no se secreta). La selección de una célula hospedadora adecuada dependerá de varios factores, tal como los niveles de expresión deseados, modificaciones de polipéptidos que son deseables o necesarias para la actividad (tales como glicosilación o fosforilación) y la facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa. Una célula hospedadora puede ser eucariota o procariota.

Se conocen bien en la técnica líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores de expresión e incluyen, pero sin limitación, líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés) y se puede usar cualquier línea celular usada en un sistema de expresión conocido en la técnica para preparar los polipéptidos recombinantes de la invención. En general, las células hospedadoras se transforman con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica un polipéptido de anticuerpo anti-ST2 deseado. Entre las células hospedadoras que pueden emplearse se encuentran procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Los procariotas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen células de insecto y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Ejemplos de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, 1981, Cell 23:175), células L, células 293, Células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO) o sus derivados, tales como Veggie CHO y líneas celulares relacionadas que crecen en medios sin suero (Rasmussen *et al.*, 1998, Cytotechnology 28: 31), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10) y la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) como se describe por McMahon *et al.*, 1991, EMBO J. 10: 2821, células renales embrionarias humanas tal como 293, 293 EBNA o MSR 293, células epidérmicas A431 humanas, células Colo205 humanas, otras líneas celulares de primates transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, HL-60, U937, células HaK o Jurkat. Opcionalmente, pueden usarse líneas celulares de mamífero tal como HepG2/3B, KB, NIH 3T3 o S49, por ejemplo, para la expresión del polipéptido cuando es deseable usar el polipéptido en diversos ensayos de transducción de señales o indicadores. De manera alternativa, es posible producir el polipéptido en eucariotas inferiores tal como levaduras o en procariotas tales como bacterias. Las levaduras adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida* o cualquier cepa de levadura capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Las cepas bacterianas adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Si el polipéptido se produce en levaduras o bacterias, puede ser deseable modificar el polipéptido producido en las mismas, por ejemplo, mediante fosforilación o glicosilación de los sitios apropiados, para obtener el polipéptido funcional. Tales uniones covalentes se pueden lograr usando métodos químicos o enzimáticos conocidos. El polipéptido también puede producirse uniendo operativamente el ácido nucleico aislado de la invención a secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insectos y empleando un sistema de expresión de insectos. Los materiales y métodos para los sistemas de expresión baculovirus/células de insecto están disponibles comercialmente en forma de kit en, p. ej., Invitrogen, San Diego, Calif., EE.UU. (el kit MaxBac®), y tales métodos son bien conocidos en la técnica, como se describe en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), y Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). También podrían emplearse sistemas de traducción sin células para producir polipéptidos usando ARN derivados de construcciones de ácido nucleico descritas en el presente documento. Se describen vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con hospedadores bacterianos, fúngicos, de levaduras y de células de mamífero por Pouwels *et al.* (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, Nueva York, 1985). Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado de la invención, preferentemente unido operativamente a al menos una secuencia de control de expresión, es una "célula hospedadora recombinante".

En determinadas realizaciones, las líneas celulares pueden seleccionarse determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y producen constitutivamente proteínas de unión a antígeno con propiedades de unión a ST2. En otra realización, se puede seleccionar una línea celular a partir del linaje de linfocitos B que no produce su propio anticuerpo pero que tiene la capacidad de producir y secretar un anticuerpo heterólogo.

Proteínas de Unión al Antígeno ST2 que Agotan las Células

En ejemplos preferidos, la proteína de unión al antígeno ST2 descrita en el presente documento se une a ST2 e inhibe la unión de IL-33, reduciendo, de este modo, la señalización mediada por IL-33 en células que expresan ST2. En determinados ejemplos, sin embargo, la proteína de unión al antígeno ST2 se une a ST2 y se dirige a una célula que expresa ST2 para su agotamiento. Obviamente, la proteína de unión al antígeno ST2 puede inhibir la unión de IL-33 y dirigirse a las células con ST2 para su agotamiento.

Las proteínas de unión al antígeno ST2 que agotan las células son particularmente útiles para tratar enfermedades asociadas con la sobreexpresión de ST2, p. ej., una enfermedad inflamatoria o un tumor que expresa ST2. Los métodos para dirigir células con proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos, son bien conocidos en la técnica. A continuación, se analizan realizaciones a modo de ejemplo.

Conjugados de Anticuerpo y Fármaco

Las realizaciones de la invención incluyen conjugados anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés). Generalmente, el ADC comprende un anticuerpo conjugado con un agente quimioterapéutico, p. ej., un agente citotóxico, un agente citostático, una toxina o un agente radiactivo. Puede usarse una molécula enlazadora para conjugar el fármaco con el anticuerpo. Una amplia variedad de enlazadores y fármacos útiles en la tecnología de ADC son conocidos en la técnica y se pueden usar en realizaciones de la presente invención. (Véanse los documentos US20090028856; US2009/0274713; US2007/0031402; WO2005/084390; WO2009/099728; US5208020; US5416064; US5475092; 5585499; 6436931; 6372738; y 6340701).

Enlazadores

En determinadas realizaciones, el ADC comprende un enlazador formado por uno o más componentes enlazadores. Ejemplos de componentes enlazadores incluyen 6-maleimidocaproilo, maleimidopropanoilo, valina-citrulina, alanina-fenilalanina, p-aminobenciloxicarbonilo, y los resultantes de la conjugación con reactivos enlazadores, incluyendo, pero sin limitación, 4-(2-piridil)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1 carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC", también denominado en el presente documento también "MCC") y (4-yodoacetil) aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB").

Los enlazadores pueden ser un enlazador "escindible" o un enlazador "no escindible" (Ducry y Stump, Bioconjugate Chem. 2010, 21, 5-13). Los enlazadores escindibles están diseñados para liberar el fármaco cuando se someten a determinados factores ambientales, p. ej., cuando se internaliza en la célula diana. Los enlazadores escindibles incluyen enlazadores lábiles al ácido, enlazadores sensibles a proteasas, enlazadores fotolábiles, enlazador de dimetilo o enlazadores que contienen disulfuro. Los enlazadores no escindibles tienden a permanecer asociados covalentemente con al menos un aminoácido del anticuerpo y el fármaco tras la internalización y degradación dentro de la célula diana. Un enlazador no escindible a modo de ejemplo es MCC.

Fármacos

En determinadas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un agente quimioterapéutico. Ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN.TM.); alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tal como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos, adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos enodinos (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma1 y calicheamicina theta I, véase, p. ej., Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos enodinos relacionados con cromoproteínas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina; cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolin-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, nitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tal como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tal como calusterona, propionato de

dromostanolona, epitiostanol, mepitiostanol, testolactona; anti-suprarrenales, tales como aminoglutehimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; PSK.RTM.; razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej. paclitaxel (TAXOL.TM., Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE.RTM., Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DM-FO); ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores, tales como antiestrógenos incluyendo por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos, tal como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; ARNip y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Otros agentes quimioterapéuticos que se pueden usar con la presente invención se divulgan en la publicación de Estados Unidos N.º 20080171040 o la publicación de Estados Unidos N.º 20080305044.

Se contempla que un anticuerpo puede conjugarse con dos o más agentes quimioterapéuticos diferentes o una composición farmacéutica puede comprender una mezcla de anticuerpos en donde el componente de anticuerpo es idéntico excepto por estar conjugado con un agente quimioterapéutico diferente. Tales realizaciones pueden ser útiles para dirigirse a múltiples rutas biológicas con una célula diana.

En realizaciones preferidas, el ADC comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de maitansinoide, que son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. Se describen maitansinoides, incluyendo varias modificaciones, en las patentes de Estados Unidos N.º 3896111; 4151042; 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; 4371533; y en el documento WO 2009/099728. Los restos de fármacos maitansinoides se pueden aislar de fuentes naturales, producidos utilizando tecnología recombinante, o preparados sintéticamente. Ejemplos de maitansinoides incluyen C-19-decloro (Patente de Estados Unidos N.º 4256746), C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/- C-19-decloro ((Patentes de Estados Unidos N.º 4307016 y 4361650), C-20-demetoxi (o C-20-aciloxi (-OCOR), +/- decrolo ((Patente de Estados Unidos N.º 4294757), C-9-SH (Patente de Estados Unidos N.º 4.424.219), C-14-alcoximetil (demetoxi/CH₂OR) ((Patente de Estados Unidos N.º 4.331.598), C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) ((Patente de Estados Unidos N.º 4.450.254), C-15-hidroxi/aciloxi ((Patente de Estados Unidos N.º 4.364.866), C-15-metoxi (Patentes de Estados Unidos N.º 4.313.946 y 4.315.929), C-18-N-desmetilo (Patentes de Estados Unidos N.º 4.362.663 y 4.322.348) y 4,5-desoxi (Patente de Estados Unidos N.º 4.371.533).

Se pueden usar diversas posiciones en compuestos maitansinoides como posición de enlace, dependiendo del tipo de enlace deseado. Por ejemplo, para formar un enlace éster, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo a, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo son todas adecuadas (Patentes de Estados Unidos N.º 5208020, RE39151 y 6913748; Publicaciones de Solicitud de Patente de E.E.U.U. N.º 20060167245 y 20070037972 y documento WO 2009099728).

Los maitansinoides preferidos incluyen los conocidos en la técnica como DM1, DM3 y DM4 (Publicaciones de Solicitud de Patente N.º 2009030924 y 20050276812).

Los ADC que contienen maitansinoides, los métodos para fabricar tales ADC y su uso terapéutico se describen en las Patentes de Estados Unidos N.º 5208020 y 5416064, en la Publicación de Solicitud de Patente N.º 20050276812 y en el documento WO 2009099728. Los enlazadores que son útiles para preparar ADC de maitansinoides (Patente de Estados Unidos N.º 5208020 y Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2005016993 y 20090274713). Los ADC de maitansinoides que comprenden un enlazador SMCC pueden prepararse como se divulga en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2005/0276812.

Anticuerpos con Función Efectora Potenciada

Una de las funciones de la porción Fc de un anticuerpo es comunicarse con el sistema inmunitario cuando el anticuerpo se une a su diana. Esto se considera "función efectora". La comunicación conduce a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por siglas en inglés), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés). La ADCC y la ADCP están mediadas por la unión de Fc a los receptores de Fc en la superficie de las células del sistema inmunitario. La CDC está mediada por la unión de Fc con proteínas del sistema del complemento, p. ej., Clq.

Las subclases de IgG varían en su capacidad para mediar en las funciones efectoras. Por ejemplo, IgG1 es muy superior a IgG2 e IgG4 en la mediación de ADCC y CDC. Por lo tanto, en realizaciones en las que una célula que expresa ST2 está dirigida a la destrucción, se preferiría un anticuerpo IgG1 anti-ST2.

La función efectora de un anticuerpo se puede aumentar o disminuir, introduciendo una o más mutaciones en el Fc. Las realizaciones de la invención incluyen proteínas de unión a antígeno, p. ej., anticuerpos, que tienen un Fc modificado por ingeniería para aumentar la función efectora (documento US 7.317.091 y Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009). Las moléculas Fc de IgG1 a modo de ejemplo que tienen una función efectora incrementada incluyen (de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat) aquellas que tienen las siguientes sustituciones:

S239D/I332E
S239D/A330S/I332E
S239D/A330L/I332E
S298A/D333A/K334A
P247I/A339D
P247I/A339Q
D280H/K290S
D280H/K290S/S298D
D280H/K290S/S298V
F243L/R292P/Y300L
F243L/R292P/Y300L/P396L
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
G236A/S239D/I332E
K326A/E333A
K326W/E333S
K290E/S298G/T299A
K290N/S298G/T299A
K290E/S298G/T299A/K326E
K290N/S298G/T299A/K326E

Otras realizaciones de la invención incluyen proteínas de unión a antígeno, p. ej., anticuerpos, que tienen un Fc modificadas por ingeniería para disminuir la función efectora. Las moléculas de Fc a modo de ejemplo que tienen una función efectora disminuida incluyen (basándose en el esquema de numeración de Kabat) aquellas que tienen las siguientes sustituciones:

N297A (IgG1)
L234A/I235A (IgG1)
V234A/G237A (IgG2)
L235A/G237A/E318A (IgG4)
H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)
C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
C226S/C229S/E233P/I234V/I235A (IgG1)
L234F/I235E/P331S (IgG1)
S267E/I328F (IgG1)

Otro método para aumentar la función efectora de las proteínas que contienen Fc de IgG es reduciendo la fucosilación del Fc. La eliminación de la fucosa del núcleo de los oligosacáridos de tipo complejo biantenarico unidos al Fc aumentó en gran medida la función efectora de ADCC sin alterar la unión al antígeno o la función efectora de CDC. Se conocen varias formas de reducir o suprimir la fucosilación de moléculas que contienen Fc, p. ej., anticuerpos. Estas incluyen la expresión recombinante en determinadas líneas de células de mamífero, incluida una línea de células con FUT8 desactivado, línea variante de CHO Lec13, línea celular de hibridoma de rata YB2/O, una línea celular que comprende un pequeño ARN de interferencia específicamente contra el gen FUT8, y una línea celular que expresa conjuntamente β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III y α -manosidasa II de Golgi. De manera alternativa, la molécula que contiene Fc puede expresarse en una célula no de mamífero, tal como una célula vegetal, levadura o célula procariota, p. ej., E. coli. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, una composición comprende un anticuerpo, p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10 o Ab11 que tiene una fucosilación reducida o que carece de fucosilación por completo.

Composiciones farmacéuticas

La solicitud también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o una pluralidad de proteínas de unión a antígeno junto con diluyentes, transportador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente eficaces. En determinados ejemplos, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo. Las composiciones farmacéuticas incluyen, pero sin limitación, composiciones líquidas, congeladas y liofilizadas.

Preferentemente, los materiales de formulación no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas. En ejemplos específicos, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión al antígeno ST2, p. ej., un anticuerpo de unión a ST2.

En determinados ejemplos, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o penetración de la composición. En dichas realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina, prolina o lisina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tal como manitol o glicina); agentes quelantes (tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tal como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas); colorantes, agentes aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales (tales como sodio); conservantes (tal como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbato, tales como polisorbato 20, polisorbato, triton, trometamina, lecitina, colesteryl, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferentemente cloruro de sodio o potasio, manitol sorbitol); vehículos de suministro; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18 Edición, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

En determinados ejemplos, la composición farmacéutica óptima se determinará por un experto en la materia dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración prevista, el formato de suministro y la dosis deseada. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra. En determinados ejemplos, tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de aclaramiento *in vivo* de las proteínas de unión a antígeno de la invención. En determinados ejemplos, el vehículo o transportador primario en una composición farmacéutica puede ser bien de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o transportador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos a modo de ejemplo adicionales. En ejemplos específicos, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5 y pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En determinados ejemplos, las composiciones de proteína de unión al antígeno ST2 se pueden preparar para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Adicionalmente, en determinados ejemplos, el producto de proteína de unión al antígeno ST2 se puede formular como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden seleccionar para suministro parenteral. De manera alternativa, las composiciones se pueden seleccionar para inhalación o para suministro a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro del conocimiento de la técnica. Los componentes de la formulación están presentes preferentemente en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En determinadas realizaciones, los tampones se usan para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente más bajo, generalmente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas se pueden proporcionar en forma de solución acuosa sin pirógenos, parenteralmente aceptable que comprende la proteína de unión al antígeno ST2 deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que la proteína de unión al antígeno ST2 se formula como una solución estéril, isotónica, adecuadamente conservada. En determinados ejemplos, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar una liberación controlada o sostenida del producto que se puede suministrar mediante inyección de depósito. En determinados ejemplos, también se puede utilizar ácido hialurónico, que tiene el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. En determinados ejemplos, se pueden usar dispositivos implantables de suministros de fármacos para introducir la proteína de unión a antígeno deseada.

Se pueden formular composiciones farmacéuticas para inhalación. En estos ejemplos, las proteínas de unión al antígeno ST2 se formulan ventajosamente como un polvo seco, inhalable. En ejemplos específicos, Las soluciones para inhalación de proteínas de unión al antígeno ST2 también se pueden formular con un propulsor para suministro

en aerosol. En determinados ejemplos, las soluciones pueden nebulizarse. Por lo tanto, los métodos de formulación y administración pulmonar se describen con más detalle en la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US94/001875, que describe el suministro pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

- 5 También se contempla que las formulaciones puedan administrarse por vía oral. Las proteínas de unión al antígeno ST2 que se administran de esta manera pueden formularse con o sin los transportadores utilizados habitualmente en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. En determinados ejemplos, se puede diseñar una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para
10 facilitar la absorción de la proteína de unión al antígeno ST2. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de comprimidos y aglutinantes.

- 15 Las composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la materia, incluyendo formulaciones que implican proteínas de unión al antígeno ST2 en formulaciones de suministro sostenido o controlado. Las técnicas para formular varios otros medios de suministro controlado o sostenido, como transportadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito, son bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US93/00829, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para el suministro de composiciones farmacéuticas.
20 Las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (como se divulga en la Patente de Estados Unidos N.º 3.773.919 y en la Publicación de Solicitud de Patente Europea N.º EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 y Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etilen vinil acetato (Langer et al., 1981, supra) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Publicación de Solicitud de Patente Europea N.º EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas que se pueden preparar mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; Publicaciones de Solicitud de Patente Europea N.º EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

- 30 Las composiciones farmacéuticas utilizadas para la administración *in vivo* se proporcionan generalmente como preparaciones estériles. La esterilización se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización usando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. Las composiciones para administración parenteral pueden almacenarse
35 en forma liofilizada o en una solución. Las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

- 40 Los aspectos de la divulgación incluyen formulaciones de proteínas de unión al antígeno ST2 autotamponantes, que se pueden utilizar como composiciones farmacéuticas, tal como se describe en la solicitud de patente internacional WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599).

- 45 Como se analiza anteriormente, determinados ejemplos proporcionan composiciones de proteínas de unión al antígeno ST2, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas de unión al antígeno ST2, que comprenden, además de la proteína de unión al antígeno ST2, uno o más excipientes tales como los descritos de manera ilustrativa en esta sección y en otras partes del presente documento. Se pueden utilizar excipientes en la invención en este sentido para una amplia variedad de propósitos, tal como el ajuste de las propiedades físicas, químicas o biológicas de las formulaciones, tales como el ajuste de la viscosidad y/o los procesos de la invención para mejorar la eficacia o para estabilizar tales formulaciones y procesos contra la degradación y el deterioro debido a, por ejemplo, tensiones
50 que se producen durante la fabricación, transporte, almacenamiento, preparación previa al uso, administración y posteriormente.

- Hay varias exposiciones disponibles sobre materiales y métodos de estabilización y formulación de proteínas útiles en este sentido, tal como Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," en: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter y Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002) y Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), particularmente en partes pertinentes a excipientes y procesos de los mismos para formulaciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con la divulgación actual, especialmente en lo que se refiere a productos y procesos
60 farmacéuticos de proteínas para usos médicos veterinarios y/o humanos.

- Las sales pueden usarse de acuerdo con determinados ejemplos para, por ejemplo, ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad de una formulación y/o mejorar la solubilidad y/o la estabilidad física de una proteína u otro ingrediente de una composición de acuerdo con la divulgación.

- 65 Como es bien sabido, los iones pueden estabilizar el estado natural de las proteínas uniéndose a los restos cargados

en la superficie de la proteína y protegiendo los grupos cargados y polares en la proteína y reduciendo la fuerza de sus interacciones electrostáticas, interacciones atractivas y repulsivas. Los iones también pueden estabilizar el estado desnaturalizado de una proteína al unirse a, en particular, los enlaces peptídicos desnaturalizados (-CONH) de la proteína. Adicionalmente, la interacción iónica con grupos cargados y polares en una proteína también puede reducir las interacciones electrostáticas intermoleculares y, de este modo, prevenir o reducir la agregación e insolubilidad de la proteína.

Las especies iónicas difieren significativamente en sus efectos sobre las proteínas. Se han desarrollado una serie de clasificaciones categóricas de iones y sus efectos sobre las proteínas que pueden usarse en la formulación de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. Un ejemplo es la serie Hofmeister, que clasifica los solutos iónicos y no iónicos polares por su efecto sobre la estabilidad conformacional de las proteínas en solución. Los solutos estabilizantes se denominan "cosmotrópicos". Los solutos desestabilizantes se denominan "caotrópicos". Los cosmotropos se utilizan frecuentemente en concentraciones elevadas (p. ej., sulfato de amonio > 1 molar) para precipitar proteínas de la solución ("precipitación por adición de sal"). Los caotropos se utilizan frecuentemente para desnaturalizar y/o solubilizar proteínas ("disolución por adición de sal"). La eficacia relativa de los iones para "disolver por adición de sal" y "precipita por adición de sal" define su posición en la serie de Hofmeister.

Los aminoácidos libres se pueden utilizar en formulaciones de proteínas de unión al antígeno ST2 como agentes de carga, estabilizantes y antioxidantes, así como otros usos convencionales. Se puede usar lisina, prolina, serina y alanina para estabilizar proteínas en una formulación. La glicina es útil en la liofilización para asegurar la estructura y propiedades correctas de la torta. La arginina puede ser útil para inhibir la agregación de proteínas, tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas. La metionina es útil como antioxidante.

Los polioles incluyen azúcares, p. ej., manitol, sacarosa y sorbitol y alcoholes polihídricos tales como, por ejemplo, glicerol y propilenglicol, y, para propósitos de análisis en el presente documento, polietilenglicol (PEG) y sustancias relacionadas. Los polioles son cosmotrópicos. Son agentes estabilizantes útiles en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas para proteger las proteínas de los procesos de degradación física y química. Los polioles también son útiles para ajustar la tonicidad de las formulaciones.

Entre los polioles útiles en la presente se encuentra el manitol, frecuentemente utilizado para asegurar la estabilidad estructural de la torta en formulaciones liofilizadas. Asegura estabilidad estructural a la torta. Generalmente se usa con un lioprotector, p. ej., sacarosa. El sorbitol y la sacarosa se encuentran entre los agentes preferidos para ajustar la tonicidad y como estabilizantes para proteger contra las tensiones de congelación-descongelación durante el transporte o la preparación de bultos durante el proceso de fabricación. Los azúcares reductores (que contienen grupos aldehídos o cetonas libres), tales como glucosa y lactosa, puede glicar restos de lisina y arginina de superficie. Por lo tanto, generalmente no se encuentran entre los polioles preferidos para su uso de acuerdo con la divulgación. Además, los azúcares que forman dichas especies reactivas, tal como sacarosa, que se hidroliza a fructosa y glucosa en condiciones ácidas y, en consecuencia, genera glicación, tampoco se encuentra entre los polioles preferidos de la divulgación en este sentido. El PEG es útil para estabilizar proteínas y como crioprotector y puede usarse en el presente documento en este sentido.

Ejemplos de formulaciones de proteínas de unión al antígeno ST2 comprenden adicionalmente tensioactivos. Las moléculas de proteínas pueden ser susceptibles a la adsorción en las superficies y a la desnaturalización y la consiguiente agregación en las interfaces aire-líquido, sólido-líquido y líquido-líquido. Estos efectos generalmente escalan inversamente con la concentración de proteínas. Estas interacciones perjudiciales por lo general escalan inversamente con la concentración de proteína y generalmente se acentúan por agitación física, como la que se genera durante el envío y manipulación de un producto.

Los tensioactivos se utilizan de forma habitual para prevenir, minimizar o reducir la adsorción de la superficie. Los tensioactivos útiles en la invención en este sentido incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitán y poloxámero 188.

