Organizacion y Digitalizacion CSA Ltda.
CSA126014

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

21. EXPEDIENTE No. 10-63303

1/2

54. TÍTULO **"COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MICROBIANOS"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 38/20**

71. SOLICITANTE **GENENTECH, INC.**

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, ESTADO DE CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 