Los tensioactivos también se usan frecuentemente para controlar la estabilidad conformacional de las proteínas. El uso de tensioactivos en este sentido es específico de proteínas ya que, cualquier tensioactivo dado estabilizará generalmente algunas proteínas y desestabilizará otras.

Los polisorbatos son susceptibles a la degradación oxidativa y, con frecuencia, tal como se suministran, contienen cantidades suficientes de peróxidos para provocar la oxidación de las cadenas laterales de restos de proteínas, especialmente metionina. Consecuentemente, los polisorbatos deben usarse con cuidado y, cuando se usan, deben emplearse en su concentración eficaz más baja. En este sentido, los polisorbatos ejemplifican la regla general de que los excipientes deben usarse en sus concentraciones eficaces más bajas.

Ejemplos de formulaciones de proteínas de unión al antígeno ST2 comprenden además uno o más antioxidantes. Hasta cierto punto, la oxidación perjudicial de las proteínas se puede prevenir en las formulaciones farmacéuticas manteniendo niveles adecuados de oxígeno y temperatura ambientales y evitando la exposición a la luz. También se pueden usar excipientes antioxidantes para prevenir la degradación oxidativa de las proteínas. Entre los antioxidantes

útiles en este sentido se encuentran los agentes reductores, eliminadores de oxígeno/radicales libres y agentes quelantes. Los antioxidantes para su uso en formulaciones de proteínas terapéuticas de acuerdo con la invención son preferentemente solubles en agua y mantienen su actividad durante la vida útil de un producto. EDTA es un antioxidante preferido de acuerdo con la divulgación en este sentido.

Los antioxidantes pueden dañar las proteínas. Por ejemplo, los agentes reductores, como el glutatión en particular, pueden interrumpir los enlaces disulfuro intramoleculares. Por lo tanto, los antioxidantes para su uso en el presente documento se seleccionan para, entre otras cosas, eliminar o reducir suficientemente la posibilidad de que ellos mismos dañen las proteínas en la formulación.

Las formulaciones de acuerdo con la divulgación pueden incluir iones metálicos que son cofactores de proteínas y que son necesarios para formar complejos de coordinación de proteínas, tal como el zinc necesario para formar determinadas suspensiones de insulina. Los iones metálicos también pueden inhibir algunos procesos que degradan las proteínas. Sin embargo, los iones metálicos también catalizan procesos físicos y químicos que degradan las proteínas.

Se pueden usar iones de magnesio (10-120 mM) para inhibir la isomerización del ácido aspártico a ácido isoaspártico. Los iones Ca^{+2} (hasta 100 mM) pueden aumentar la estabilidad de la desoxirribonucleasa humana. Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , sin embargo, pueden desestabilizar la DNAsarh. De manera similar, Ca^{+2} y Sr^{+2} pueden estabilizar el factor VIII, puede desestabilizarse por Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} , y su agregación puede incrementarse por iones de Al^{+3} .

Ejemplos de las formulaciones de las proteínas de unión al antígeno ST2 comprenden además uno o más conservantes. Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales multidosis que implican más de una extracción del mismo recipiente. Su función principal es inhibir el crecimiento microbiano y asegurar la esterilidad del producto durante la vida útil o el período de uso del producto farmacológico. Los conservantes usados frecuentemente incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen una larga historia de uso con parenterales de moléculas pequeñas, el desarrollo de formulaciones de proteínas que incluyan conservantes puede ser un desafío. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizante (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante para limitar su uso en formulaciones de proteínas multidosis. Hasta ahora, la mayoría de los fármacos proteicos se han formulado para un solo uso. Sin embargo, cuando son posibles las formulaciones multidosis, tienen la ventaja añadida de permitir la comodidad del paciente y una mayor comerciabilidad. Un buen ejemplo es el de la hormona del crecimiento humano (hGH), donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha llevado a la comercialización de presentaciones en pluma de inyección de múltiples usos. Actualmente están disponibles en el mercado al menos cuatro de estos dispositivos de pluma que contienen formulaciones conservadas de hGH. Norditropin (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ (líquido, Genentech) y Genotropin (líquido - cartucho de doble cámara, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol, mientras que Somatropo (Eli Lilly) está formulado con m-cresol.

Es necesario considerar varios aspectos durante la formulación y desarrollo de formas de dosificación conservadas. Debe optimizarse la concentración eficaz de conservante en el fármaco. Esto requiere probar un conservante dado en la forma de dosificación con intervalos de concentración que confieren eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de la proteína.

Como cabría esperar, el desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más desafiante que las formulaciones liofilizadas. Los productos secados por congelación pueden liofilizarse sin el conservante y reconstituirse con un diluyente que contenga conservante en el momento de su uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con formulaciones líquidas, la eficacia y la estabilidad de los conservantes deben mantenerse durante toda la vida útil del producto (aproximadamente. 18 a 24 meses). Un punto importante a tener en cuenta es que la eficacia del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes del excipiente.

Las formulaciones de proteínas de unión al antígeno ST2 generalmente se diseñarán para rutas y métodos de administración específicos, para dosis de administración y frecuencias de administración específicas, para tratamientos específicos de enfermedades específicas, con intervalos de biodisponibilidad y persistencia, entre otras cosas. Por tanto, las formulaciones pueden diseñarse para su suministro por cualquier vía adecuada, que incluyen, pero sin limitación, oral, auditiva, oftálmica, rectal y vaginal y por vía parenteral, incluyendo inyección intravenosa e intraarterial, inyección intramuscular e inyección subcutánea.

Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal o como un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse o bien en una forma lista para su uso o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración. La presente solicitud también describe kits para producir una unidad de administración de dosis única. Los kits pueden contener cada uno tanto un primer envase que tiene una proteína desecada como un segundo envase que tiene una formulación acuosa. En determinados ejemplos, se proporcionan kits que contienen jeringas precargadas sencillas y con múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas para líquidos y liojeringas).

La cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene proteína de unión al antígeno ST2 a emplear dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, la indicación para la que se está utilizando la proteína de unión al antígeno ST2, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal u tamaño del órgano) y/o condición (edad y estado general de salud) del paciente. En determinados ejemplos, el médico puede valorar la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede variar de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 30 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En ejemplos específicos, la dosis puede variar desde 1,0 µg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, opcionalmente desde 10 µg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg o desde 100 µg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión al antígeno ST2 preferentemente da como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos sin de síntomas de la enfermedad, o una prevención del empeoramiento o discapacidad debido a la enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar usando un dispositivo médico. Se describen ejemplos de dispositivos médicos para administrar composiciones farmacéuticas en las Patentes de Estados Unidos N.º 4.475.196; 4.439.196; 4.447.224; 4.447. 233; 4.486.194; 4.487.603; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 5.064.413; 5.312.335; 5.312.335; 5.383.851; y 5.399.163.

Métodos para Diagnosticar o Tratar una Enfermedad o Trastorno Asociados a ST2

Las proteínas de unión al antígeno ST2 descritas en el presente documento son particularmente útiles para detectar ST2 en una muestra biológica. En determinados ejemplos, una muestra biológica obtenida de un paciente se pone en contacto con una proteína de unión al antígeno ST2. A continuación, se detecta la unión de la proteína de unión al antígeno ST2 a ST2 para determinar la presencia o la cantidad relativa de ST2 en la muestra. Tales métodos pueden ser útiles para diagnosticar o determinar pacientes que son susceptibles de tratamiento con una proteína de unión al antígeno ST2.

En determinados ejemplos, se utiliza una proteína de unión al antígeno ST2 para diagnosticar, detectar o tratar un trastorno autoinmunitario o inflamatorio. En el tratamiento de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios, la proteína de unión al antígeno ST2 puede dirigirse a las células del sistema inmunitario que expresan ST2 para su destrucción y/o puede bloquear la interacción de ST2 con IL-33.

Los trastornos que están asociados con la señalización mediada por IL-33 son particularmente susceptibles de tratamiento con una o más proteínas de unión al antígeno ST2 divulgadas en el presente documento. Dichos trastornos incluyen, pero sin limitación, inflamación, enfermedad autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias paraneoplásicas, inflamación de cartílagos, enfermedad fibrótica y/o degradación ósea, artritis, artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide juvenil pauciarticular, artritis reumatoide juvenil poliarticular, artritis reumatoide juvenil de inicio sistémico, espondilitis anquilosante juvenil, artritis enteropática juvenil, artritis reactiva juvenil, síndrome de Reter juvenil, Síndrome SEA (seronegatividad, Entesopatía, Síndrome de artropatía), dermatomiositis juvenil, artritis psoriásica juvenil, esclerodermia juvenil, lupus eritematoso sistémico juvenil, vasculitis juvenil, artritis reumatoide pauciarticular, artritis reumatoide poliarticular, artritis reumatoide de inicio sistémico, espondilitis anquilosante, artritis enteropática, artritis reactiva, Síndrome de Reter, Síndrome SEA (seronegatividad, Entesopatía, Síndrome de artropatía), dermatomiositis, artritis psoriásica, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, miolitis, polimiolitis, dermatomiositis, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis, ploidialgia reumática, sarcoidosis, esclerodermia, esclerosis, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, síndrome de Sjögren, psoriasis, psoriasis en placas, psoriasis gotosa, psoriasis inversa, psoriasis pustular, psoriasis eritrodérmica, dermatitis, dermatitis atópica, ateroesclerosis, lupus, enfermedad de Still, Lupus Eritematoso Sistémico (LES), miastenia grave, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple (EM), asma, EPOC, , rinosinusitis, rinosinusitis con pólipos, esofagitis eosinofílica, bronquitis eosinofílica, Enfermedad de Guillain-Barré, diabetes mellitus de tipo I, tiroiditis (p. ej., enfermedad de Graves), enfermedad de Addison, fenómeno de Raynaud, hepatitis autoinmunitaria, GvHD, rechazo de trasplante, daño renal y similares.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario o inflamatorio, en donde el trastorno autoinmunitario o inflamatorio es asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, fibrosis pulmonar, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, esclerosis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Behcet, enfermedad cardiovascular, rinosinusitis, poliposis nasal o bronquitis eosinofílica.

En determinados ejemplos como se divulga en el presente documento, se utiliza una proteína de unión al antígeno ST2 para diagnosticar, detectar o tratar un cáncer o un trastorno tumorigénico. Al tratar un cáncer o un trastorno tumorigénico, la proteína de unión al antígeno ST2 puede dirigirse a las células que expresan ST2 para su destrucción

y/o puede bloquear la interacción de ST2 con IL-33, reduciendo así la señalización mediada por IL-33. Por ejemplo, la alta expresión de ST2 soluble se asocia con una mejor supervivencia en pacientes con cáncer de mama. (Prechtel et al, Lab Invest (2001) 81:159-165) Debido a que ST2 soluble se une y bloquea la señalización mediada por IL-33, se contempla que las proteínas de unión al antígeno ST2 que bloquean la señalización mediada por IL-33 serían útiles para promover una supervivencia mejorada en pacientes con cáncer de mama. Los cánceres o trastornos tumorigénicos que se pueden diagnosticar, detectar o tratar con una proteína de unión al antígeno ST2 incluyen, pero sin limitación, tumores sólidos en general, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de endometrio, cáncer renal, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, carcinoma de células escamosas, melanoma maligno uveal, cáncer de cuello de útero, cáncer colorrectal, vejiga, cerebro, pancreático, cabeza, cuello, hígado, leucemia, linfoma y enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, melanoma, cáncer gástrico, cáncer astrocítico, estómago y adenocarcinoma pulmonar.

Las proteínas de unión a antígeno se pueden utilizar para inhibir el crecimiento, progresión y/o metástasis tumoral. Dicha inhibición se puede monitorizar usando varios métodos. Por ejemplo, la inhibición puede dar como resultado una reducción del tamaño del tumor y/o una disminución de la actividad metabólica dentro de un tumor. Ambos parámetros pueden medirse mediante exploraciones por MRI o PET, por ejemplo. La inhibición también se puede monitorizar mediante biopsia para determinar el nivel de necrosis, muerte de las células tumorales y el nivel de vascularización dentro del tumor. El alcance de la metástasis se puede monitorizar usando métodos conocidos.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes, tanto reales como pronósticos, se proporcionan con el propósito de ilustrar realizaciones o características específicas de la presente invención y no pretenden limitar su alcance.

EJEMPLO 1: Los Anticuerpos de ST2 son Eficaces en un Modelo Animal de Asma

Este ejemplo demuestra que la administración de anticuerpos que se unen a ST2 e inhiben la señalización mediada por IL-33 es eficaz en un modelo animal de una enfermedad inflamatoria, es decir, asma. Un mAb de ST2 de ratón neutralizante (mAb sustituto de ST2) inhibió la actividad de IL-33 administrada exógenamente *in vivo*. Se administraron a los ratones 200 ng de IL-33 de ratón recombinante por vía intranasal dos horas después de la inyección intravenosa de 100 ug de mAb anti-ST2. Al día siguiente, las concentraciones de IL-5 en el líquido de lavado broncoalveolar (BALF) se midieron mediante ELISA. Las concentraciones basales de IL-5 se obtuvieron del BALF de ratones tratados con solución salina antes de la exposición con solución salina. Las concentraciones máximas de IL-5 en el BALF se obtuvieron a partir de ratones tratados con Ig de control de isotipo expuestos con IL-33. En comparación con el tratamiento con Ig de control de isotipo, el tratamiento con mAb de ST2 inhibió significativamente la IL-5 inducida por IL-33 en el BALF de las cepas de ratón BALB/c y C57BL/6 (FIG. 1).

El mAb sustituto de ST2 fue eficaz en un modelo de asma inducido por alérgenos de cucarachas (CRA), con ratones tratados con anticuerpo de ST2 que tienen significativamente menos eosinófilos en el BALF que los ratones tratados con Ig de control de isotipo. Los ratones BALB/c se expusieron con 100 µg de CRA los días 1, 3, 6, 8, 10 y 13. A los ratones se les inyectó 250 µg de mAb anti-ST2 o de Ig de control de isotipo los días 0, 7 y 13, teniendo lugar la inyección de anticuerpo del día 13 antes de la exposición intranasal final con CRA. El día 14, los ratones se anestesiaron y se sometieron a lavado pulmonar. Se enumeraron las poblaciones de células en el BALF y el tratamiento con mAb anti-ST2 dio como resultado la presencia de significativamente menos células totales en el BALF, con eosinófilos que comprenden la población de células impactadas significativamente (FIG. 2).

EJEMPLO 2: Producción de Anticuerpos anti-ST2 Utilizando la Plataforma Xenomouse®

La generación de anticuerpos completamente humanos dirigidos contra ST2 humana se llevó a cabo utilizando la tecnología XENOMOUSE® (Patentes de Estados Unidos N.º 6.114.598; 6.162.963; 6.833.268; 7.049.426; 7.064.244; Green et al., 1994, Nature Genetics 7:13-21; Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156; Green y Jakobovitis, 1998, J. Ex. Med. 188:483-495, Kellermann y Green, 2002, Current Opinion in Biotechnology, 13:593-597

Las inmunizaciones de animales XMG2K, XMG4K y XMG4KL XENOMOUSE® se llevaron a cabo con un polipéptido que comprende el dominio extracelular de ST2 humano fusionado a un dominio Fc de anticuerpo humano o con la proteína de fusión ST2-Fc humana complejada con IL-33 humana. Una cantidad adecuada de inmunógeno (es decir, diez µg/ratón de ST2 soluble) se usó para la inmunización inicial de animales XENOMOUSE® de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º de Serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y las Solicitudes de Patente Internacional N.º WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998 y WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000. Después de la inmunización inicial, se administraron posteriores inmunizaciones de refuerzo de inmunógeno (cinco µg/ratón de complejo ST2 soluble o ST2/IL33) de acuerdo con un programa y durante el tiempo necesario para inducir un título adecuado de anticuerpo anti-ST2 en los ratones. Los títulos se determinaron con un método adecuado, por ejemplo, ELISA o por clasificación de células activadas por fluorescencia (FAC, por sus siglas en inglés).

Se identificaron los animales que presentaban títulos adecuados y se obtuvieron linfocitos del drenaje de los ganglios

linfáticos y, de acuerdo con fue necesario, se agruparon para cada cohorte. Los linfocitos se disociaron del tejido linfoide triturando en un medio adecuado (por ejemplo, medio Eagle modificado de Dulbecco; DMEM; obtenible de Invitrogen, Carlsbad, CA) para liberar las células de los tejidos y suspenderlas en DMEM. Los linfocitos B se seleccionaron y/o expandieron utilizando un método adecuado y se fusionaron con un compañero de fusión adecuado, por ejemplo, células de mieloma no secretor P3X63Ag8.653 (American Type Culture Collection CRL 1580; Kearney et al, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550), utilizando técnicas que son conocidas en la técnica.

En un método de fusión, los linfocitos se mezclaron con células compañeras de fusión en una relación de 1:4. La mezcla de células se sedimentó suavemente mediante centrifugación a 400 xg durante 4 minutos, el sobrenadante se decantó y la mezcla de células se mezcló suavemente (por ejemplo, usando una pipeta de 1 ml). Se indujo la fusión con PEG/DMSO (polietilenglicol/dimetilsulfóxido; obtenible de Sigma-Aldrich, St. Louis MO; 1 ml por millón de linfocitos). Se añadió lentamente PEG/DMSO con agitación suave durante un minuto seguido, por un minuto de mezcla. IDMEM (DMEM sin glutamina; 2 ml por millón de linfocitos B), después se añadió durante 2 minutos con agitación suave, seguido de IDMEM adicional (8 ml por millón de linfocitos B) que se añadió durante 3 minutos.

Las células fusionadas se sedimentaron suavemente (400 xg 6 minutos) y se resuspendieron en 20 ml de medio de selección (DMEM que contenía Azaserina e Hipoxantina [HA] y otros materiales suplementarios según fuera necesario) por millón de linfocitos B. Las células se incubaron durante 20-30 min a 37 °C y después se resuspendieron en 200 ml de medio de selección y se cultivaron durante tres a cuatro días en un matraz T175 antes de sembrarlas en placas de 96 pocillos.

Las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos utilizando técnicas convencionales para maximizar la clonalidad de las colonias resultantes. Después de varios días de cultivo, se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayos de exploración. Los sobrenadantes de hibridoma generados a partir de ratones inmunizados con el complejo ST2-Fc/IL33 se exploraron con un ensayo basado en ELISA realizado utilizando placas ELISA de poliestireno de 96 pocillos recubiertas pasivamente durante la noche a 4 °C con 0,5 ug/ml de ST2-Flag/his complejo a IL-33 humana. Para determinar la unión específica a ST-2, se realizó una segunda exploración ELISA usando placas de poliestireno de 96 pocillos recubiertas pasivamente durante la noche a 4 °C con 10 ug/ml de neutravidina. A continuación, las placas se lavaron y cargaron con 0,5 µg/ml de IL33 humana biotinilada. Esta exploración con ELISA identificó más de 1200 aglutinantes anti-ST2 específicos.

Los sobrenadantes de hibridoma generados a partir de ratones inmunizados con ST2-Fc soluble se exploraron para determinar anticuerpos específicos del antígeno ST2 mediante la Tecnología de Ensayo de Microvolumen Fluorométrico (FMAT, por sus siglas en inglés) mediante la exploración contra células HEK293T recombinantes transfectadas transitoriamente con ST2 humano de longitud completa y exploración con recuento contra células HEK293T transfectadas de forma simulada. Brevemente, las células se sembraron en placas FMAT de 384 pocillos en un volumen de 40 ul/pocillo a una densidad de 6.000 células ST2 positivas/pocillo y 14.000 células ST2 negativas transfectadas de forma simulada/pocillo. A continuación, se añadió sobrenadante de hibridoma y se dejó que se uniera durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de un lavado y detección secundaria usando un anticuerpo secundario anti-Fc-Cy5 humano. Esta exploración por FMAT identificó más de 2200 aglutinantes específicos anti-ST2 de hibridomas generados a partir de ratones inmunizados con el dominio extracelular de ST2.

Este panel combinado de 3400 sobrenadantes de hibridomas específicos anti-ST2 se caracterizó después adicionalmente por la capacidad de antagonizar funcionalmente la señalización de ST2 usando un ensayo de liberación de citocinas de interferón-γ. Brevemente, se sembraron células mononucleares de sangre periférica humana purificadas (PBMNC, por sus siglas en inglés) o células NK humanas purificadas en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos y se estimularon con IL-33 e IL-12 humanas, induciendo la liberación de interferón-gamma en el sobrenadante. Se cuantificaron los niveles de interferón-gamma en el sobrenadante y se correlacionaron directamente con la señalización dependiente de IL-33/ST2. Usando este bioensayo, se analizaron muestras de hibridoma para determinar la capacidad de bloquear la liberación de interferón gamma mediante el bloqueo de la vía de señalización de ST2. Esta exploración identificó 578 sobrenadantes de hibridoma generados a partir de la inmunización con ST2-Fc que inhibían la liberación de interferón gamma en más del 80 %. Además, se identificaron 505 sobrenadantes de hibridoma generados a partir de la inmunización con el complejo ST2Fc/IL-33 que inhibían la liberación de interferón-gamma en más del 70 %.

Este panel de 1083 sobrenadantes de hibridoma se caracterizó después por la unión de reacción cruzada a ST2 de ratón y de mono cynomolgus, para la clasificación de afinidad relativa mediante ELISA de antígeno limitado, para el bloqueo bioquímico de receptor/ligando por ELISA y para la unión endógena por FAC usando líneas celulares. Los datos generados en estos ensayos secundarios se utilizaron para diversificar el panel grande en 2 conjuntos de 40 líneas de hibridoma que se avanzaron a la subclonación, ampliación y purificación.

EJEMPLO 3: Determinaciones de K_D

En este ejemplo, se determinó la afinidad de los anticuerpos de unión a ST2. Las evaluaciones por resonancia de plasmón de superficie se llevaron a cabo utilizando un biosensor óptico Proteon XPR-36 equipado con un chip sensor GLC (Bio-Rad). El análisis del biosensor se realizó a 25 °C en un sistema tampón HBS-EP+(IX) (HEPES 10 mM pH

7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,0 mM, tensioactivo P20 al 0,05%, GE Healthcare). Todos los reactivos se mantuvieron a 8 °C antes de la inyección.

Se inmovilizó anti-IgG humana de cabra (fragmento Fc específico, Jackson ImmunoResearch) en la superficie del sensor en la dirección vertical mediante acoplamiento de amina convencional a los carriles 1-6 (~ 4000 UR) y después se bloqueó con etanolamina. Los anticuerpos se capturaron (~ 40-100 UR) en la dirección vertical a los carriles 1-5. El carril vertical 6 se dejó en blanco y se utilizó como referencia. Los datos se recopilaban en grupos de 15 anticuerpos (tres conjuntos de 5).

Los reactivos ST2 (humanos o cyno) se prepararon en tampón de ejecución a una concentración de 25 nM y después se diluyeron 3 veces hasta 309 pM. Una sola inyección a lo largo de la dirección horizontal suministró una serie de concentración completa de cada molécula de ST2, utilizando tampón para completar una fila de seis muestras y proporcionar un blanco en línea para hacer doble referencia a los datos de respuesta. Las velocidades de asociación (3 min) y disociación (30 min) se monitorizaron a una velocidad de flujo de 100 ul/min.

La superficie se regeneró a un caudal de 100 ul/min con glicina 10 mM (pH 1,5, 30 ul).

Los datos se corrigieron, recortaron, alinearon, restaron la diferencia (entre puntos) en al valor inicial y después se ajusta a un modelo de unión 1:1 usando ProteOn Manager (versión 2.1.2.05). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Anticuerpo	Analito	ka	kd	KD (pM)	Anticuerpo	Analito	ka	kd	KD (pM)
Ab12	cy ST2	2,50E+06	5,60E-05	22,5	Ab12	hu ST2	2,35E+06	3,41E-05	14,5
Ab13	cy ST2	1,40E+06	1,80E-04	128,0	Ab13	hu ST2	1,30E+06	9,12E-05	70,3
Ab14	cy ST2	3,57E+06	1,59E-03	445,0	Ab14	hu ST2	4,22E+06	2,57E-05	6,1
Ab15	cy ST2	2,67E+06	6,23E-05	23,4	Ab15	hu ST2	1,83E+06	5,38E-05	29,3
Ab16	cy ST2	2,61E+06	2,18E-04	83,7	Ab16	hu ST2	1,28E+06	1,47E-04	115,0
Ab17	cy ST2	3,38E+06	1,43E-04	42,2	Ab17	hu ST2	2,86E+06	1,04E-04	36,4
Ab18	cy ST2	3,16E+06	1,44E-04	45,7	Ab18	hu ST2	2,67E+06	1,19E-04	44,5
Ab19	cy ST2	3,07E+06	1,59E-04	51,8	Ab19	hu ST2	2,81E+06	1,25E-04	44,5
Ab20	cy ST2	2,61E+06	6,64E-05	25,5	Ab20	hu ST2	2,41E+06	5,68E-05	23,5
Ab21	cy ST2	3,21E+06	4,92E-05	15,3	Ab21	hu ST2	2,83E+06	3,07E-05	10,8
Ab22	cy ST2	2,87E+06	5,33E-05	18,6	Ab22	hu ST2	2,50E+06	4,05E-05	16,2
Ab23	cy ST2	3,29E+06	3,23E-04	98,2	Ab23	hu ST2	2,70E+06	2,24E-04	83,1
Ab24	cy ST2	2,03E+06	1,54E-04	75,9	Ab24	hu ST2	2,89E+06	1,50E-04	51,7
Ab25	cy ST2	6,42E+06	5,75E-04	89,6	Ab25	hu ST2	4,00E+06	5,44E-04	136,0
Ab26	cy ST2	5,65E+06	3,08E-04	54,5	Ab26	hu ST2	5,22E+06	2,97E-04	56,9
Ab27	cy ST2	1,63E+06	3,75E-04	230,0	Ab27	hu ST2	1,35E+06	3,12E-04	230,0
Ab28	cy ST2	2,97E+06	1,35E-05	4,5	Ab28	hu ST2	2,37E+06	1,98E-05	8,4
Ab29	cy ST2	3,97E+05	9,45E-05	238,0	Ab29	hu ST2	3,76E+05	8,96E-05	238,0
Ab30	cy ST2	3,09E+06	3,17E-05	10,2	Ab30	hu ST2	2,79E+06	2,71E-05	9,7
Ab31	cy ST2	1,07E+06	2,08E-04	194,0	Ab31	hu ST2	8,78E+05	2,43E-04	277,0
Ab32	cy ST2	4,81E+06	2,69E-04	55,8	Ab32	hu ST2	4,37E+06	2,63E-04	60,2
Ab33	cy ST2	4,26E+06	3,31E-04	77,6	Ab33	hu ST2	4,04E+06	3,41E-04	84,4
Ab34	cy ST2	2,78E+06	4,60E-05	16,5	Ab34	hu ST2	2,61E+06	3,19E-05	12,3
Ab35	cy ST2	9,76E+05	1,00E-04	103,0	Ab35	hu ST2	8,17E+05	1,15E-04	141,0
Ab36	cy ST2	4140000	0,000278	67,1	Ab36	hu ST2	4,12E+06	2,80E-04	68,1

La afinidad de anticuerpos adicionales se determinó usando un protocolo de resonancia de Plasmón ligeramente modificado. Las evaluaciones de resonancia de plasmón de superficie para los anticuerpos Ab1, Ab2, Ab3 y Ab4 se realizaron a 25 °C utilizando un instrumento Biacore 3000 (Biacore International AB, Uppsala, Suecia) equipado con un chip sensor CM5. Los anticuerpos de captura específicos anti-Fcy se inmovilizaron covalentemente en dos celdas de flujo en el chip CM4 usando química de acoplamiento de amina convencional con HBS-EP ((HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, GE Healthcare) como búfer de ejecución. Brevemente, cada celda de flujo se activó con una mezcla 1:1 (v/v) de NHS 0,1 M y EDC 0,4 M. La IgG antihumana de cabra de Affinipure, el anticuerpo específico de fragmento Fcy (Jackson ImmunoResearch Inc. West Grove, PA) a 30 ug/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 5,0 se inmovilizó con un nivel diana de 3000 UR en dos celdas de flujo. Las superficies reactivas residuales se desactivaron con una inyección de etanolamina 1 M. Después, el tampón de ejecución se cambió a HBS-EP + 0,1 mg/ml de BSA para todas las etapas restantes.

Todos los anticuerpos se prepararon en tampón de ejecución por triplicado y se diluyeron 3 veces, y se inyectaron de modo que una inyección de tres minutos a 10 µl/min sobre la celda de flujo de prueba dio como resultado aproximadamente 75 - 90 unidades de respuesta de anticuerpos capturados en la superficie de la celda de flujo de prueba. No se capturó ningún anticuerpo en la superficie de la celda de flujo de control. A continuación, se hicieron

fluir ST2 humano o cyno a diversas concentraciones (200 nM - 0,0914 nM), junto con tampones en blanco, sobre las dos celdas de flujo. Se utilizó un caudal de 50 ul/min y una fase de asociación de dos minutos seguida de una fase de disociación de cuatro minutos. Después de cada ciclo, las superficies se regeneraron con una inyección de 50 µl de glicina 10 mM, pH 1,5. Después se capturó el anticuerpo nuevo en la celda de flujo de prueba para prepararlo para el siguiente ciclo. Se realizó un experimento de disociación larga por separado (60 min) por triplicado a una concentración de 200 nM.

Se hizo una doble referencia a los datos restando las respuestas de la superficie de control para eliminar los cambios en el índice de refracción general, y restando después la respuesta en blanco del tampón promediada para eliminar los artefactos sistemáticos de las celdas de flujo experimentales. Los datos de ST2 se procesaron y se ajustaron globalmente a un modelo de interacción 1:1 con Rmax local en el software de evaluación BIA v 4.1. (Biacore International AB, Upsala, Suecia). Se determinaron las constantes de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d) y se utilizaron para calcular la constante de equilibrio de disociación (K_D). Las constantes de velocidad de disociación y las constantes de equilibrio de disociación para Ab1, Ab2, Ab3 y Ab4 se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5

Anticuerpo	ST2	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
Ab1	Humano	1,43E+06	1,11E-04	77,7
Ab1	Cyno	1,69E+06	1,97E-04	117
Ab2	Humano	3,33E+05	1,13E-05	33,9
Ab2	Cyno	3,60E+05	1,16E-05	32,2
Ab3	Humano	4,00E+05	9,50E-05	238
Ab3	Cyno	6,74E+05	8,55E-05	127
Ab4	Humano	2,35E+06	7,06E-04	301
Ab4	Cyno	2,50E+06	1,29E-03	516

EJEMPLO 4: Unión de Anticuerpos Sensible al pH

Los anticuerpos terapéuticos que se unen con menor afinidad a pH bajo a sus dianas pueden tener propiedades PK mejoradas que les permitirán ser suministrados con menor frecuencia o en dosis más bajas. (Nat Biotechnol. 2010 28(11):1203-7 T.Igawa et al Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization) Esto se debe a la liberación de la diana por parte del anticuerpo al pH bajo del lisosoma, seguida de la posterior degradación de la diana y reciclaje de anticuerpos.

Se llevaron a cabo análisis con biosensor de la unión sensible al pH de los anticuerpos Ab1, Ab2, Ab3 y Ab4 en un Biacore 4000. La configuración fue similar al Ejemplo 3, donde se realizaron las mediciones de la K_D de estos anticuerpos, excepto que los datos se ajustaron para una inyección por duplicado de una concentración única de 2,46 nM de anticuerpo α -ST2. Se monitorizaron las velocidades de asociación (5 min) a pH 7,4 y las velocidades de disociación (10 min) a pH 5,5 y 7,4 a un caudal de 30 ul/min. Los datos restados de referencia se ajustaron a un modelo 1:1 en Scrubber. Varios de los anticuerpos mostraron velocidades de disociación dramáticamente más rápidas a un pH más bajo, tal como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Anticuerpo	pH	k_d estimada (1/s) *	Factor de cambio de k_d a pH 7,4/pH 5,5
Ab1	7,4	0,000134	88,1
Ab1	5,5	0,0118	
Ab2	7,4	0,0000298	8,0
Ab2	5,5	0,000238	
Ab3	7,4	0,0000273	2,9
Ab3	5,5	0,0000791	
Ab4	7,4	0,000632	16,9
Ab4	5,5	0,0107	

EJEMPLO 5: Competencia Cruzada de Anticuerpos

Una forma común de caracterizar los epítomos es mediante experimentos de competencia. Se puede pensar que los anticuerpos que compiten entre sí se unen al mismo sitio en la diana. Este ejemplo describe un método para determinar la competencia por la unión a ST2 y los resultados del método cuando se aplica a varios anticuerpos descritos en el presente documento.

Los experimentos de agrupación se pueden realizar de varias formas, y el método empleado puede tener un efecto sobre los resultados del ensayo. Común a estos métodos es que ST2 está generalmente unido por un anticuerpo de referencia y sondado por otro. Si el anticuerpo de referencia evita la unión del anticuerpo sonda, entonces se dice que los anticuerpos están en el mismo bin. El orden en el que se emplean los anticuerpos es importante. Si el anticuerpo

A se emplea como anticuerpo de referencia y bloquea la unión del anticuerpo B, no siempre ocurre lo contrario: el anticuerpo B utilizado como anticuerpo de referencia no bloqueará necesariamente el anticuerpo A. Hay varios factores en juego en este punto: la unión de un anticuerpo puede causar cambios conformacionales en la diana que impiden la unión del segundo anticuerpo, o los epítomos que se solapan, pero no se ocluyen completamente entre sí pueden permitir que el segundo anticuerpo aún tenga suficientes interacciones de alta afinidad con la diana para permitir la unión. En general, si se observa competencia en cualquier orden, se dice que los anticuerpos se agrupan entre sí, y si ambos anticuerpos pueden bloquearse entre sí, entonces es probable que los epítomos se solapen de manera más completa.

Para este Ejemplo, se usó una modificación del método de Binning Multiplexado descrito por Jia, et al (J. Immunological Methods, 288 (2004) 91-98). Se utilizó ST2-FLAG His soluble. Cada código de perla de perlas Luminex recubiertas con estreptavidina (Luminex, número L100-L1XX-01, XX especifica el código de la perla) se incubó en 100 ul de 6 pg/perla de anticuerpo de captura anti-IgG humana de ratón monovalente biotinilado (BD Pharmingen, # 555785) durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad, después se lavó 3 veces con PBSA, solución salina tamponada con fosfato (PBS) más albúmina de suero bovino al 1 % (BSA). Cada código de perla se incubó por separado con 100 ul de un anticuerpo anti-ST2 de dilución 1:10 (anticuerpo de recubrimiento) durante 1 hora y después se lavó. Las perlas se agruparon y después se dispensaron en una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore, n.º MSBVN1250). Se añadieron 100 ul de 2 ug/ml de ST2 a la mitad de los pocillos y tampón a la otra mitad y se incubaron durante 1 hora y después se lavaron. Se añadieron 100 ul de un anticuerpo anti-ST2 de dilución 1:10 (Ac de detección) a un pocillo con ST2 y un pocillo sin ST2, se incubaron durante 1 hora y después se lavaron. Se ejecutaron como controles negativos, una IgG humana irrelevante (Jackson, n.º 009-000-003) así como una condición sin anticuerpos (blanco). Se añadieron 20 µl de anti-IgG humana de ratón monovalente conjugada con PE (BD Pharmingen, n.º 555787) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora y después se lavaron. Las perlas se resuspendieron en 75 ul de PBSA y se recogieron al menos 100 eventos/código de perlas en el instrumento BioPlex (BioRad).

La intensidad de fluorescencia media (MFI, por sus siglas en inglés) del par de anticuerpos sin ST2 se restó de la señal de la reacción correspondiente que contenía ST2. Para que el par de anticuerpos se considere unido simultáneamente y, por lo tanto, en diferentes bins, el valor de la reacción tenía que cumplir dos criterios: 1) los valores tenían que ser 2 veces mayores que el anticuerpo de recubrimiento emparejado consigo mismo, con el irrelevante o con el blanco, cualquiera que fuera más alto, y 2) los valores tenían que ser mayores que la señal del anticuerpo de detección presente con la perla recubierta con el irrelevante o en blanco. Se encontró un mínimo de tres bins como se muestra en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

Bin	Anticuerpo
Bin 1	Ab23
	Ab17
	Ab24
	Ab25
	Ab12
	Ab36
	Ab14
	Ab18
	Ab19
	Ab20
	Ab33
	Ab34
	Ab1
	Ab7
	Ab3
	Ab15
	Ab16
	Ab27
	Ab5
	Ab2
	Ab8
	Ab13
	Ab30
	Ab35
	Ab28

Bin	Anticuerpo
Bin 2	Ab9
	Ab10
	Ab11
Bin 3	Ab29

EJEMPLO 6: Ensayos de Bloqueo de IL-33

El mecanismo de acción de los anticuerpos de ST2 se exploró utilizando dos AlphaScreen. En combinación, los ensayos se utilizaron para determinar si los anticuerpos podrían inhibir la asociación de IL-33 con ST2 o, por el contrario, si los anticuerpos podrían bloquear específicamente la asociación de los correceptores ST2 y AcP mientras

aún permitían que IL-33 se asociara con ST2. AlphaScreen es un acrónimo de Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay screen.

En la primera exploración, se evaluaron los anticuerpos para determinar la capacidad para bloquear una asociación entre IL-33 y ST2. Este ensayo midió la capacidad de los anticuerpos anti-ST2 para bloquear la asociación de IL-33 humana biotinilada (junto con una perla donante de estreptavidina) con ST2 humana etiquetada con 6xhistidina (acoplada con una perla aceptora de quelato de Ni). El AlphaScreen de IL-33/ST2 se llevó a cabo usando reacciones de 40 µl en una placa de zona media de 96 pocillos (Perkin Elmer). El tampón de ensayo que se utilizó para ambos AlphaScreen contenía HEPES 40 mM (pH = 7,4), CaCl₂ 1 mM, BSA al 0,1 %, Tween-20 al 0,05 % y NaCl 100 mM. Cada pocillo de ensayo contenía IL-33 humana biotinilada 0,3 nM, ST2-FH humana 0,3 nM (FH significa etiquetas FLAG y 6xHistidina), perlas donantes recubiertas con estreptavidina 10 µg/ml (Perkin Elmer, Waltham, MA), 10 µg/ml de perlasceptoras recubiertas de quelato de Ni (Perkin Elmer) y 12,5 µg/ml de un Ac anti-ST2. Después de la adición de todos los componentes del ensayo, las placas se incubaron durante la noche en la oscuridad a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas se leyeron en un lector de etiquetas múltiples Envision 2103 (Perkin Elmer). Se utilizó la excitación láser de las perlas donantes a 680 nm para generar oxígeno reactivo que podría iniciar una cascada luminiscente/fluorescente en las perlasceptoras que estaban muy próximas debido a la interacción de las proteínas acopladas a las perlas, dando como resultado la emisión de luz que se detectó en 570 nm.

En el segundo ensayo, se evaluaron los anticuerpos para determinar la capacidad para inhibir la asociación de ST2 mediada por IL-33 con el correceptor AcP. Este ensayo midió la capacidad de los anticuerpos anti-ST2 para bloquear la asociación mediada por IL-33 de ST2-Fc humano biotinilado (junto con una perla donante de estreptavidina) con AcP humana etiquetada con 6xhistidina (acoplada con una perla aceptora de quelato de Ni). El AlphaScreen de ST2/AcP se realizó en reacciones de 8 µl en una placa óptica de 384 pocillos (Perkin Elmer). Cada pocillo de ensayo contenía IL-33 humana 5 nM, ST2-Fc humano biotinilado 5 nM, AcP-FH humana 5 nM, perlas donantes recubiertas con estreptavidina 10 µg/ml, 10 µg/ml de perlasceptoras recubiertas de quelato de Ni y 12,5 µg/ml de un Ac anti-ST2. Después de la adición de todos los componentes del ensayo, las placas se incubaron durante la noche en la oscuridad a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas se leyeron en un lector de etiquetas múltiples 2103 Envision (Perkin Elmer) usando los mismos parámetros que antes para el primer ensayo.

Los resultados de las dos AlphaScreen se presentan en la Tabla 8 a continuación. La inhibición de cada anticuerpo se presenta como el porcentaje de inhibición de la señal en el AlphaScreen usando un anticuerpo dado a una concentración de 12,5 µg/ml con respecto a la señal en el ensayo cuando no se incluyó ningún anticuerpo en el pocillo del ensayo. Algunos anticuerpos inhibieron la interacción ST2 e IL-33 más completamente de lo que inhibieron la interacción ST2/IL-33/AcP y algunos anticuerpos inhibieron la interacción ST2/IL-33/AcP más completamente que la interacción ST2 e IL-33. Todos los anticuerpos inhibieron la interacción de IL-33 con ST2 en al menos un 50 %.

Tabla 8

Nombre	% de inhib de ST2-IL33 AS 12,5µg/ml	% de inhib de ST2-AcP AS 12,5µg/ml
Ab6	98,5	71,2
Ab4	98,4	77,8
Ab9	75,9	93,1
Ab10	51,8	73,2
Ab1	98,1	86,9
Ab7	98,9	75,7
Ab3	98,8	68,7
Ab11	75,8	93,6
Ab5	96,3	33,8
Ab2	99,2	96,4

EJEMPLO 7: Bioensayo de IL-33 humana *in vitro*

Se probaron mAb humanos de ST2 a modo de ejemplo en un bioensayo humano utilizando linfocitos T CD4⁺ purificados obtenidas de varios donantes estimulados con IL-33 humana e IL-2 humana. El procedimiento para el ensayo es el siguiente. Las células se siembran a razón de 250.000 células por pocillo en un volumen de 60 µl en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Después de la incubación previa, añadir 30 µl de mezcla 4x de huIL-2 + huIL-33 a cada pocillo. El volumen total en la placa de fondo redondo de 96 pocillos es de 120 µl. Iniciar los anticuerpos a 20 µg/ml y realizar diluciones 1:3 para generar una curva de 10 puntos. Hacer 4x en 30 µl. Después de la incubación previa de Ac con células, añadir 30 µl de mezcla 4x de huIL-2 + huIL-33 a cada pocillo. 37 °C, CO₂ al 5 % durante 48 horas. Recoger los sobrenadantes. Analizar la inhibición de IL-5 mediante ELISA de huIL-5.

La Figura 3 muestra mAb de ST2 en la inhibición de la producción de IL-5 inducida por IL-33 humana a partir de linfocitos T CD4⁺ de varios donantes. La línea (-) representa el valor de control positivo de IL-33 humana en combinación con IL-2 humana sin inhibición. El (+++) representa el valor de control positivo de IL-2 humana. La línea (--) representa el valor de control mediana. Se incubaron previamente linfocitos T CD4⁺ humanos durante 30 minutos

con mAb anti-ST2 y después se estimularon durante 48 horas con IL-33 humana (4 ng/ml) e IL-2 humana (10 ng/ml). La FIG 3 muestra que los anticuerpos de ST2 son capaces de inhibir la activación de ST2 inducida por IL-33 humana, como se determina por la producción de IL-5 a partir de linfocitos T CD4+. Los anticuerpos de ST2 fueron capaces de antagonizar la producción de IL-5 inducida por IL-33 a partir de linfocitos T CD4+ con CI50 de aproximadamente < 100 nM. La Tabla 9 muestra valores de CI50 representativos.

Tabla 9

Ac	CI50 (nM)
2	5,25
8	6,90
10	6,90
1	10,68
9	62,01
5	64,54
11	479,86

EJEMPLO 8: Ensayo de liberación de IFN γ de linfocitos T CD4+ de mono Cynomolgus

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de mono cynomolgus se enriquecieron a partir de sangre periférica de donante normal tratada con ácido citrato dextrosa (ACD) mediante centrifugación en gradiente ISOLYMPH (Gallard-Schlesinger Industries, Plainview, NY). El aislamiento posterior de linfocitos T CD4+ de mono cynomolgus se realizó usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4+ de mono cynomolgus de Miltenyi Biotec. Los linfocitos T CD4+ cyno aislados (2×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos) se incubaron con anticuerpos monoclonales purificados a diversas concentraciones durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se estimularon con IL-33 (10 ng/ml), IL-2 (10 ng/ml) e IL-12p70 (50 ng/ml) durante ochenta y cuatro horas. Los sobrenadantes del cultivo de linfocitos T CD4+ de mono cynomolgus sin células resultantes se analizaron después para determinar la presencia de IFN γ de mono cynomolgus mediante ELISA (los datos de ejemplo se proporcionan en la Tabla 10). La potencia de los anticuerpos monoclonales purificados se determinó en el ensayo de liberación de IFN γ de linfocitos T CD4+ de mono cynomolgus de tres donantes por separado.

Tabla 10

Valores de CI-50	pM
Ab1	15,82
Ab2	79,5
Ab3	15,15
Ab4	4,03
Ab5	12,9
Ab6	47,1
Ab7	40,01
Ab8	158,07

EJEMPLO 9: Ensayo de Liberación de IL-8 de Eosinófilos Humanos

Los eritrocitos y granulocitos humanos se enriquecieron a partir de sangre periférica de donante normales, heparinizados mediante centrifugación en gradiente ISOLYMPH (Gallard-Schlesinger Industries, Plainview, NY). Los eritrocitos se eliminaron utilizando tampón de lisis ACK (Gibco, Carlsbad, CA). El posterior aislamiento de eosinófilos se realizó utilizando el kit de aislamiento de eosinófilos de Miltenyi Biotec. Se incubaron los eosinófilos aislados (2×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos) con sobrenadantes no clonales o clonales a varias diluciones, o anticuerpos monoclonales purificados a varias concentraciones durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se estimularon con IL-33 (2 ng/ml) e IL-3 (100 ng/ml) durante tres días. Los sobrenadantes de cultivo de eosinófilos sin células resultantes se analizaron después para determinar la presencia de IL-8 mediante ELISA. Los datos de ejemplo se muestran en la Tabla 11. La potencia de los anticuerpos monoclonales purificados se determinó en el ensayo de liberación de IL-8 de eosinófilos de tres donantes por separado.

Tabla 11

CI-50	
	pM
Ab1	51,45
Ab2	52,75
Ab3	50,38
Ab4	14,12
Ab5	73,27
Ab6	63,02
Ab7	40,68
Ab8	3120

EJEMPLO 10: Potencia del Anticuerpo anti-ST2 en Comparación con la Respuesta a la Dosis de IL-33 humana de Anticuerpos Disponibles Comercialmente en el ensayo de células NK humanas

Se trataron células NK humanas CD56 positivas primarias (5×10^4 células) con IL-12 humana (1 ng/ml) más cantidades crecientes de IL-33 humana, como se muestra en la FIG. 4. Veintidós horas después, se recogieron los sobrenadantes sin células y se midió la concentración de IFN- γ utilizando un ensayo comercial (R&D Systems). Se utilizaron 10 ng/ml de IL-33 como dosis de estimulación para la inhibición del anticuerpo de ST2.

Inhibición de la Actividad de IL-33 por Anticuerpos

Las células NK humanas se estimularon como antes. Treinta minutos antes de la adición de IL-33 e IL-12, los anticuerpos de ST2 se añadieron a las células a las concentraciones como se indica en la FIG. 5. Veintidós horas después del tratamiento con IL-33, se recogieron los sobrenadantes sin células y se midió la concentración de IFN- γ utilizando un ensayo comercial (R&D Systems). Los nombres de los clones se indican para los anticuerpos disponibles comercialmente. Solo Ab2 inhibió completamente la respuesta de IFN- γ dependiente de IL-33 y fue significativamente más potente que cualquiera de los anticuerpos de huST2 disponibles comercialmente. El valor de CI50 correspondiente a cada anticuerpo se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12

Anticuerpo	CI50 (ug/ml)
2A5	~ 608
HB12	7,700
B4E6	~ 43,54
FB9	~ 498,4
97203	0,3851
Ab2	0,04123

EJEMPLO 11: Mutagénesis de ST2 por Barrido de Alanina/Arginina

Este ejemplo caracteriza los anticuerpos de ST2 basándose en el efecto de la mutagénesis de ST2 sobre su capacidad para unirse a la diana. Los datos de unión anteriores indicaron que los dominios 1 y 2 de ST2 son los principales responsables de la unión a anticuerpos para el panel de anticuerpos analizados mediante mutagénesis por barrido de ST2 en este Ejemplo. Como tal, solo los dominios 1 y 2 (D1D2) de ST2 se consideraron estructuralmente en el contexto de ST2 de longitud completa en los diseños de sitios de mutación.

Las coordenadas del modelo del complejo ST2 e IL-33 se obtuvieron de Lingel et al., Structure (London, England: 1993). Elsevier Ltd 17, 1398-410. La accesibilidad a los disolventes de la cadena lateral por resto de ST2 se calculó en el Entorno Operativo Molecular (Molecular Operating Environment (MOE), 2011,10; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite n.º 910, Montreal, QC, Canadá, H3A 2R7, 2011.). Estos valores de accesibilidad a los disolventes se utilizaron después en la selección de restos de la superficie de D1D2 para mutagénesis seleccionando primero todos los restos de D1D2 con exposiciones de cadena lateral de al menos $10 \text{ \AA}^2$ o restos de glicina con exposiciones totales de al menos $10 \text{ \AA}^2$. Se eliminaron los restos de glicina con un ángulo Phi positivo, como eran los restos de prolina, debido a que las mutaciones en tales posiciones tienen una mayor probabilidad de distorsionar la estructura de la proteína local. Los restos de cisteína también se eliminaron de la selección para mantener los enlaces disulfuro. El resto A82 se eliminó después de una inspección visual. Este método produjo una lista de 140 restos para mutagénesis. Todos los restos se mutaron a arginina excepto los restos de arginina y lisina, que se mutaron a alanina.

Todas las construcciones mutantes del dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de ST2 etiquetado con His-Avi precursor, en el vector pTT5, se expresaron en células 293-6E en suspensión transfectadas transitoriamente (NRCC) en placas de 24 pocillos. La biotinilación in vivo se logró mediante cotransfección de Bir A en el vector pTT5. Los sobrenadantes se dializaron con PBS para eliminar el exceso de biotina.

El ensayo de unión BioPlex se utiliza para medir la unión de anticuerpos anti-ST2 a mutaciones puntuales de ST2. Los mutantes biotinilados se unieron a 80 códigos de perlas de perlas recubiertas con estreptavidina (Luminex, n.º L100-L1XX-01, XX especifica el código de la perla). Los 80 códigos de perlas permitieron la multiplexación de dos conjuntos de 70 mutantes para un total de 140. Cada juego incluía 6 controles precursores, 3 controles de proteínas irrelevantes y 1 en blanco. La unión del anticuerpo a la proteína mutante se comparó con la unión del anticuerpo a la proteína precursora.

100 µl de una dilución 1:7 de los mutantes de ST2, precursores y controles o sin proteína previamente unida a las perlas se lavaron 5X con PBS + BSA al 1 %, se agruparon y dividieron en alícuotas en una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore) y después se lavaron nuevamente. Se añadieron 100 µl de anticuerpos anti-ST2 en diluciones triples a pocillos por triplicado, se incubaron durante 1 hora a TA y se lavaron. Se añadieron 100 µl de una dilución 1:500 de Fc anti-IgG humana conjugada con PE (Jackson, n.º 109-116-170) a cada pocillo, se incubaron durante 0,5 horas y se lavaron. Las perlas se resuspendieron en 75 µl, se agitaron durante al menos 3 minutos y se leyeron en el BioPlex.

Antes de ejecutar el ensayo de unión, se llevó a cabo un experimento de validación para evaluar la variabilidad de "región de perla" a "región de perla" (B-B). En el experimento de validación, todas las perlas se conjugaron con la misma proteína de control de tipo silvestre. Por lo tanto, la diferencia entre las regiones de perlas se debió exclusivamente a la variación BB y no se confundió por la diferencia entre las proteínas de tipo silvestre y mutantes. La titulación de anticuerpos se realizó con doce repeticiones en diferentes pocillos.

El objetivo de este análisis estadístico fue estimar la variabilidad BB de la CE50 estimada de las curvas de unión. La desviación estándar (DE) estimada de BB se usó después para construir los intervalos de confianza de CE50 de las proteínas de tipo silvestre y mutantes durante los experimentos de comparación de curvas.

Se ajustó un modelo logístico de cuatro parámetros a los datos de unión para cada región de perlas. El archivo "sumout.xls" resultante, que contenía resultados de control de calidad (QC, por sus siglas en inglés) de la curva y estimaciones de parámetros para la parte superior (máx.), inferior (mín.), ladera (pendiente) y logaritmo natural de CE50 (xmid) de las curvas, se utilizó como datos sin procesar para el análisis. Después se estimó la variabilidad de BB para cada parámetro ajustando el modelo de efectos mixtos usando el procedimiento SAS PROC MIXED. Solo se incluyeron en el análisis las curvas con un estado de QC "bueno". El modelo final de efectos mixtos incluía solo el residual (es decir, regiones de perlas individuales) como efecto aleatorio. Las medias de mínimos cuadrados (LS-media) para cada parámetro también se estimaron mediante el modelo de efectos mixtos. La DE de B-B se calculó tomando la raíz cuadrada de la varianza de B-B. También se calculó el factor de cambio entre LS-media + 2DE y LS-media - 2DE, que representan aproximadamente el percentil 97,5 superior e inferior de la población.

Para identificar mutantes que no produjeran mucha respuesta en relación con el control de TS, para cada anticuerpo, los mutantes donde los máx (MFI) son menos del 30 % del máx (MFI) para el control de TS se identifican y señalan como Hitmax.

Se compararon las CE50 de las curvas de unión de mutantes y las curvas de unión de tipo silvestre. Las diferencias estadísticamente significativas se identificaron como resultados para una mayor consideración. Las curvas con banderas "nofit" o "badfit" se excluyeron de este análisis.

Se consideran dos fuentes de variaciones en la comparación de las estimaciones de EC50, la variación del ajuste de la curva y la variación de perla-perla. Los tipos silvestres y mutantes se unieron a diferentes perlas, de ahí que su diferencia se confunda con la diferencia perla-perla. La variación del ajuste de la curva se estima mediante el error estándar de las estimaciones del log de CE50. La variación perla-perla se determina experimentalmente usando un experimento en el que se unieron controles de tipo silvestre a cada una de las perlas. La variación de perlas en las estimaciones de CE50 de la curva de unión de tipo silvestre de este experimento se usa para estimar la variación perla-perla en el experimento de mapeo real.

Las comparaciones de dos CE50 (en escala logarítmica) se realizan utilizando la prueba t de Student. Un estadístico t se calcula como la relación entre delta (las diferencias absolutas entre las estimaciones de CE50) y la desviación estándar de delta. La varianza de delta se estima mediante la suma de los tres componentes, varianza estimada de la CE50 para las curvas de mutantes y de tipo silvestre en la regresión no lineal y dos veces la varianza perla-perla estimada a partir de un experimento por separado. El múltiplo de dos para la varianza perla-perla se debe al supuesto de que tanto las perlas mutantes como las de tipo silvestre tienen la misma varianza.

El grado de libertad de la desviación estándar de delta se calculó utilizando la aproximación de Satterthwaite (1946).

Los valores p individuales y los intervalos de confianza (95 % y 99 %) derivaron basándose en la distribución t de Student para cada comparación.

En el caso de múltiples controles de tipo silvestre, se adoptó un enfoque conservador eligiendo el control de tipo silvestre que era más similar al mutante, es decir, eligiendo los que tienen los valores p más grandes.

Los ajustes de multiplicidad son importantes para controlar el falso positivo mientras se realizan una gran cantidad de pruebas simultáneamente. Se implementaron dos formas de ajuste de multiplicidad para este análisis: control de error familiar (FWE, por sus siglas en inglés) y control de tasa de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés). El enfoque de FWE controla la probabilidad de que uno o más resultados no sean reales; el enfoque de FDR controla la proporción esperada de positivos falsos entre los resultados seleccionados. El primer enfoque es más conservador y menos poderoso que el segundo. Hay muchos métodos disponibles para ambos enfoques, para este análisis, se eligió el método de Hochberg (1988) para el análisis de FWE y el método FDR de Benjamini-Hochberg (1995) para el análisis FDR. Los valores p ajustados para ambos enfoques se calculan para cada anticuerpo o para todo el ensayo.

Se seleccionó un mutante por tener un efecto de acuerdo con los siguientes criterios si: 1) se devolvió un mal ajuste o ningún resultado de ajuste para ese mutante, 2) el mutante se seleccionó para el criterio hitmax, 3) el valor P del error familiar fue menor que 0,01, o 4) el valor Bmax fue mayor que 200 % de los precursores. Se designó un resultado como inhibidor si el efecto reducía Bmax o aumentaba el valor de CE50, se designó un resultado como activador si aumentaba Bmax o disminuía el valor de CE50. Se excluyeron 8 mutaciones de la lista de resultados debido a su efecto en > 90 % de los anticuerpos probados, son: K37A, R46A, D63R, V71R, G106R, K112A, N132R, Q137R e Y141R.

Los resultados del análisis se proporcionan en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13

Ac	Bin	Mutantes inhibidores	Mutantes activadores
	1	L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R, V176R	L53R, R72A, S73R
Ab3	1	S3R, E10R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, F76R, T79R, D92R, D97R, V104R, T124R, K131A, Q134R, G138R, F147R, V176R, V184R	D29R, L53R, V61R, R72A, T162R
Ab32	1	S3R, I15R, Y32R, S33R, E43R, V47R, S50R, K55A, A62R, G65R, T79R, D92R, V95R, D97R, V104R, E128R, Q134R, G138R, S146R, F147R, V176R	D29R, R72A
Ab33	1	S3R, I15R, Y32R, S33R, T35R, E43R, V47R, S50R, K55A, A62R, G65R, T79R, D92R, V95R, D97R, V104R, E128R, Q134R, G138R, S146R, F147R, N152R, V176R	D29R, R72A
Ab30	1	S3R, L14R, Y26R, S33R, T35R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, V104R, G138R, A143R, F147R, N152R, V176R, V184R	R72A
Ab11	2	S50R, S175R	W7R, E10R, L14R, Q21R, E43R, T79R, N110R, T177R, V184R, K185A
Ab10	2	A49R, S50R, I70R, S175R, S181R	K4A, Q5R, W7R, E10R, L14R, I15R, Q21R, Y26R, E43R, T79R, M100R, K109A, N110R, T124R, K145A, T177R, V184R, K185A
Ab29	3	N11R, V47R, S50R, Y67R, N83R, V104R, L120R, G138R, S139R, S146R, F147R, A172R	

Tabla 14

Ac	Mutantes sin efecto
Ab2	K1A, F2R, S3R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, F12R, A13R, V16R, R17A, E26A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, Q34R, T35R, N136R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, K53A, L57R, F60R, V61R, S64R, J66R, Y67R, T62R, F70R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K28A, K89A, Q90R, S91R, N94R, Y95R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, F131A, Q134R, A135R, N139R, R140A, E142A, A143R, H144R, K145A, S146R, F147R, V149R, D151R, M154R, T155R, F156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R

(continuación)

Ac	Mutantes sin efecto
Ab3	K1A,F2R,K4A,Q5R,S6R,W7R,L9R,N11R,E12R,A13R,L14R,V16R,R17A,R20A,Q21R,K23A,S25R,Y26R,V28R,Y31R,Y32R,Q34R,T35R,N36R,S38R,T41R,Q42R,R44A,N45R,A49R,S50R,G51R,Q52R,K55A,L57R,E60R,S64R,I66R,Y67R,T68R,I70R,S73R,T75R,N77R,R78A,G80R,Y81R,N83R,T85R,Y87R,K88A,K89A,Q90R,S91R,N94R,V95R,Y98R,M100R,Y101R,S102R,T103R,S107R,E108R,K109A,N110R,Y114R,T117R,D119R,L120R,Y121R,N122R,W123R,E128R,F130R,A135R,S139R,R140A,R142A,A143R,H144R,K145A,S146R,V149R,D151R,N152R,M154R,T155R,E156R,A158R,D160R,K164A,I166R,H167R,N168R,N170R,A172R,N173R,Y174R,S175R,T177R,R180A,S181R,T183R,K185A,D186R,E187R
Ab32	K1A,F2R,K4A,Q5R,S6R,W7R,L9R,E10R,N11R,E12R,A13R,L14R,V16R,R17A,R20A,Q21R,K23A,S25R,Y26R,V28R,Y31R,Q34R,T35R,N36R,S38R,T41R,Q42R,R44A,N45R,A49R,G51R,Q52R,L53R,L57R,E60R,V61R,S64R,I66R,Y67R,T68R,I70R,S73R,T75R,F76R,N77R,R78A,G80R,Y81R,N83R,T85R,Y87R,K88A,E89A,Q90R,S91R,N94R,V95R,Y98R,M100R,Y101R,S102R,T103R,S107R,E108R,K109A,N110R,Y114R,T117R,D119R,L120R,Y121R,A122R,W123R,T124R,F130R,K131A,A135R,S139R,R140A,R142A,A143R,H144R,K145A,V149R,D151R,N152R,M154R,T155R,E156R,A158R,D160R,T162R,K164A,I166R,H167R,N168R,N170R,A172R,N173R,Y174R,S175R,T177R,R180A,S181R,T183R,V184R,K185A,D186R,E187R
Ab33	K1A,F2R,K4A,Q5R,S6R,W7R,L9R,E10R,N11R,E12R,A13R,L14R,V16R,R17A,R20A,Q21R,K23A,S25R,Y26R,V28R,Y31R,Q34R,N36R,S38R,T41R,Q42R,R44A,N45R,A49R,G51R,Q52R,L53R,L57R,E60R,V61R,S64R,I66R,Y67R,T68R,I70R,S73R,T75R,F76R,N77R,R78A,G80R,Y81R,N83R,T85R,Y87R,K88A,K89A,Q90R,S91R,N94R,Y98R,M100R,Y101R,S102R,T103R,S107R,E108R,K109A,N110R,Y114R,T117R,D119R,L120R,Y121R,N122R,W123R,T124R,F130R,K131A,A135R,S139R,R140A,R142A,A143R,H144R,K145A,V149R,D151R,M154R,T155R,E156R,A158R,D160R,T162R,K164A,I166R,H167R,N168R,N170R,A172R,N173R,Y174R,S175R,T177R,R180A,S181R,T183R,V184R,K185A,D186R,E187R
Ab30	K1A,F2R,K4A,Q5R,S6R,W7R,L9R,E10R,N11R,E12R,A13R,I15R,V16R,R17A,K20A,Q21R,K23A,S25R,V28R,D29R,Y31R,Y32R,Q34R,N36R,S38R,T41R,Q42R,R44A,N45R,A49R,S50R,G51R,Q52R,L53R,K55A,L57R,E60R,V61R,S64R,I66R,Y67R,T68R,I70R,S73R,T75R,F76R,N77R,R78A,G80R,Y81R,N83R,T85R,Y87R,K88A,E89A,Q90R,S91R,N94R,V95R,D97R,Y98R,M100R,Y101R,S102R,T103R,S107R,E108R,K109A,N110R,Y114R,T117R,D119R,L120R,Y121R,N122R,W123R,T124R,E128R,F130R,K131A,Q134R,A135R,S139R,R140A,R142A,H144R,K145A,S146R,V149R,D151R,M154R,T155R,E156R,A158R,D160R,T162R,K164A,I166R,H167R,N168R,N170R,A172R,N173R,Y174R,S175R,T177R,R180A,S181R,T183R,K185A,D186R,E187R
Ab11	K1A,F2R,S3R,K4A,Q5R,S6R,L9R,N11R,E12R,A13R,I15R,V16R,R17A,K20A,K23A,S25R,Y26R,V28R,D29R,Y31R,Y32R,S33R,Q34R,T35R,N36R,S38R,T41R,Q42R,R44A,N45R,V47R,A49R,G51R,Q52R,L53R,K55A,L57R,E60R,V61R,A62R,S64R,G65R,I66R,Y67R,T68R,I70R,R72A,S73R,T75R,F76R,N77R,R78A,G80R,Y81R,N83R,T85R,Y87R,K88A,K89A,Q90R,S91R,D92R,N94R,V95R,D97R,Y98R,M100R,Y101R,S102R,T103R,V104R,S107R,E108R,K109A,Y114R,T117R,D119R,L120R,Y121R,N122R,W123R,T124R,E128R,F130R,K131A,Q134R,A135R,G138R,S139R,R140A,R142A,A143R,H144R,K145A,S146R,F147R,V149R,D151R,N152R,M154R,T155R,E156R,A158R,D160R,T162R,K164A,I166R,H167R,N168R,N170R,A172R,N173R,Y174R,V176R,R180A,S181R,T183R,D186R,E187R
Ab10	K1A,F2R,S3R,S6R,L9R,N11R,E12R,A13R,V16R,R17A,K20A,K23A,S25R,V28R,D29R,Y31R,Y32R,S33R,Q34R,T35R,N36R,S38R,T41R,Q42R,R44A,N45R,V47R,G51R,Q52R,L53R,K55A,L57R,E60R,V61R,A62R,S64R,G65R,I66R,Y67R,T68R,I70R,R72A,S73R,T75R,F76R,N77R,R78A,G80R,Y81R,N83R,T85R,Y87R,K88A,E89A,Q90R,S91R,D92R,N94R,V95R,D97R,Y98R,Y101R,S102R,T103R,V104R,S107R,E108R,Y114R,T117R,D119R,L120R,Y121R,N122R,W123R,E128R,F130R,K131A,Q134R,A135R,G138R,S139R,R140A,R142A,A143R,H144R,S146R,F147R,V149R,D151R,N152R,M154R,T155R,E156R,A158R,D160R,T162R,K164A,I166R,H167R,N168R,A172R,N173R,Y174R,V176R,R180A,S181R,T183R,D186R,E187R
Ab29	K1A,F2R,S3R,K4A,Q5R,S6R,W7R,L9R,E10R,E12R,A13R,L14R,I15R,V16R,R17A,R20A,Q21R,K23A,S25R,Y26R,V28R,D29R,Y31R,Y32R,S33R,Q34R,T35R,N36R,S38R,T41R,Q42R,E43R,R44A,N45R,A49R,G51R,Q52R,L53R,K55A,L57R,E60R,V61R,A62R,S64R,G65R,I66R,T68R,I70R,R72A,S73R,T75R,F76R,N77R,R78A,T79R,G80R,Y81R,T85R,Y87R,K88A,K89A,Q90R,S91R,D92R,N94R,V95R,D97R,Y98R,M100R,Y101R,S102R,T103R,S107R,E108R,K109A,N110R,Y114R,T117R,D119R,Y121R,N122R,W123R,T124R,E128R,F130R,K131A,Q134R,A135R,R140A,R142A,A143R,H144R,K145A,V149R,D151R,N152R,M154R,T155R,E156R,A158R,D160R,T162R,K164A,I166R,H167R,N168R,N170R,A172R,N173R,Y174R,S175R,V176R,T177R,R180A,S181R,T183R,V184R,K185A,D186R,E187R

EJEMPLO 12: Análisis de Intercambio de Hidrógeno/Deuterio (HDX)

- 5 En este Ejemplo, Ab2 se unió a ST2 y se determinó el efecto de unión sobre HDX.

La proteína ST2 soluble (dominios 1-3 que contienen los aminoácidos 19-322 del SEQ ID NO: 1) con tanto etiqueta FLAG como etiqueta His en el extremo C se expresó transitoriamente en células 293-6E de mamífero y se purificó con IMAC (por sus siglas en inglés) (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados) y se purificó adicionalmente mediante SEC (por sus siglas en inglés) preparativa (cromatografía de exclusión por tamaño). Después, la proteína se concentró a 3,5 mg/ml usando ultrafiltración. El anticuerpo Ab2 de ST2 se expresó en células CHO-CS9 manipuladas y se purificó con cromatografía por afinidad con proteína A seguida de SEC preparativa. Se usó SEC analítico para determinar que una relación molar de anticuerpo:antígeno de 0,75:1,00 era óptima para asegurar que la proteína ST2 está totalmente unida al anticuerpo. Tanto la proteína ST2 libre como el complejo antígeno-anticuerpo se almacenaron en tampón PBS, pH 7,2.

El experimento HDX se realizó en un sistema HDX automatizado (Zhang, Zhang et al. 2012). Brevemente, el proceso de intercambio de H/D comienza con la dilución de 5 ul de la solución de proteína ST2 libre (3,5 mg/ml) o del complejo

de anticuerpos de ST2 (con una concentración de jST2 de 3,5 mg/ml, relación antígeno:anticuerpo de 1:0,75) en 25 µl de tampón D₂O en PBS 100 mM, pH 7,2, que se preparó disolviendo el comprimido de PBS en agua con D₂O, a 25 °C. Se dejó que la reacción de intercambio se incubase durante varios tiempos de marcado (30 segundos, 2, 8, 30 min y 2, 8 horas) para cada experimento HDX, y la reacción de marcado se desactivó mezclando 20 µl de solución de marcado con 80 µl de tampón de desactivación/desnaturalización/reducción (urea 7,25 M y tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP, por sus siglas en inglés) 625 mM, glicina 0,45 M, pH 2,7) a 1 °C.

Se transfirió una alícuota de 40 µl de solución desactivada a 120 µl de solución de pepsina porcina 0,4 mg/ml (Sigma, St. Louis, MO). La solución de digestión se inyectó inmediatamente en un circuito de muestra a 1 °C y se mantuvo durante 6 minutos para una digestión completa. Adicionalmente, el producto de digestión se separó por columnas C18 (3 columnas en serie, BEH C18, 2,1 mm x 5 mm, Waters Corp., Milford, MA). La separación por HPLC se realizó a 1 °C con un gradiente de ACN de 5 min de 1-40 %. El eluyente de LC se analizó mediante un espectrómetro de masas Orbitrap Elite (Thermo Scientific, San José, CA) en un experimento LC-MS/MS dependiente de datos.

Se realizó el marcado con deuterio, desactivación, digestión proteolítica e inyección en un sistema LEAP HD-X PAL controlado por envolturas LEAP (LEAP Technologies, Carrboro, Carolina del Norte).

Los experimentos se repitieron tres veces y en cada experimento, cada punto temporal se repitió dos veces. Se añadió una mezcla de péptidos patrón a las muestras para rastrear y corregir la variabilidad del intercambio inverso. La mezcla contiene estos tres péptidos: bradiquinina, angiotensina I y encefalina de leucina. Un tetrapéptido PPPI especialmente diseñado (sintetizado por AnaSpec, Fremont, CA) se utilizó como segundo patrón interno para minimizar la variabilidad de ejecución a ejecución. También se analizó como control el producto de digestión de proteína ST2 sin intercambio H/D.

Los archivos de datos resultantes se procesaron con el programa MassAnalyzer (Zhang, Zhang et al. 2012). El software identifica péptidos de la digestión de antígenos, calcula la tasa de intercambio de cada péptido, corrige la información de intercambio inverso obtenida de los patrones internos y ajusta los datos en un modelo que brinda factores de protección a cada resto.

La comparación de los perfiles de intercambio entre ST2 libre y la proteína ST2 unida al anticuerpo reveló dos regiones de interés y podría ser el posible epítipo. Las dos regiones en la secuencia de ST2 se refinaron a IVRCPRQGKPSY (aminoácidos 33-44 del SEQ ID NO: 1 correspondientes a los aminoácidos 15-26 de ST2 maduro) y IVRSPTF (aminoácidos 88-94 del SEQ ID NO: 1 correspondientes a aminoácidos 70-76 de ST2 maduro) mediante múltiples péptidos solapantes. Estas regiones estaban menos protegidas cuando ST2 está en estado libre, mientras que la tasa de intercambio disminuye drásticamente tras la unión de ST2 y el anticuerpo. Adicionalmente, basándose en el modelo de estructura de homología de ST2 mostrado en la Figura 6, estos dos tramos de secuencia ocupan ubicaciones espaciales similares en la superficie exterior de la proteína. Estos resultados llevan a la conclusión de que los dos péptidos están implicados en la unión entre Ab2 y la proteína ST2.

EJEMPLO 13: Cristalografía de rayos X

En este Ejemplo, la estructura cristalina del complejo de un fragmento sc-dsFv de Ab2 y ST2 proporciona los restos de aminoácidos específicos en la interfaz de interacción.

sc-dsFv de Ab2 se expresó en células BL21(DE3)Star. Brevemente, el sc-dsFv de Ab2 contiene el dominio variable de cadena pesada conectado al dominio variable de cadena ligera por un enlazador (G₄S)₃. Para estabilizar adicionalmente la molécula, se modificó por ingeniería un enlace disulfuro en la molécula mediante la mutación a la posición 44 de la cisteína de la región variable de cadena pesada y la posición 101 de la región variable de cadena ligera. La proteína se expresó como un cuerpo de inclusión. El cuerpo de inclusión se solubilizó y se volvió a plegar. La proteína se purificó adicionalmente en la columna de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) y en la columna MonoQ de intercambio iónico, y después se pulió en SEC.

ST2 se expresó en células 293S. La proteína se purificó mediante una columna de afinidad por Ni y se desglicosiló con EndoH. La proteína se purificó adicionalmente en SEC.

El complejo de sc-dsFv de Ab2 y ST2 se formó mezclando sc-dsFv de Ab2 y ST2 en exceso. El complejo se purificó en SEC y se concentró a 12 mg/ml para cristalización. El complejo proteico se cristalizó en PEG400 al 32-36 % y Hepes 0,1 M, pH 7,5-8,5, a 16 °C utilizando el método de gota sentada por difusión de vapor.

Se recogió un conjunto de datos de resolución a 1,9 Å en la Fuente de Luz Avanzada, Lawrence Berkeley National Lab (Berkeley, CA). Los datos se procesaron con MOSFLM (Leslie, 1992) y se escalaron por SCALA en el paquete de programas CCP4 (Collaborative Computational Project, N.º 4. (1994)). La estructura se resolvió mediante el método de reemplazo molecular con el programa PHASER (McCoy et al., 2007) utilizando el dominio D1D2 de la estructura publicada de IL-1RII (código pdb: 3O4O) y el dominio variable de la estructura Fab de Ab2 como modelos de búsqueda. El refinamiento iterativo de la estructura y la construcción de modelos se llevaron a cabo con REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) y COOT (Emsley y Cowtan, 2004).

El análisis de la interfaz se realizó con el programa PISA, AREAMOL y NCONTACT en paquete CCP4. Las figuras se prepararon con Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System. Schrodinger).

- 5 La estructura cristalina del complejo ST2/sc-dsFv de Ab2 se resolvió a una resolución de 1,9 Å. Hay dos pares independientes de complejos ST2/sc-dsFv de Ab2 en la unidad asimétrica (Figura 7). Cada complejo consta de una molécula ST2 y un fragmento sc-dsFv de Ab2. La molécula ST2 está formada por dos dominios (dominio D1 y D2) de tipo IgG. El dominio Fv de Ab2 utiliza los seis bucles de las CDR de la cadena pesada y la cadena ligera para interactuar con la molécula ST2 (FIG. 8). Para ST2, dos bucles (bucle BC y bucle FG) y el extremo N de ST2 interactúan directamente con el anticuerpo. La superficie total accesible al disolvente internado entre ST2 y sc-dsFv de Ab2 es 1803 Å².

- 15 La interfaz entre ST2 y Ab2 está muy cargada. ST2 posee un grupo de restos básicos (Lys y Arg) en el dominio D1. Este parche de superficie con carga positiva complementa el parche con carga negativa en Ab2 formado por grupos de restos ácidos (Asp y Glu) en las regiones CDR (FIG. 9).

- 20 Se utilizaron dos métodos diferentes para definir los restos de la interfaz. En el primer método, los restos de la interfaz se definieron utilizando la diferencia de exposición al disolvente. Se calculó el área superficial accesible al disolvente de cada resto en ST2 (o sc-dsFv de Ab2) en el complejo y se comparó con el área superficial accesible al disolvente de los restos correspondientes en ST2 (o sc-dsFv de Ab2) quitados del complejo. Todos los aminoácidos con una diferencia superior al 10 % se enumeran en la Tabla 15 y la Tabla 16 para ST2 y Ab2, respectivamente. Las diferencias de exposición superficial de Arg72 y Tyr81 de ST2 son menos del 10 %. Sin embargo, la inspección de la estructura del complejo reveló que ambos restos forman enlaces de hidrógeno mediados por agua con restos de la cadena pesada de Ab2 y, por lo tanto, están incluidos en la lista.

- 25 Tabla 15. Restos de epítomos como se define por las diferencias de exposición al disolvente: ST2. Los números de resto corresponden a la posición del aminoácido en ST2 maduro, es decir, el aminoácido 1 corresponde al aminoácido 19 del SEQ ID NO: 1.

Resto	Número de resto	ASA en complejo	ASA en apo	relación	cambio porcentual (%)
LYS	1	68,5	169,9	0,348	65,2
PHE	2	48,4	106,2	0,456	54,4
PRO	19	7,9	10,8	0,731	26,9
ARG	20	0	79,6	0,000	100,0
GLN	21	81,7	98,1	0,833	16,7
GLY	22	17,8	59,3	0,300	70,0
LYS	23	51,5	130,6	0,394	60,6
TYR	26	32,4	56,6	0,572	42,8
ILE	70	16,6	30,9	0,537	46,3
VAL	71	1,7	5,3	0,321	67,9
ARG	72	52,2	56,9	0,917	8,3
SER	73	18	22,2	0,811	18,9
PRO	74	70,9	106,8	0,664	33,6
THR	75	3,8	84,6	0,045	95,5
PHE	76	0	134,3	0,000	100,0
ASN	77	2,8	47,6	0,059	94,1
ARG	78	1,1	83,6	0,013	98,7
THR	79	7	37	0,189	81,1
TYR	81	78,3	80,8	0,969	3,1
ASN77-NAG	502	148,2	249	0,595	40,5

30

Tabla 16. Restos de parátomos como se define por las diferencias de exposición al disolvente: Ab2

Resto de HC	número de resto	ASA en complejo	ASA en apo	relación	cambio porcentual
TRP	33	1,9	32,2	0,059	94,1
ILE	50	0	8,3	0,000	100,0
ASP	57	52,8	59,6	0,886	11,4
ARG	59	60,4	89,5	0,675	32,5
HIS	99	2	6,6	0,303	69,7
GLY	100	3,6	5,5	0,655	34,5
THR	101	27,5	35,9	0,766	23,4
SER	102	48,8	97,6	0,500	50,0

(continuación)

Resto de HC	número de resto	ASA en complejo	ASA en apo	relación	cambio porcentual
SER	103	45,3	111,8	0,405	59,5
ASP	104	23,1	93	0,248	75,2
TYR	105	1,9	75,4	0,025	97,5
TYR	106	36,8	64,6	0,570	43,0

Resto de LC	número de resto	ASA en complejo	ASA en apo	relación	cambio porcentual
ASP	28	85,1	105,2	0,809	19,1
SER	30	11,9	50,9	0,234	76,6
ASN	31	12,5	47,1	0,265	73,5
TYR	32	1,1	109,9	0,010	99,0
TYR	49	8,4	58,1	0,145	85,5
ASP	50	8,1	51,5	0,157	84,3
ASN	53	20,2	59,5	0,339	66,1
GLU	55	27,5	38,4	0,716	28,4
THR	56	116,9	127,4	0,918	8,2
ASP	91	2	27,4	0,073	92,7
ASP	92	2,5	54,1	0,046	95,4
ASN	93	50,5	69,5	0,727	27,3
PHE	94	54,9	110,9	0,495	50,5
LEU	96	2,9	7,8	0,372	62,8

En el segundo método, se seleccionaron restos de interfaz que tienen al menos un átomo dentro de una distancia predefinida a su proteína asociada. Se definieron dos envolturas basándose en diferente límite de distancia.

La envoltura del núcleo incluye todos los restos con una distancia de hasta 5,0 Å.

La envoltura límite incluye todos los restos con una distancia superior a 5,0 Å, pero inferior a 8,0 Å.

La lista completa de restos de aminoácidos en cada envoltura para ST2, las cadenas pesada y ligera de Ab2 se muestran en las Tablas 17, 18 y 19, respectivamente. Para los restos que forman puentes de hidrógeno o puentes de sal con su proteína asociada, el tipo de interacciones específicas se indican entre paréntesis después del resto (HB para enlace de hidrógeno y SB para puente de sal).

Tabla 17. Restos de epítomos definidos por límite de distancia: ST2. Los números de resto corresponden a la posición del aminoácido en ST2 maduro, es decir, el aminoácido 1 corresponde al aminoácido 19 del SEQ ID NO: 1.

Núcleo (0- 5 Å)	Límite (5-8 Å)
1(LYS) (HB/SB)	3(SER)
2(PHE)	4(LYS)
19(PRO)	18(CYS)
20(ARG) (HB/SB)	24(PRO)
21(GLN)	27(THR)
22(GLY)	28(VAL)
23(LYS) (HB/SB)	31(TYR)
26(TYR) (HB)	68(THR)
70(ILE)	69(CYS)
71(VAL)	80(GLY)
72(ARG)	81(TYR)
73(SER)	
74(PRO)	
75(THR) (HB)	
76(PHE)	
77(ASN) (HB)	
78(ARG) (HB/SB)	
79(THR) (HB)	
502 (NAG)-77(ASN)	

Tabla 18. Restos de parátomos definidos por límite de distancia: Cadena pesada de Ab2.

núcleo (0 - 5 Å)	límite (5 - 8 Å)
33(TRP)	31(ASN)

(continuación)

núcleo (0 - 5 Å)	límite (5 - 8 Å)
50(ILE)	32(TYR)
57(ASP)	34(ILE)
59(ARG)	47(TRP)
99(HIS)	52(TYR)
100(GLY)	55(ASN)
101(THR)	58(THR)
102(SER) (HB)	98(ARG)
103(SER) (HB)	107(GLY)
104(ASP) (HB/SB)	108(LEU)
105(TYR) (HB)	109(ASP)
106(TYR)	

Tabla 19. Restos de parátomos definidos por límite de distancia: Cadena ligera de Ab2.

núcleo (0 - 5 Å)	límite (5 - 8 Å)
28(ASP) (HB)	2(ILE)
29(ILE)	27(GLN)
30(SER)	33(LEU)
31(ASN) (HB)	34(ASN)
32(TYR)	46(LEU)
49(TYR)	52(SER)
50(ASP) (HB/SB)	54(LEU)
53(ASN)	67(SER)
55(GLU) (HB/SB)	68(GLY)
56(THR)	89(GLN)
91 (ASP) (HB/SB)	90(GLN)
92(ASP) (HB/SB)	95(PRO)
93(ASN)	96(LEU)
94(PHE)	
96(LEU)	

- 5 Los restos de epítomos que se definieron por diferencias de exposición al disolvente coinciden con los restos de los grupos de interacción del núcleo definidos por el límite de distancia. La Tabla 20 enumera todos los pares de enlaces de hidrógeno y puentes de sal dentro de la interfaz.

Tabla 20 Pares de interacción en la interfaz

10

Cadena ligera de Ab2 - ST2 Cadena pesada de Ab2 - ST2

Enlaces de hidrógeno Enlaces de hidrógeno

n.º	Estructura 1	Dist.	Estructura 2
1	L: ASN 31 [ND2]	3,4	A: ARG 20 [O]
2	L: GLU 55 [OE1]	2,7	R: LYS 1 [NZ]
3	L: ASP 50 [OD2]	2,8	A: ARG 20 [NE]
4	L: ASP 50 [OD1]	3,0	A: ARG 20 [NH2]
5	L: ASP 28 [O]	2,9	R: LYS 23 [NZ]
6	L: ASP 92 [OD1]	2,9	R: LYS 23 [NZ]
7	L: ASP 92 [OD1]	3,3	A: TYR 26 [OH]
8	L: ASP 91 [O]	2,7	A: THR 75 [OG1]
9	L: ASP 91 [O]	3,0	A: ARG 78 [NH2]
10	L: ASP 91 [OD2]	3,0	A: ARG 78 [NH2]
Sal Puentes			

n.º	Estructura 1	Dist.	Estructura 2
1	H: TYR 105 [N]	3,3	A: ASN 77 [O]
2	H: SER 102 [O]	2,6	A: ASN 77 [ND2]
3	H: SER 103 [O]	2,7	A: THR 79 [OG1]
4	H: ASP 104 [OD1]	2,7	A: LYS 1 [N]
5	H: ASP 104 [OD2]	2,8	A: THR 79 [N]
6	H: ASP 104 [OD2]	2,9	A: ARG 20 [NH1]
7	H: TYR 105 [O]	2,8	A: ARG 20 [NH2]

Sal Puentes

n.º Estructura 1 Dist. Estructura 2

n.º	Estructura 1	Dist.	Estructura 2
1	L: GLU 55 [OE1]	2,7	R: LYS 1 [NZ]
2	L: GLU 55 [OE2]	3,6	R: LYS 1 [NZ]
3	L: ASP 50 [OD1]	3,9	A: ARG 20 [NE]
4	L: ASP 50 [OD2]	2,8	A: ARG 20 [NE]
5	L: ASP 50 [OD1]	3,0	A:ARC 20 [NH2]
6	L: ASP 50 [OD2]	3,4	A: ARG 20 [NH2]
7	L: ASP 92 [OD2]	3,4	R: LYS 23 [NZ]
8	L: ASP 92 [OD1]	2,9	R: LYS 23 [NZ]
9	L: ASP 91 [OD2]	3,0	A: ARG 78 [NH2]

1	H: ASP 104 [OD1]	2,7	A: LYS 1 [N]
2	H: ASP 104 [OD2]	3,2	A: LYS 1 [N]
3	H: ASP 104 [OD2]	2,9	A: ARG 20 [NH1]

Las regiones de los epítomos de ST2 obtenidas del análisis HDX-MS del Ejemplo 12 se confirman mediante los datos de cristalografía. Los dos epítomos (15-26 y 70-76) de HDX se identificaron como epítomos en los datos de cristalografía de mayor resolución. Específicamente, Arg20, Gly22, Lys23 y Tyr26, así como Thr75 se identificaron cerca del anticuerpo con una distancia de menos de 3.4 Å. Los restos adicionales que se identificaron que tenían una distancia al anticuerpo entre 3,4 y 5 Å (Pro19, Gln21, Ile70, Val71, Arg72, Ser73 Pro74 y Phe76) también se cubrieron en los epítomos HDX.

Globalmente, los resultados confirmaron que las regiones de epítomos de ST2 obtenidas tanto de HDX-MS como de cristalografía son consistentes. El bucle BC y el bucle FG en el Dominio 1 (véanse los datos de cristalografía) son los principales sitios de interacción.

REFERENCIAS

- Ali, M., G. Zhang, et al. (2009). "Investigations into the role of ST2 in acute asthma in children." *Tissue Antigens* 73(3): 206-212.
- Beltran, C. J., L. E. Nunez, et al. (2010). "Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease." *Inflamm Bowel Dis* 16(7): 1097-1107.
- Brunner, M., C. Krenn, et al. (2004). "Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma." *Intensive Care Med* 30(7): 1468-1473.
- Buysschaert, I. D., V. Grulois, et al. (2010). "Genetic evidence for a role of IL33 in nasal polyposis." *Allergy* 65(5): 616-622.
- Castano R, B. Y., Mfunu Endam L, Desrosiers M (2009). "Evidence of association of Interleukin 1 receptor-like 1 gene polymorphisms with surgery unresponsive Chronic Rhinosinusitis." *American Journal of Rhinology in press*(NA): NA.
- Gudbjartsson, D. F., U.S. Bjornsdottir, et al. (2009). "Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction." *Nat Genet* 41(3): 342-347.
- Hacker, S., C. Lambers, et al. (2009). "Increased soluble serum markers caspase-cleaved cytokeratin-18, histones, and ST2 indicate apoptotic turnover and chronic immune response in COPD." *J Clin Lab Anal* 23(6): 372-379.
- Kuroiwa, K., T. Arai, et al. (2001). "Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases." *Biochem Biophys Res Commun* 284(5): 1104-1108.
- Manetti, M., L. Ibba-Manneschi, et al. (2009). "The IL-1-like cytokine IL-33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis." *Ann Rheum Dis*.
- Marvie, P., M. Lisbonne, et al. (2009). "Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans." *J Cell Mol Med*.
- Matsuyama, Y., H. Okazaki, et al. (2010). "Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 37(1): 18-25.
- Miyagaki, T., M. Sugaya, et al. (2011). "High Levels of Soluble ST2 and Low Levels of IL-33 in Sera of Patients with HIV Infection." *J Invest Dermatol* 131(3): 794-796.
- Moffatt, M. F., I. G. Gut, et al. (2010). "A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma." *N Engl J Med* 363(13): 1211-1221.
- Mok, M. Y., F. P. Huang, et al. (2010). "Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease

- activity in systemic lupus erythematosus." *Rheumatology (Oxford)* 49(3): 520-527.
- Neill, D. R., S. H. Wong, et al. (2010). "Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." *Nature* 464(7293): 1367-1370.
- Oshikawa, K., K. Kuroiwa, et al. (2001). "Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation." *Am J Respir Crit Care Med* 164(2): 277-281.
- Oshikawa, K., K. Kuroiwa, et al. (2001). "Acute eosinophilic pneumonia with increased soluble ST2 in serum and bronchoalveolar lavage fluid." *Respir Med* 95(6): 532-533.
- Palmer, G., D. Talabot-Ayer, et al. (2009). "Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis." *Arthritis Rheum* 60(3): 738-749.
- Pastorelli, L., R. R. Garg, et al. (2010). "Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(17): 8017-8022.
- Plager, D. A., J. C. Kahl, et al. (2010). "Gene transcription changes in asthmatic chronic rhinosinusitis with nasal polyps and comparison to those in atopic dermatitis." *PLoS ONE* 5(7): e11450.
- Prefontaine, D., S. Lajoie-Kadoch, et al. (2009). "Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells." *J Immunol* 183(8): 5094-5103.
- Prefontaine, D., J. Nadigel, et al. (2010). "Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma." *J Allergy Clin Immunol* 125(3): 752-754.
- Pushparaj, P. N., H. K. Tay, et al. (2009). "The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(24): 9773-9778.
- Reijmerink, N. E., D. S. Postma, et al. (2008). "Association of IL1RL1, IL18R1, and IL18RAP gene cluster polymorphisms with asthma and atopy." *J Allergy Clin Immunol* 122(3): 651-654 e658.
- Sakashita, M., T. Yoshimoto, et al. (2008). "Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis." *Clin Exp Allergy* 38(12): 1875-1881.
- Shah, R. V. y J. L. Januzzi, Jr. (2010). "ST2: a novel remodeling biomarker in acute and chronic heart failure." *Curr Heart Fail Rep* 7(1): 9-14.
- Shimizu, M., A. Matsuda, et al. (2005). "Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis." *Hum Mol Genet* 14(19): 2919-2927.
- Sponheim, J., J. Pollheimer, et al. (2010). "Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts." *Am J Pathol* 177(6): 2804-2815.
- Tajima, S., K. Oshikawa, et al. (2003). "The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis." *Chest* 124(4): 1206-1214.
- Theoharides, T. C., B. Zhang, et al. (2010). "IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(9): 4448-4453.
- Verri, W. A., Jr., A. T. Guerrero, et al. (2008). "IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7): 2723-2728.
- Wu, H., I. Romieu, et al. (2010). "Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans." *J Allergy Clin Immunol* 125(2): 321-327 e313.
- Xu, D., H. R. Jiang, et al. (2008). "IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(31): 10913-10918.
- Yanaba, K., A. Yoshizaki, et al. (2011). "Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis." *Clin Rheumatol*.
- Zhang, Z.; Zhang, A. y Xiao, G.; "Improved Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Platform with Fully Automated Data Processing", *Analytical Chemistry*, 2012, 84(11), 4942-9
- Zhang Z, Smith DL. *Protein Sci.* 1993; 2: 522.
- Engen JR, Smith DL. *Anal. Chem.* 2001; 73: 256A.
- Codreanu SG, Ladner JE, Xiao G, Stourman NV, Hachey DL, Gilliland GL, Armstrong RN. *Biochemistry* 2002; 41: 15161.
- Hamuro Y, Coales SJ, Morrow JA, Molnar KS, Tuske SJ, Southern MR, Griffin PR. *Protein Sci.* 2006; 15: 1.
- Baerga-Ortiz A, Hughes CA, Mandell JG, Komives EA. *Protein Sci.* 2002; 11: 1300.
- Coales, SJ. et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23: 639-647.
- CCP4 (Collaborative Computational Project, No 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 760-763.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.
- Leslie, A.G.W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* 26.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, LC y Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* 40, 658-674.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.
- The PyMOL Molecular Graphics System. Schrodinger, L.
- Baerga-Ortiz, A., C. A. Hughes, J. G. Mandell and E. A. Komives (2002). "Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D-exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein." *Protein Sci.* 11(6): 1300-1308.
- Coales, S. J., S. J. Tuske, J. C. Tomasso y. Hamuro (2009). "Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, proteólisis en línea, liquid chromatography and mass

spectrometry." *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23(5): 639-647.

Codreanu, S. G., J. E. Ladner, G. Xiao, N. V. Stourman, D. L. Hachey, G. L. Gilliland y R. N. Armstrong (2002). "Local Protein Dynamics and Catalysis: Detection of Segmental Motion Associated with Rate-Limiting Product Release by a Glutathione Transferase." *Biochemistry* 41(51): 15161-15172.

Engen, J. R. y D. L. Smith (2001). "Investigating protein structure and dynamics by hydrogen exchange MS." *Anal. Chem.* 73(9): 256A-265A.

Hamuro, Y., S. J. Coales, J. A. Morrow, K. S. Molnar, S. J. Tuske, M. R. Southern y P. R. Griffin (2006). "Hydrogen/deuterium-exchange (H/D-Ex) of PPAR γ LBD in the presence of various modulators." *Protein Sci.* 15(8): 1883-1892.

Zhang, Z. y D. L. Smith (1993). "Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation." *Protein Sci.* 2(4): 522-531.

Zhang, Z., A. Zhang y G. Xiao (2012). "Improved Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Platform with Fully Automated Data Processing." *Analytical Chemistry* 84(11): 4942-4949.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC.

SMITH, Dirk E

FOLTZ, Ian

KING, Chadwick T

LIM, Ai Ching

CLARK, Rutilio

COMEAU, Michael R

KETCHEM, Randal R

MIN, Xiaoshan

SHI, Donghui

WANG, Zhulun

<120> PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO ST2

<130> A-1712-WO-PCT

<140> -por asignar-

<141> 17/05/2013

<150> US 61/792.619

<151> 15/03/2013

<150> US 61/649.147

<151> 18/05/2012

<160> 175

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 556

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (78)..(78)

<223> Xaa en la posición 78 es Glu o Ala

<400> 1

ES 2 818 571 T3

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

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

Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
35 40 45

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

Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Xaa Val Ala
65 70 75 80

ES 2 818 571 T3

Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Thr	Cys	Ile	Val	Arg	Ser	Pro	Thr	Phe	Asn	Arg		
				85					90					95			
Thr	Gly	Tyr	Ala	Asn	Val	Thr	Ile	Tyr	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	Cys	Asn		
			100					105					110				
Val	Pro	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ser	Thr	Val	Ser	Gly	Ser	Glu	Lys	Asn		
		115					120					125					
Ser	Lys	Ile	Tyr	Cys	Pro	Thr	Ile	Asp	Leu	Tyr	Asn	Trp	Thr	Ala	Pro		
	130					135					140						
Leu	Glu	Trp	Phe	Lys	Asn	Cys	Gln	Ala	Leu	Gln	Gly	Ser	Arg	Tyr	Arg		
145					150					155					160		
Ala	His	Lys	Ser	Phe	Leu	Val	Ile	Asp	Asn	Val	Met	Thr	Glu	Asp	Ala		
				165					170						175		
Gly	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Phe	Ile	His	Asn	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Tyr		
			180					185					190				
Ser	Val	Thr	Ala	Thr	Arg	Ser	Phe	Thr	Val	Lys	Asp	Glu	Gln	Gly	Phe		
		195					200					205					
Ser	Leu	Phe	Pro	Val	Ile	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asn	Glu	Ile	Lys	Glu		
	210					215					220						
Val	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Ala	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Ala	Cys	Phe	Gly		
225					230					235					240		
Lys	Gly	Thr	Gln	Phe	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Thr		
			245						250					255			
Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Glu	Pro	Arg	Ile	Gln	Gln	Glu	Glu	Gly	Gln		
			260					265					270				
Asn	Gln	Ser	Phe	Ser	Asn	Gly	Leu	Ala	Cys	Leu	Asp	Met	Val	Leu	Arg		
		275					280					285					
Ile	Ala	Asp	Val	Lys	Glu	Glu	Asp	Leu	Leu	Leu	Gln	Tyr	Asp	Cys	Leu		
	290					295					300						
Ala	Leu	Asn	Leu	His	Gly	Leu	Arg	Arg	His	Thr	Val	Arg	Leu	Ser	Arg		
305					310					315					320		
Lys	Asn	Pro	Ile	Asp	His	His	Ser	Ile	Tyr	Cys	Ile	Ile	Ala	Val	Cys		
				325					330					335			

ES 2 818 571 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 570
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

Asn Val Ile Leu Val Gln Tyr Lys Ala Val Lys Glu Thr Lys Val Lys
500 505 510

Glu Leu Lys Arg Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly
515 520 525

Glu Lys Ser Lys Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val
530 535 540

Ala Met Pro Val Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln
545 550 555 560

Gly Leu Ser Tyr Ser Ser Leu Lys Asn Val
565 570

<210> 3
<211> 270
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 818 571 T3

Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val Leu
145 150 155 160

Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp Gly
165 170 175

Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe
180 185 190

Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys
195 200 205

Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met His
210 215 220

Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile
225 230 235 240

Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser Glu
245 250 255

Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
260 265 270

<210> 4
<211> 556
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 4

ES 2 818 571 T3

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

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

Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Ser Ser Tyr Ile Val Asp Trp
35 40 45

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

Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala
65 70 75 80

Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg
85 90 95

ES 2 818 571 T3

Thr	Gly	Tyr	Ala	Asn	Val	Thr	Ile	Tyr	Lys	Lys	Gln	Pro	Asp	Cys	Asn		
			100					105					110				
Val	Pro	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ser	Thr	Val	Ser	Gly	Ser	Glu	Lys	Asn		
		115					120					125					
Ser	Lys	Ile	Tyr	Cys	Pro	Thr	Ile	Asp	Leu	Tyr	Asn	Trp	Thr	Ala	Pro		
	130					135					140						
Leu	Glu	Trp	Phe	Lys	Asn	Cys	Gln	Ala	Leu	Gln	Gly	Ser	Arg	Tyr	Lys		
145					150					155					160		
Ala	His	Lys	Ser	Phe	Leu	Val	Ile	Asp	Asn	Val	Met	Thr	Asp	Asp	Ala		
				165					170						175		
Gly	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Phe	Ile	His	Asn	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Tyr		
			180					185					190				
Ser	Val	Thr	Ala	Thr	Arg	Ser	Phe	Thr	Val	Lys	Asp	Glu	Gln	Gly	Phe		
		195					200					205					
Ser	Arg	Phe	Pro	Val	Ile	Arg	Ala	Pro	Ala	His	Asn	Glu	Thr	Lys	Glu		
	210					215					220						
Val	Glu	Ile	Gly	Glu	Asn	Thr	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Ala	Cys	Phe	Gly		
225					230					235					240		
Lys	Gly	Ala	Gln	Phe	Leu	Ala	Thr	Val	Gln	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Asn		
				245					250					255			
Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Ser	Glu	Pro	Arg	Ile	Gln	Gln	Glu	Glu	Gly	Gln		
			260					265					270				
Asn	Gln	Ser	Phe	Ser	Asn	Gly	Leu	Ala	Cys	Val	Asn	Thr	Val	Leu	Arg		
		275					280					285					
Ile	Ala	Asp	Val	Lys	Glu	Glu	Asp	Leu	Leu	Leu	Arg	Tyr	Asp	Cys	Leu		
	290					295					300						
Ala	Leu	Asn	Leu	His	Gly	Leu	Arg	Arg	His	Thr	Ile	Arg	Leu	Ser	Arg		
305					310					315					320		
Lys	Asn	Pro	Ile	Asp	His	Gln	Ser	Thr	Tyr	Cys	Ile	Ile	Ala	Val	Cys		
				325					330					335			
Ser	Val	Leu	Leu	Met	Leu	Ile	Asn	Ile	Leu	Val	Ile	Ile	Leu	Lys	Thr		
			340					345					350				

ES 2 818 571 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 570
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 5

5

10

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

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

Leu Met Asp Ser Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys
 275 280 285
 Pro Asp Asp Ile Pro Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His
 290 295 300
 Ser Arg Thr Glu Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys
 305 310 315 320
 Val Thr Ser Glu Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala Arg Ser
 325 330 335
 Ala Lys Gly Glu Val Ala Lys Ala Ala Thr Val Lys Gln Lys Val Pro
 340 345 350
 Ala Pro Arg Tyr Thr Val Glu Leu Ala Cys Gly Phe Gly Ala Thr Val
 355 360 365
 Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Val Val Tyr His Val Tyr Trp Leu Glu
 370 375 380
 Met Val Leu Phe Tyr Arg Ala His Phe Gly Thr Asp Glu Thr Ile Leu
 385 390 395 400
 Asp Gly Lys Glu Tyr Asp Ile Tyr Val Ser Tyr Ala Arg Asn Ala Glu
 405 410 415
 Glu Glu Glu Phe Val Leu Leu Thr Leu Arg Gly Val Leu Glu Asn Glu
 420 425 430
 Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Asp Arg Asp Ser Leu Pro Gly Gly
 435 440 445
 Ile Val Thr Asp Glu Thr Leu Ser Phe Ile Gln Lys Ser Arg Arg Leu
 450 455 460
 Leu Val Val Leu Ser Pro Asn Tyr Val Leu Gln Gly Thr Gln Ala Leu
 465 470 475 480
 Leu Glu Leu Lys Ala Gly Leu Glu Asn Met Ala Ser Gln Gly Asn Ile
 485 490 495
 Asn Val Ile Leu Val Gln Tyr Lys Ala Val Lys Glu Thr Lys Val Lys
 500 505 510
 Glu Leu Lys Arg Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly

ES 2 818 571 T3

515

520

525

Glu Lys Ser Lys Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val
530 535 540

Ala Met Pro Val Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln
545 550 555 560

Gly Leu Ser Tyr Ser Ser Leu Lys Asn Val
565 570

<210> 6

<211> 270

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 6

5

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

165

170

175

Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe
180 185 190

Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys
195 200 205

Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Arg Ser
210 215 220

Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile
225 230 235 240

Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp His Ser Glu
245 250 255

Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile
260 265 270

<210> 7

<211> 1332

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

5

ES 2 818 571 T3

caggtccaac tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg tttccggata caccctcact gaattatcca tacactgggt ggcagaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttggctctg aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aacagaggat 300
 agcagtggcc tctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagctagc 360
 accaagggcc catcggctctt cccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcgtc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccagctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaagt 660
 tgtgtcagat gccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt ctctctcttc 720
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 780
 gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
 gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 900

 agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
 tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc 1020
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
 agcctgacct gcctggtcaa aggtttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc 1200
 ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320
 tctccgggta aa 1332

5 <210> 8
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 8

ES 2 818 571 T3

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc      60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc aactactgga tcggctgggt gcgccagatg      120
cccggaag gcttgagtg gatggggatc atctatcctg gtaactctga taccagattc      180
agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcac caccgcctac      240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacatggt      300
acctcgctccg actactacgg tctggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc      360
tcagctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc      420
gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg      480
tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc      540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcaactt cggcacccag      600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag      660
cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc      720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg      780
tgctgtggtg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac      840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc      900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag      960
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaaacaaaa      1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag      1080
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag      1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc      1200

gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg      1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      1320
ctctccctgt ctccgggtaa a      1341

```

5 <210> 9
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 9

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctacgaca tgcaactggat ccgccaagct	120
ccaggaaaaa atctggagtg ggtctcagct attgatcttg ctggtgacac atactatcca	180
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaagatg ccaagaactc cttgtatctt	240
caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agggggagat	300
ggctacaatt acgactacta cggatatagac gtctggggcc aaggggaccac ggtcaccgtc	360
tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc	420
tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	480
gtgtcgtgga actcagggcg tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag	540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc	600
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt	660
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca	720
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc	780
acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg	840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg	900
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac	960
aagtgcagg tctccaacaa aggcctcca gccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc	1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc	1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg	1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacacctcc catgctggac	1200
tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag	1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	1320
agcctctccc tgtctccggg taaa	1344

<210> 10
 <211> 1329
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 10

caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcgagg tttccggatt catcctcact gaattatccg tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatggtaa aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccttg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacatgggtg 300
 gactttcact ttgacttctg gggccaggga accctgggtca cgtctcctc agctagcacc 360
 aaggggccat cgggtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 420
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 480
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 540
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc 600
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 660
 gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 720
 ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg 780
 gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 840
 cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 900
 gtctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagt caaggtctcc 960
 aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1020
 gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1080
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1140
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1200
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1260
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1320
 ccgggtaaa 1329

<210> 11
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 11

gaggtgcagt tgggtggagtc tgggggaggc tgggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatgaca tgtactgggt ccgccaagct 120
 acagggaaag gtctggagtg ggtctcaggt attgatactg ttggggacac atattatcca 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cgtgtatctt 240

caaatgaaca ccctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgtaag aggcattctac	300
ggtgactttt attattacgg tttggacgtc tggggccacg ggaccacggt caccgtctcc	360
tcagctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc	420
gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	480
tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc	540
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcaactt cggcaccacg	600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag	660
cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc	720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg	780
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc	900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	960
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaacccaaa	1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag	1080
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc	1200
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccgggtaa a	1341

<210> 12
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 818 571 T3

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	acctacgaca	tgcactgggt	ccgccaaact	120
acaggaaaag	gtctggagtg	ggtctcagct	attgatcttg	ctggtgacac	atactatcca	180
ggctccgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagaagatg	ccaagaactc	cttgtatctt	240
caaatgaaca	gcctgagagc	cggggacacg	gctgtgtatt	actgtgcaag	agggggagat	300
ggctacaatt	acgactacta	cggatatagac	gtctggggcc	aaggggaccac	ggtcaccgtc	360
tcctcagcta	gcaccaaggg	cccatcggtc	ttccccctgg	cgcctgctc	caggagcacc	420
tccgagagca	cagcggccct	gggctgcctg	gtcaaggact	acttccccga	accggtgacg	480
gtgtcgtgga	actcaggcgc	tctgaccagc	ggcgtgcaca	ccttcccagc	tgtcctacag	540
tcctcaggac	tctactccct	cagcagcgtg	gtgaccgtgc	cctccagcaa	cttcggcacc	600
cagacctaca	cctgcaacgt	agatcacaag	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagacagtt	660
gagcgcaa	ggtgtgtcga	gtgcccaccg	tgcccagcac	cacctgtggc	aggaccgtca	720
gtcttcctct	ttcccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccggac	ccctgaggtc	780
acgtgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gaccccgagg	tccagttcaa	ctggtacgtg	840
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccacggg	aggagcagtt	caacagcacg	900
ttccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgttgtg	caccaggact	ggctgaacgg	caaggagtac	960
aagtgcagg	tctccaacaa	aggcctccca	gccccatcg	agaaaaccat	ctccaaaacc	1020
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	ggagatgacc	1080
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	accccagcga	catcgccgtg	1140
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaa	aactacaaga	ccacacctcc	catgctggac	1200
tccgacggct	ccttcttcct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	1260
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	1320
agcctctccc	tgtctccggg	taaa				1344

5 <210> 13
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 13

ES 2 818 571 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctacgaca tgcaactgggt ccgccaaact 120
 acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attgatcttg ctggtgacac atactatcca 180
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaagatg ccaagaactc cttgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agggggagat 300
 ggctacaatt acgactacta cggtatagac gtctggggcc aaggggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420
 tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag 540
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc 600
 cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt 660
 gagcgcaaat gttgtgtcga gtgccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 720
 gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
 acgtgctgtg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840

 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 900
 ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgcagg tctccaacaa aggcctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc 1020
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacacctcc catgctggac 1200
 tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
 gggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag 1320
 agcctctccc tgtctccggg taaa 1344

5 <210> 14
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 14

ES 2 818 571 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctacgaca tgtactgggt ccgccaagct 120
 acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attgatactg ttggtgacac atactatcca 180
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagagt cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag aggcggtgac 300
 tacgactact cttattacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 420
 gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcaactt cggcaccacg 600
 acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag 660
 cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc 720
 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc 900
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaacaaaa 1020
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140

 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc 1200
 gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
 ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

5 <210> 15
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 15

ES 2 818 571 T3

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg gtggaagtca taaatactat	180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaattga acagcctgag agccgaagac acggctgtct attactgtgc gagagacaag	300
ggcgagtttg actactgggg ccagggaacc ctgggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag	360
ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc	420
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc	480
gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagacctc cacctgcaac	600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc	660
gagtgccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca	720
aaaccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtgggtggac	780
gtgagccacg aagacccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	840
aatgccaaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc	900
ctcaccttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac	960
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa	1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gaggatga ccaagaacca ggtcagcctg	1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctacccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	1140
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc	1200
ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	1320
ggtaaa	1326

<210> 16
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 818 571 T3

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtata ctggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgttgcac 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagataaa 300
gggtactttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag 360
ggcccatcgg tcttccccct ggccgacctg tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 420
ctgggtgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggc 480
gctctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
ctcagcagcg tgggtgacct gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac 600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 660
gagtgccac cgtgccagc accacctgtg gcaggacctg cagtcttcct cttcccccca 720
aaacccaagg acacctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgctg ggtggtggac 780
gtgagccagc aagacccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840
aatgccaaaga caaagccagc ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 900
ctcacggttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1020
ccacaggtgt acacctgcc cccatcccg gagggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc 1200
ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320
ggtaaa 1326

<210> 17
<211> 1326
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 17

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg gtggaagtca taaatactat	180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaattga acagcctgag agccgaagac acggctgtct attactgtgc gagagacaag	300
ggcagagttt actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag	360
ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc	420
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc	480
gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagacctc cacctgcaac	600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc	660
gagtgcacac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctc cttcccccca	720
aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac	780
gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	840
aatgccaaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc	900
ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac	960
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa	1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg	1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	1140
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctccttcttc	1200
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	1320
ggtaaa	1326

<210> 18
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 18

5

ES 2 818 571 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Gly Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe

ES 2 818 571 T3

50		55		60	
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr					
65		70		75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
		85		90	95
Thr Thr Glu Asp Ser Ser Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr					
		100		105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro					
		115		120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly					
		130		135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn					
		145		150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln					
		165		170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser					
		180		185	190
Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser					
		195		200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys					
		210		215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe					
		225		230	235
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val					
		245		250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe					
		260		265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro					
		275		280	285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr					
		290		295	300

ES 2 818 571 T3

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 19
<211> 447
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg Phe Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ES 2 818 571 T3

Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	His	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Asp	Val	Trp	Gly	
			100					105					110			
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
		115					120					125				
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	
	130					135					140					
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
145					150					155					160	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
				165					170					175		
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
			180					185					190			
Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	
		195					200					205				
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	
	210					215					220					
Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	
225					230					235					240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
				245					250					255		
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	
			260					265					270			
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
		275					280					285				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	
	290					295					300					
Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
305					310					315					320	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
				325					330					335		

ES 2 818 571 T3

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 20

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

ES 2 818 571 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asn Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
100 105 110

ES 2 818 571 T3

Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	115	120	125
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	130	135	140
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	180	185	190
Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	195	200	205
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	210	215	220
Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	225	230	235
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	260	265	270
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	275	280	285
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	290	295	300
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	305	310	315
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	325	330	335
Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	340	345	350
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	355	360	365

ES 2 818 571 T3

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 21
<211> 443
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	145	150	155	160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	165	170	175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	180	185	190	
Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	195	200	205	
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	210	215	220	
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	225	230	235	240
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	245	250	255	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	260	265	270	
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	275	280	285	
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	290	295	300	
Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	305	310	315	320
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	325	330	335	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	340	345	350	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	355	360	365	
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	370	375	380	
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe				

ES 2 818 571 T3

385		390		395		400									
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
				405					410					415	
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
			420					425					430		
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
		435					440								

5
 <210> 22
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

5
 <210> 23
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

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

<210> 24
<211> 448

ES 2 818 571 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

5

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

ES 2 818 571 T3

Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	225	230	235	240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	260	265	270	
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	275	280	285	
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	290	295	300	
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	305	310	315	320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	325	330	335	
Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	340	345	350	
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	355	360	365	
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	370	375	380	
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	385	390	395	400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	405	410	415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	420	425	430	
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	435	440	445	

<210> 25
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 25

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 26
<211> 442
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

ES 2 818 571 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

275	280	285
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val		
290	295	300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
305	310	315
Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly		
325	330	335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
340	345	350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
355	360	365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
370	375	380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
385	390	395
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
405	410	415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
420	425	430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	

<210> 27
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27

ES 2 818 571 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Thr Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 28
<211> 442
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

ES 2 818 571 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Gly Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ES 2 818 571 T3

Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Arg	Asp	Lys	Gly	Glu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			100					105					110			
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
		115					120					125				
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
	130						135					140				
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145					150					155					160	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165					170					175		
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	
			180					185					190			
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
		195					200					205				
Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	
	210					215					220					
Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
225					230					235					240	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
				245					250					255		
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	
			260					265					270			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
		275					280					285				
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	
	290					295					300					
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
305					310					315					320	
Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	
				325					330					335		

ES 2 818 571 T3

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 29
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Gly Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Thr Glu Asp Ser Ser Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

ES 2 818 571 T3

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg Phe Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Thr Ser Ser Asp Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asn Leu Glu Trp Val
35 40 45

ES 2 818 571 T3

Ser Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 32
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Val Ser Gly Phe Ile Leu Thr Glu Leu
20 25 30

Ser Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Lys Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Trp Trp Asp Phe His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 818 571 T3

<400> 33

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

5

<210> 34
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 34

ES 2 818 571 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 35
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 35

ES 2 818 571 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

ES 2 818 571 T3

Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Asp Tyr Asp Tyr Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

ES 2 818 571 T3

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

<210> 38
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38

5

ES 2 818 571 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Thr Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu His
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Gly Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 818 571 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Glu Leu Ser Ile His
1 5

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Thr Tyr Asp Met His
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Glu Leu Ser Val Asn
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 818 571 T3

	<400> 44	
		Ser Tyr Asp Met Tyr 1 5
5	<210> 45 <211> 5 <212> PRT <213> Homo sapiens	
10	<400> 45	
		Thr Tyr Asp Met His 1 5
15	<210> 46 <211> 5 <212> PRT <213> Homo sapiens	
20	<400> 46	
		Thr Tyr Asp Met His 1 5
25	<210> 47 <211> 5 <212> PRT <213> Homo sapiens	
30	<400> 47	
		Ser Tyr Asp Met Tyr 1 5
35	<210> 48 <211> 5 <212> PRT <213> Homo sapiens	
	<400> 48	
40		Ser Tyr Gly Met His 1 5
45	<210> 49 <211> 5 <212> PRT <213> Homo sapiens	
	<400> 49	
50		Ser Tyr Gly Met His 1 5
	<210> 50 <211> 5 <212> PRT	

ES 2 818 571 T3

<213> Homo sapiens

<400> 50

5 Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 51

Gly Phe Gly Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

15 <210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 52

Ile Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg Phe Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

25 <210> 53

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 53

Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 54

35 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

40

Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Lys Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

45 <210> 55

<211> 16

<212> PRT

ES 2 818 571 T3

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gly Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

5

<210> 56

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 56

Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

15

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

25

<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 58

Ala Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

35

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

40

Val Ile Trp Tyr Gly Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<400> 60

ES 2 818 571 T3

Val Ile Trp Tyr Thr Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Val Ile Trp Tyr Gly Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Glu Asp Ser Ser Gly Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

His Gly Thr Ser Ser Asp Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 64
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val
1 5 10

<210> 65
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

ES 2 818 571 T3

Trp Trp Asp Phe His Phe Asp Phe
1 5

5
<210> 66
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

10 Gly Ile Tyr Gly Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10

15
<210> 67
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

20 Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val
1 5 10

25
<210> 68
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

30 Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val
1 5 10

35
<210> 69
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Gly Gly Asp Tyr Asp Tyr Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

40
<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

45 Asp Lys Gly Glu Phe Asp Tyr
1 5

50
<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 818 571 T3

<400> 71

Asp Lys Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 72

Asp Lys Gly Glu Phe Asp Tyr
1 5

15

<210> 73
<211> 660
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20

<400> 73

gacctcgtga	tgacccagtc	tccagactcc	ctggctgtgt	ctccgggcga	gagggccact	60
atcaactgca	agtccagcca	gagtctttta	tacagctcca	acaataagga	ctacttagct	120
tggtaccagc	agaagccggg	acagcctcct	aaactgctca	tttactgggc	atctaccg	180
gaatccgggg	tccctgaccg	attcagtggc	agcgggtctg	ggacagattt	cactctcacc	240
atcagcagcc	tgcaggctga	agatgtggca	gtttattact	gtcaccaata	ttataatact	300
ccgtggacgt	tccggccaagg	gaccaaggtg	gaaatcaaac	gtacgggtggc	tgcaccatct	360
gtcttcatct	tcccgccatc	tgatgagcag	ttgaaatctg	gaactgcctc	tgttgtgtgc	420
ctgctgaata	acttctatcc	cagagaggcc	aaagtacagt	ggaagggtgga	taacgccctc	480
caatcgggta	actcccagga	gagtgtcaca	gagcaggaca	gcaaggacag	cacctacagc	540
ctcagcagca	ccctgacgct	gagcaaagca	gactacgaga	aacacaaagt	ctacgcctgc	600
gaagtcaccc	atcagggcct	gagctcgccc	gtcacaaaga	gcttcaacag	gggagagtgt	660

25

<210> 74
<211> 642
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30

<400> 74

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

atcacttgcc aggcgagtca ggacattagt aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacag gatgataatt tccctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 75
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 75

gatattgtaa tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtc gagcctcctg catagtgatg gataccacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcggggc 180
 tccgggggtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaattctc 300
 actttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 76
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 76

ES 2 818 571 T3

gattttgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
atctcctgta agtctagtca gagcctcctg catagtaatg gaaagaccta tttgtattgg 120
ttcctgcaga agccaggcca gcctccacaa ctctgatct atgaagtttc caaccggttc 180
tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agccgggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300
ctcactttcg gcggagggaac caaggtggag atcaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacc cagcgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

5 <210> 77
<211> 654
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 77

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg tatagtgatg gaaacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccaggga gtctccacac ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
tccgggggtcc ctgacagggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgacga tgttgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactctc 300
actttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

15 <210> 78
<211> 654
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 78

ES 2 818 571 T3

gatattgtaa	tgactcagtc	tccactctcc	ctgcccgtca	cccctggaga	gccggcctcc	60
atctcctgca	ggtctagtc	gagcctcctg	catagtgatg	gatatcacta	tttggattgg	120
tacctgcaga	agccagggca	gtctccacag	ctcctgatct	atttgggttc	taatcggggc	180
tccgggggtcc	ctgacagggt	cagtggcagt	ggatcaggca	cagattttac	actgaacatc	240
agcagagtgg	aggctgagga	tgttggggtt	tattactgca	tgcaagctct	acaaactctc	300
actttcggcg	gagggaccaa	ggtggagatc	aaacgtacgg	tggctgcacc	atctgtcttc	360
atcttcccgc	catctgatga	gcagttgaaa	tctggaactg	cctctgttgt	gtgcctgctg	420
aataacttct	atcccagaga	ggccaaagta	cagtggaagg	tggataacgc	cctccaatcg	480
ggtaactccc	aggagagtgt	cacagagcag	gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagc	540
agcacctga	cgctgagcaa	agcagactac	gagaaacaca	aagtctacgc	ctgcgaagtc	600
acccatcagg	gcctgagctc	gcccgtcaca	aagagcttca	acaggggaga	gtgt	654

5 <210> 79
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 79

gatattgtaa	tgactcagtc	tccactctcc	ctgcccgtca	cccctggaga	gccggcctcc	60
atctcctgca	ggtctagtc	gagcctcctg	catagtgatg	gatatcacta	tttggattgg	120
tacctgcaga	agccagggca	gtctccacag	ctcctgatct	atttgggttc	taatcggggc	180
tccgggggtcc	ctgacagggt	cagtggcagt	ggatcaggca	cagattttac	actgaacatc	240
agcagagtgg	aggctgagga	tgttggggtt	tattactgca	tgcaagctct	acaaactctc	300
actttcggcg	gagggaccaa	ggtggagatc	aaacgtacgg	tggctgcacc	atctgtcttc	360
atcttcccgc	catctgatga	gcagttgaaa	tctggaactg	cctctgttgt	gtgcctgctg	420
aataacttct	atcccagaga	ggccaaagta	cagtggaagg	tggataacgc	cctccaatcg	480
ggtaactccc	aggagagtgt	cacagagcag	gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagc	540
agcacctga	cgctgagcaa	agcagactac	gagaaacaca	aagtctacgc	ctgcgaagtc	600
acccatcagg	gcctgagctc	gcccgtcaca	aagagcttca	acaggggaga	gtgt	654

15 <210> 80
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 80

ES 2 818 571 T3

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc	60
atctcctgta ggtctgggtca gagcctcctg catagtgatg gatacaacta tttggattgg	120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcggggcc	180
tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactatc	300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc	360
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg	420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg	480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	540
agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	600
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt	654

5 <210> 81
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 81

gaaattgtga tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagccact taggctggta tcagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca acagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag caaactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc	300
caagggaacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg	540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt	645

15 <210> 82
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 82

ES 2 818 571 T3

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agcagccact tagcctggta tcagcagaaa 120
cctggccaga ctcccagggt cctcatctat gctgcatcca gcagggccac cggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaggatt ttgcagtgt ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 83
<211> 645
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 83

gaaattgtga tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagccact taggctggta tcagcagaaa 120
cctggccagg ctcccagggt cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag caaactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 84
<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

ES 2 818 571 T3

```

Asp Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
          20           25           30

Ser Asn Asn Lys Asp Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          35           40           45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Asn Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          100          105          110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          115          120          125

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

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145           150           155           160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
          165          170          175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
          180          185          190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
          195          200          205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215          220

```

5 <210> 85
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 818 571 T3

<400> 85

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
          20           25           30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asp Asn Phe Pro Leu
          85           90           95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130          135          140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

```

5

<210> 86

<211> 218

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

ES 2 818 571 T3

<400> 86

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Ile Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

5

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 87

ES 2 818 571 T3

<211> 219
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 87

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

ES 2 818 571 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 88
<211> 218
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

ES 2 818 571 T3

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1          5          10          15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
          20          25          30

Asp Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

Pro His Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
          50          55          60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
          85          90          95

Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115          120          125

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145          150          155          160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          165          170          175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
          180          185          190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
          195          200          205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

```

5 <210> 89
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 818 571 T3

<400> 89

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20           25           30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
65           70           75           80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
          85           90           95

Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115          120          125

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145          150          155          160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          165          170          175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
          180          185          190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
          195          200          205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

```

5

<210> 90

<211> 218

<212> PRT

ES 2 818 571 T3

<213> Homo sapiens

<400> 90

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20           25           30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35           40           45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50           55           60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
65           70           75           80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85           90           95

Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100          105          110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115          120          125

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145          150          155          160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165          170          175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180          185          190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195          200          205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210          215

```

<210> 91

<211> 218

ES 2 818 571 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91

5

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1          5          10          15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Leu His Ser
          20          25          30

Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
          50          55          60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
          85          90          95

Leu Gln Thr Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
          100          105          110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115          120          125

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145          150          155          160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          165          170          175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
          180          185          190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
          195          200          205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210          215

```

<210> 92
<211> 215
<212> PRT

10

ES 2 818 571 T3

<213> Homo sapiens

<400> 92

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

His Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

5

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

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

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 93

<211> 215

ES 2 818 571 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Arg Phe Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

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

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 94

ES 2 818 571 T3

<211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 94

```

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30

His Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
      35           40           45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
      50           55           60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
          85           90           95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
      100           105           110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
      115           120           125

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

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
      145           150           155           160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
      165           170           175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
      180           185           190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
      195           200           205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210           215

```

10 <210> 95
 <211> 114

ES 2 818 571 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95

5

```

Asp Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1      5      10      15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
      20      25      30

Ser Asn Asn Lys Asp Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35      40      45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
      50      55      60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65      70      75      80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
      85      90      95

Tyr Tyr Asn Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
      100      105      110

```

Lys Arg

10 <210> 96
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 96

ES 2 818 571 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asp Asn Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 97
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Ile Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

ES 2 818 571 T3

<210> 98
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 98

```

Asp Phe Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1          5          10          15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20          25          30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
          35          40          45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50          55          60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
          85          90          95

Ile Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110
  
```

Arg

10

<210> 99
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 99

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
  
```

ES 2 818 571 T3

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro His Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 100
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 101
<211> 112
<212> PRT

ES 2 818 571 T3

<213> Homo sapiens

<400> 101

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20           25           30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
65           70           75           80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
          85           90           95

Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110

```

5

<210> 102

<211> 112

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 102

ES 2 818 571 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

110

5 <210> 103
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 103

ES 2 818 571 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

His Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 104

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Arg Phe Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

5

10

ES 2 818 571 T3

Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 105
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 105

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

His Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 106
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asp Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

ES 2 818 571 T3

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 108
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 109
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 109

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 110
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Asn Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 111
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 111

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 112
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 113
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 113

ES 2 818 571 T3

	Arg	Ser	Gly	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp
	1				5					10					15	
5	<210> 114 <211> 12 <212> PRT <213> Homo sapiens															
10	<400> 114															
	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	His	Leu	Gly				
	1				5					10						
15	<210> 115 <211> 12 <212> PRT <213> Homo sapiens															
	<400> 115															
20	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	His	Leu	Ala				
	1				5					10						
25	<210> 116 <211> 12 <212> PRT <213> Homo sapiens															
	<400> 116															
30	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	His	Leu	Gly				
	1				5					10						
35	<210> 117 <211> 7 <212> PRT <213> Homo sapiens															
	<400> 117															
40	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser									
	1				5											
45	<210> 118 <211> 7 <212> PRT <213> Homo sapiens															
	<400> 118															
50	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Thr									
				1			5									
	<210> 119 <211> 7 <212> PRT															

ES 2 818 571 T3

	<213> Homo sapiens								
	<400> 119								
5		Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	
		1				5			
	<210> 120								
	<211> 7								
	<212> PRT								
10	<213> Homo sapiens								
	<400> 120								
		Glu	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	
15		1				5			
	<210> 121								
	<211> 7								
	<212> PRT								
20	<213> Homo sapiens								
	<400> 121								
		Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	
		1				5			
25	<210> 122								
	<211> 7								
	<212> PRT								
	<213> Homo sapiens								
30	<400> 122								
		Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	
		1				5			
35	<210> 123								
	<211> 7								
	<212> PRT								
	<213> Homo sapiens								
40	<400> 123								
		Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	
		1				5			
45	<210> 124								
	<211> 7								
	<212> PRT								
	<213> Homo sapiens								
	<400> 124								
50		Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	
		1				5			
	<210> 125								
	<211> 7								
	<212> PRT								
55	<213> Homo sapiens								

ES 2 818 571 T3

<400> 125

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

5

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 126

Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

15

<210> 127
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 127

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

25

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 128

His Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Trp Thr
1 5

35

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 129

Gln Gln Asp Asp Asn Phe Pro Leu Thr
1 5

40

<210> 130
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45

<400> 130

Met Gln Ala Leu Gln Ile Leu Thr
1 5

50

<210> 131
<211> 9

ES 2 818 571 T3

	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 131	
5		Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Leu Thr
		1 5
	<210> 132	
	<211> 8	
10	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 132	
		Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Thr
15		1 5
	<210> 133	
	<211> 8	
	<212> PRT	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 133	
		Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Thr
25		1 5
	<210> 134	
	<211> 8	
	<212> PRT	
30	<213> Homo sapiens	
	<400> 134	
		Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Thr
35		1 5
	<210> 135	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 135	
		Met Gln Ala Leu Gln Thr Ile Thr
		1 5
	<210> 136	
45	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 136	
50		Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
		1 5

ES 2 818 571 T3

<210> 137
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 137

5

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

10 <210> 138
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 138

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

20 <210> 139
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 139

caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggagggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtacag	cgtctggatt	caccttcagt	agccatggca	tgcactgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtgacaatt	atatggtttg	atggaaataa	taaatactat	180
gcagactccg	tggagggccg	cttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgttt	240
ctgcaaataa	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtct	attactgtgc	gagagagggg	300
gcggaacagg	ggttcatcga	tctctggggc	cgtggcacc	tggtcactgt	ctcctcagct	360
agcaccaagg	gcccatcggt	cttccccctg	gcgccctgct	ccaggagcac	ctccgagagc	420
acagcggccc	tgggctgcct	ggtcaaggac	tacttccccg	aaccggtgac	ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg	ctctgaccag	cggcgtgcac	accttcccag	ctgtcctaca	gtcctcagga	540
ctctactccc	tcagcagcgt	ggtgaccgtg	ccctccagca	acttcggcac	ccagacctac	600
acctgcaacg	tagatcacia	gccagcaac	accaaggtgg	acaagacagt	tgagcgcaaa	660
tgttgtgtcg	agtgccacc	gtgccagca	ccacctgtgg	caggaccgtc	agtcttcctc	720

ES 2 818 571 T3

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag	960
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaac caaagggcag	1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatccggg aggagatgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc	1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320
ctgtctccgg gtaaa	1335

<210> 140
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 140

ES 2 818 571 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacaac ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt accttcgaca tgcactgggt ccgccaagct	120
acaggaaaag gtctggagtg ggtctcaagt attgatactg aaggagacac atactattca	180
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaggaactc cttgtatctt	240
caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtacaag aggcgaggac	300
tggagcgacg acgactacta ctacggtttg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc	360
gtctcctcag ctagcaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc	420
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg	480
acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta	540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc	600
acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca	660
gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccc gaccttgag	780
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc	900
acgttccgtg tggtcagcgt cctcacggt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa	1020
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc ggaggagatg	1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc	1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg	1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctaccg tggacaagag caggtggcag	1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa	1347

<210> 141
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 141

ES 2 818 571 T3

gaggtgcaac tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt accttcgaca tgcactgggt ccgccaagtt	120
ccaggaaaag gtctggagtg gatctcaagt attgatactg aaggagacac atactatcca	180
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaggaactc cttgtatctt	240
caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtacaag aggcgaggac	300
tggagcgacg acgactacta ctacggtttg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc	360
gtctcctcag ctagcaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc	420
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg	480
acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta	540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc	600
accagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca	660
gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccg gacctctgag	780
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc	900
acgttccgtg tggtcagcgt cctcacctgt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa	1020
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggaggagatg	1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc	1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg	1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa	1347

5 <210> 142
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 142

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 143
 <211> 449
 <212> PRT

ES 2 818 571 T3

<213> Homo sapiens

<400> 143

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

ES 2 818 571 T3

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 144
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 144

ES 2 818 571 T3

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

ES 2 818 571 T3

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 145
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 145

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

ES 2 818 571 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Ile Ile Trp Phe Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ala Glu Gln Gly Phe Ile Asp Leu Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 146

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

ES 2 818 571 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 147
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 147

ES 2 818 571 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 148
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 148

Ser His Gly Met His
1 5

<210> 149
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 149

Thr Phe Asp Met His
1 5

<210> 150
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150

Thr Phe Asp Met His
1 5

ES 2 818 571 T3

<210> 151
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 151

 Ile Ile Trp Phe Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15

 Gly
 10
 <210> 152
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 152

 Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Gly Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

 20 <210> 153
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 153

 Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

 30 <210> 154
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 154

 Glu Gly Ala Glu Gln Gly Phe Ile Asp Leu
 1 5 10

 40 <210> 155
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 155

 Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15
 45
 <210> 156
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

ES 2 818 571 T3

<400> 156

Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10 15

5

<210> 157
<211> 642
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10

<400> 157

gacatccaga	tgaccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	aggcgagtc	ggacattagc	aactatattaa	attggtatca	ccagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctacgat	gcatccaatt	tggaaacagg	ggtcccatca	180
aggttcagtg	gaagtggatc	tgggacagat	tttactttca	ccatcagcgg	cctgcagcct	240
gaagatattg	caacatatta	ctgtcaacag	catgataatc	tcccgtcac	tttcggcgga	300
gggaccaagg	tggagatcaa	gcgaacggtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgcca	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tgggaactgcc	tctgtttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	caaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	480
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540
ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gt		642

15

<210> 158
<211> 654
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20

<400> 158

aatattgtga	tgaccagac	tccactctct	ctgtccgtca	cccctggaca	gccggcctcc	60
atctcctgca	agtctagtca	gagcctcctg	catagtgatg	gaaagaccta	tttattttgg	120
tacctgcaga	agccaggcca	gcctccacag	ctcctgatct	atggagtttc	caaccgggttc	180

ES 2 818 571 T3

tctggagtgc	cagatagggt	cagtggcagc	gggtcagggg	cagatttcac	actgaaaatc	240
agccgggtgg	aggctgaaga	tgttgggggt	tattactgca	tgcaaagttt	acagctattc	300
actttcggcc	ctgggaccaa	agtggagatc	aagcgaacgg	tggtgcacc	atctgtcttc	360
atcttcccgc	catctgatga	gcagttgaaa	tctggaactg	cctctgttgt	gtgcctgctg	420
aataacttct	atcccagaga	ggccaaagta	cagtggaagg	tggtataacgc	cctccaatcg	480
ggtaactccc	aggagagtgt	cacagagcag	gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagc	540
agcaccctga	cgctgagcaa	agcagactac	gagaaacaca	aagtctacgc	ctgcgaagtc	600
acccatcagg	gcctgagctc	gcccgtcaca	aagagcttca	acaggggaga	gtgt	654

<210> 159
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 159

aatattgtga	tgaccagac	tccactctct	ctgtccgtca	cccctggaca	gccggcctcc	60
atctcctgca	agtctagtca	gagcctcctg	catagtgatg	gaaagaccta	tttatttttg	120
tacctgcaga	agccaggcca	gcctccacag	ctcctgatct	atggagtttc	caaccggttc	180
tctggagtgc	cagatagggt	cagtggcagc	gggtcagggg	cagatttcac	actgaaaatc	240
agccgggtgg	aggctgaaga	tgttgggggt	tattcctgca	tgcaaagttt	acagctattc	300
actttcggcc	ctgggaccaa	agtggatata	aaacgacgta	cggtggctgc	accatctgtc	360
ttcatcttcc	cgccatctga	tgagcagttg	aaatctggaa	ctgcctctgt	tgtgtgcctg	420
ctgaataact	tctatcccag	agaggccaaa	gtacagtggg	aggtggataa	cgccctccaa	480
tcgggtaact	cccaggagag	tgtcacagag	caggacagca	aggacagcac	ctacagcctc	540
agcagcacc	tgacgctgag	caaagcagac	tacgagaaac	acaaagtcta	cgcctgcgaa	600
gtcacccatc	agggcctgag	ctcgcccgtc	acaaagagct	tcaacagggg	agagtgt	657

10

<210> 160
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 160

ES 2 818 571 T3

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

<210> 161
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 818 571 T3

<400> 161

```

Asn Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20           25           30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
          35           40           45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50           55           60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
          85           90           95

Leu Gln Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115          120          125

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
          145          150          155          160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          165          170          175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
          180          185          190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
          195          200          205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

```

5

<210> 162

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

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

5

<210> 163

<211> 108

ES 2 818 571 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 163

5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 164

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 164

10

15

ES 2 818 571 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 165

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 165

10

Asn Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

ES 2 818 571 T3

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Ser Cys Met Gln Ser
85 90 95

Leu Gln Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105 110

Arg

<210> 166
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 166

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 167
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 167

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe
1 5 10 15

<210> 168
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 168

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe
1 5 10 15

<210> 169
<211> 7

ES 2 818 571 T3

	<212> PRT							
	<213> Homo sapiens							
5	<400> 169							
		Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Thr
		1				5		
	<210> 170							
10	<211> 7							
	<212> PRT							
	<213> Homo sapiens							
	<400> 170							
		Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
15		1				5		
	<210> 171							
	<211> 7							
20	<212> PRT							
	<213> Homo sapiens							
	<400> 171							
		Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
25		1				5		
	<210> 172							
	<211> 9							
30	<212> PRT							
	<213> Homo sapiens							
	<400> 172							
		Gln	Gln	His	Asp	Asn	Leu	Pro
		1				5		
35	<210> 173							
	<211> 8							
	<212> PRT							
	<213> Homo sapiens							
40	<400> 173							
		Met	Gln	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe
		1				5		
	<210> 174							
45	<211> 8							
	<212> PRT							
	<213> Homo sapiens							
	<400> 174							
50		Met	Gln	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe
		1				5		
	<210> 175							

ES 2 818 571 T3

<211> 187
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 175

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a un antígeno ST2 que tiene la secuencia de aminoácidos 19-556 del SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera como se establece en el SEQ ID NO: 96 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada como se establece en el SEQ ID NO: 30,
5 en donde el anticuerpo inhibe la unión de ST2 humano a IL-33 humana y en donde el anticuerpo reduce la señalización de ST2 mediada por IL-33 humana en células que expresan ST2 humano.
- 10 2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
3. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que se selecciona de un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG3 y un anticuerpo IgG4.
- 15 4. El anticuerpo aislado de la reivindicación 2 que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 85 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el SEQ ID NO: 19.
- 20 5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un diluyente farmacéuticamente eficaz.
6. Un ácido nucleico aislado que codifica un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 25 7. Una célula hospedadora recombinante que comprende un ácido nucleico aislado de la reivindicación 6 unido operativamente a un promotor.
8. La célula hospedadora recombinante de la reivindicación 7, en donde la célula hospedadora secreta un anticuerpo que se une a ST2.
- 30 9. La célula hospedadora recombinante de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde la célula es de origen mamífero, opcionalmente en donde la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 35 10. Un método para preparar un anticuerpo que se une a ST2, comprendiendo el método:
 - a) cultivar una célula hospedadora recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-9; y
 - b) aislar el anticuerpo de dicho cultivo.
- 40 11. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario o inflamatorio, en donde el trastorno autoinmunitario o inflamatorio es asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, fibrosis pulmonar, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, esclerosis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Behcet, enfermedad cardiovascular, rinosinusitis, poliposis nasal o bronquitis eosinofílica.
- 45 12. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera como se establece en el SEQ ID NO: 85 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada como se establece en el SEQ ID NO: 19.
- 50 13. El anticuerpo para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, en donde el trastorno autoinmunitario o inflamatorio es asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

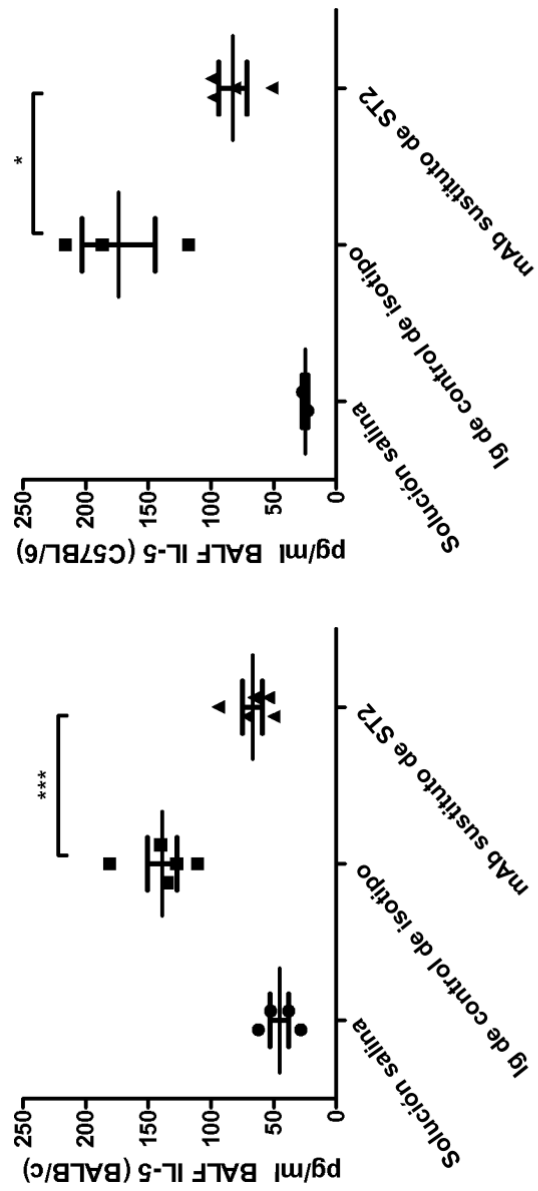


FIG. 1

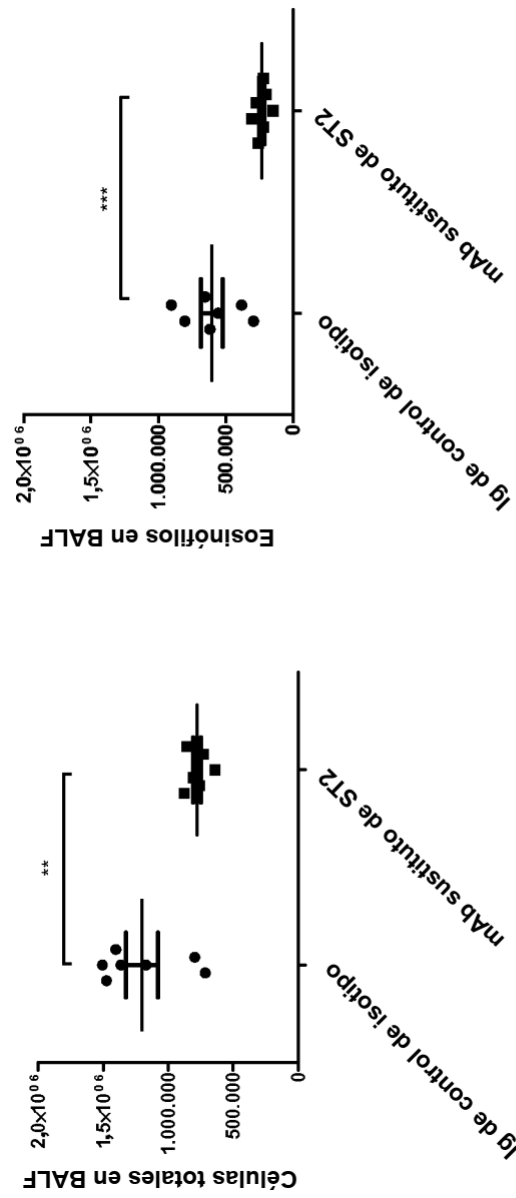
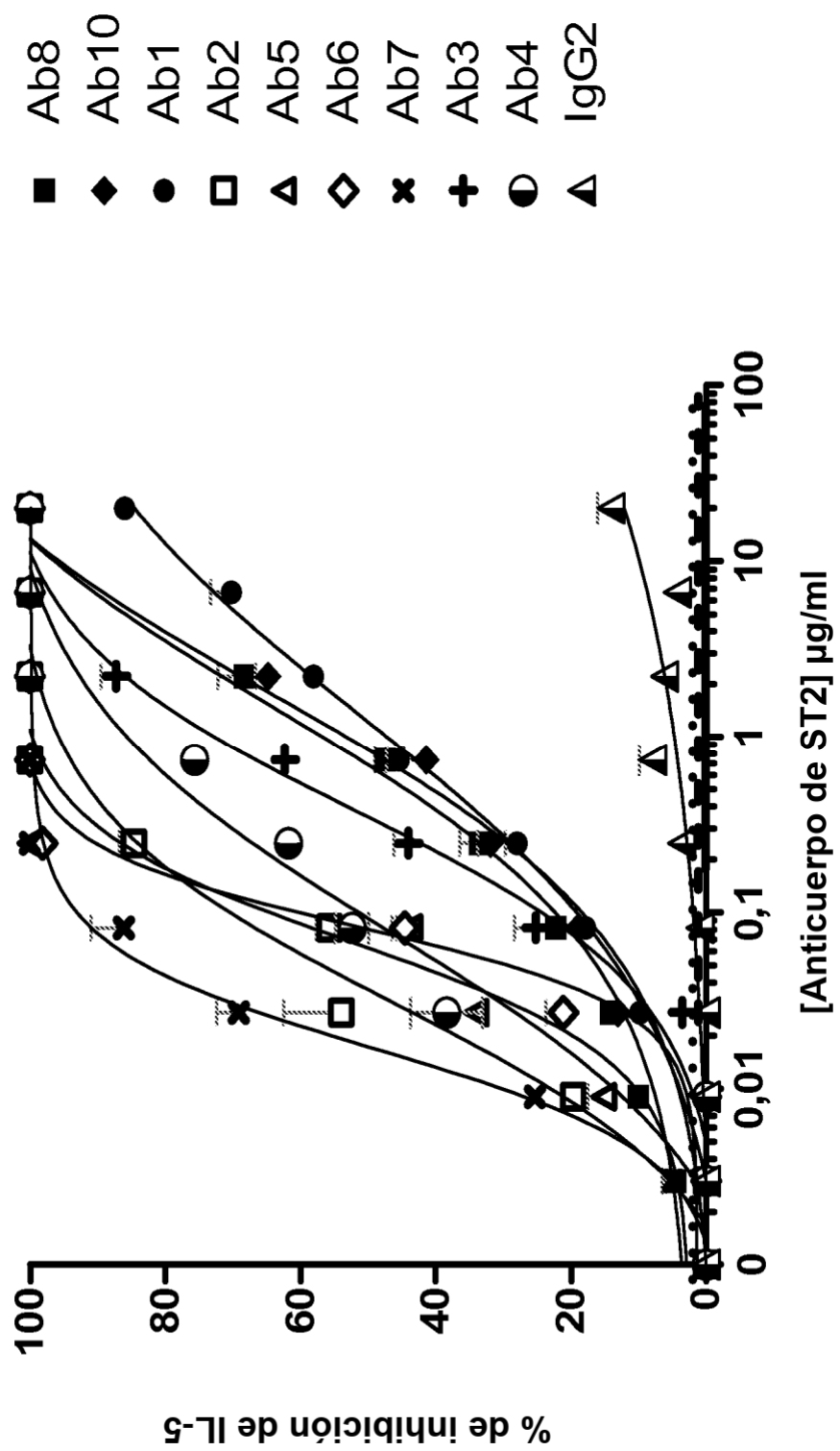


FIG. 2

FIG. 3



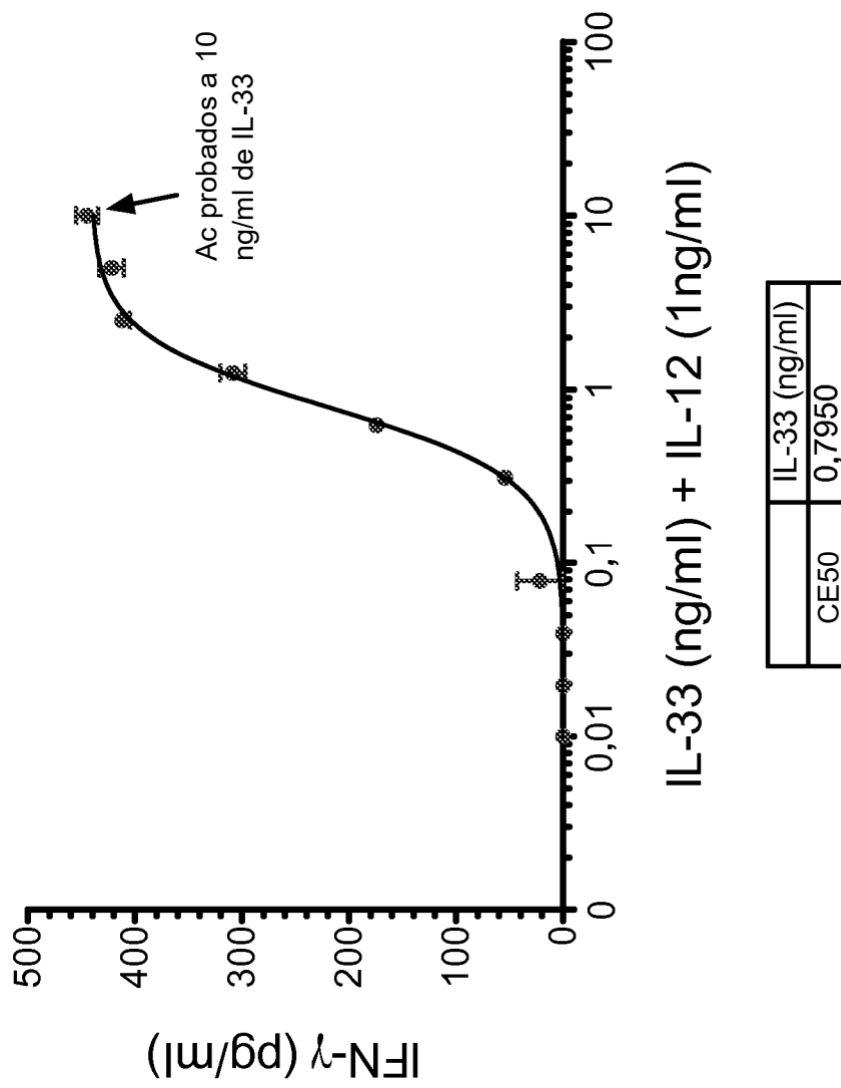


FIG. 4

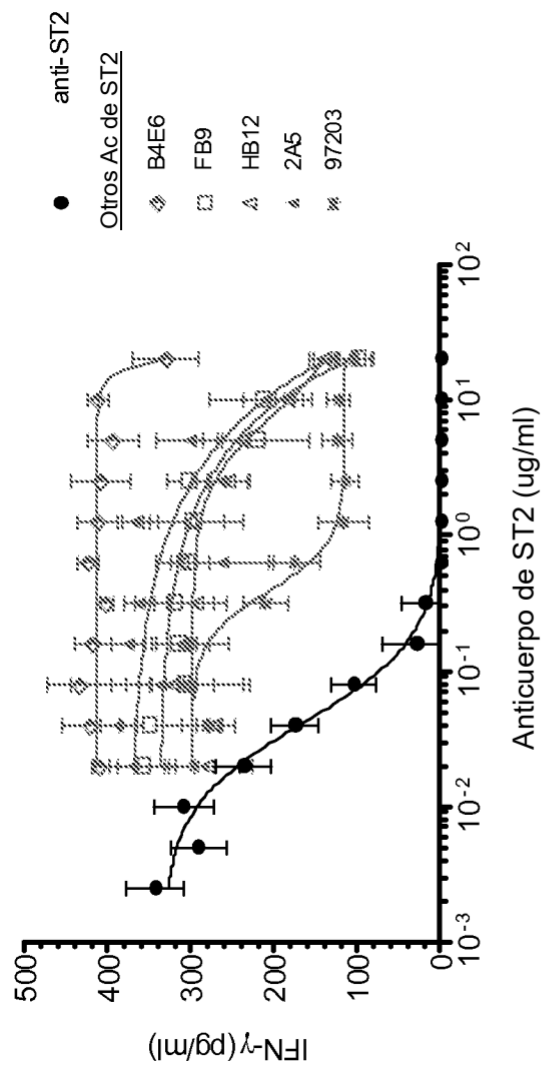


FIG. 5

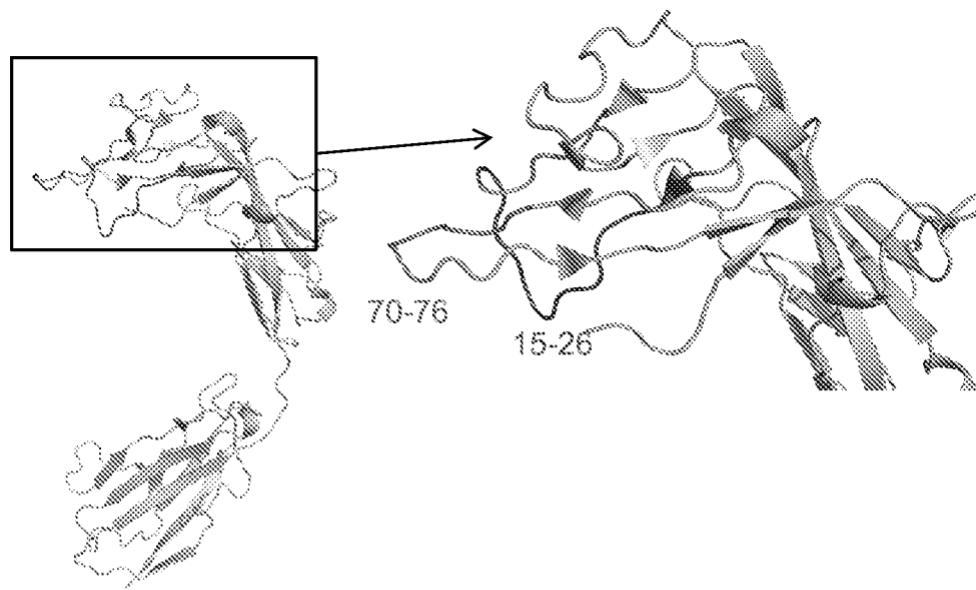


FIG. 6

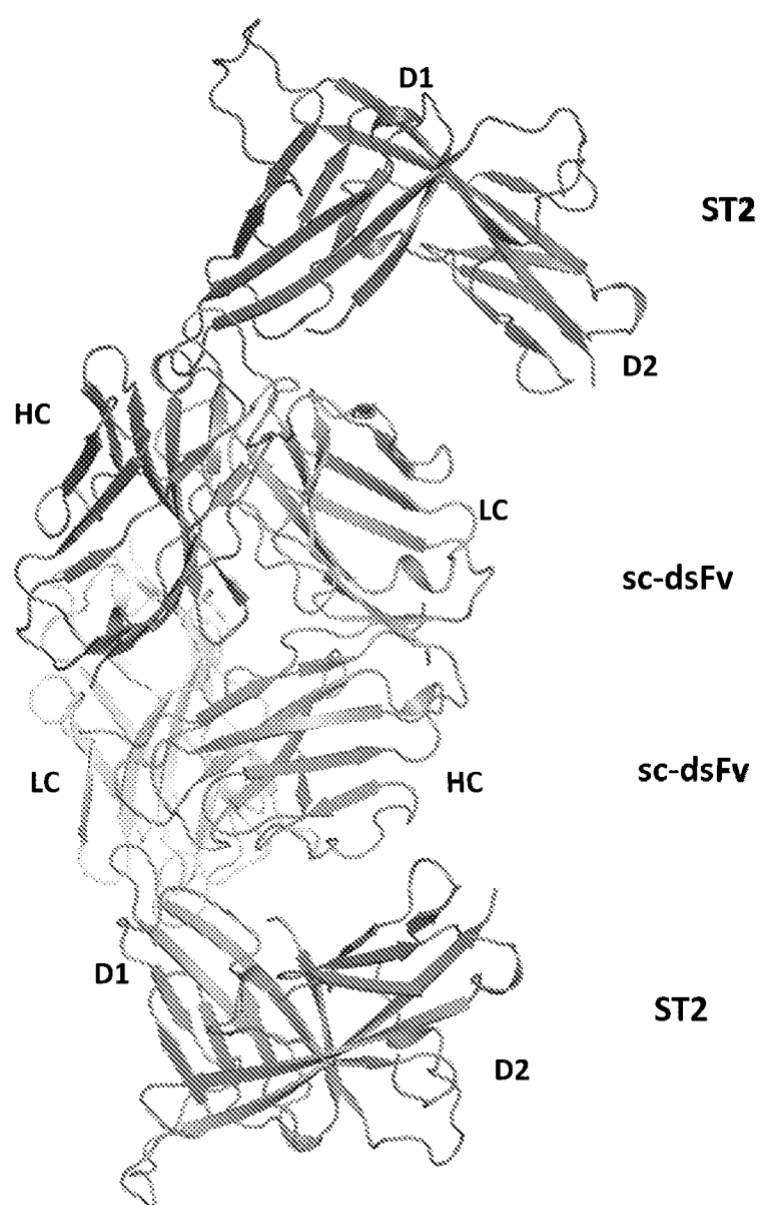


FIG. 7

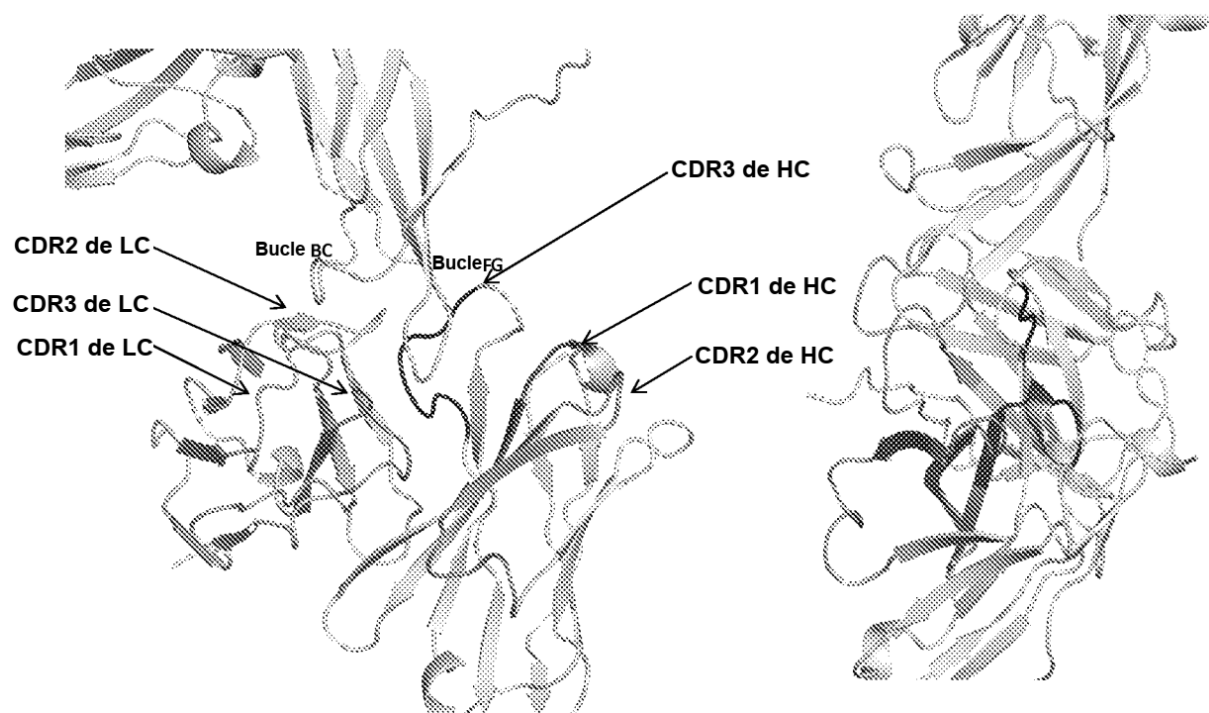


FIG. 8

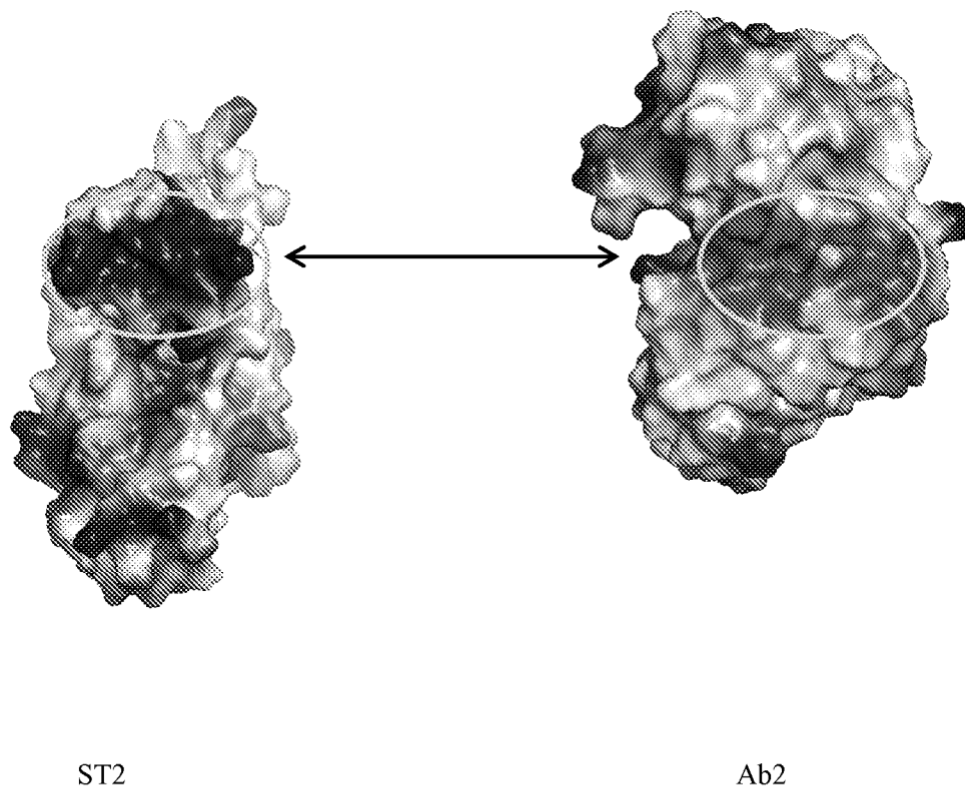


FIG. 9A

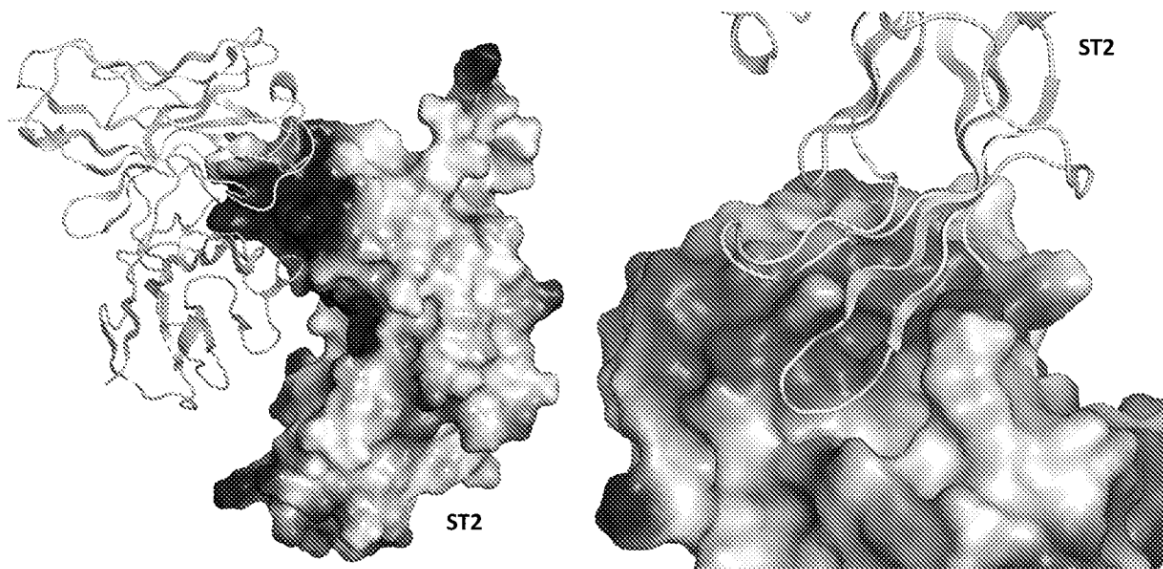


FIG. 9B

Región variable de HC de Ab2 (SEQ ID NO:30)

EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT **NYWIGWVRQM PGKGLEWMGI IYPGNSDTRF SPSFQQQVTI SADKSITTAY**

LQWSSLKASD TAMYICAR**HG TSSDY**YGLDV **WGQGT**TVTVS S

Región variable de LC de Ab2 (SEQ ID NO:96)

DIQMTQSPSS LSASVGDRTV IT**QQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD ASNLE**TVGVPS RFGSGSGTD FTFTISSLQP

EDIATYYC**QQ DDNFPLT**FGG GTKVEIKR

FIG. 10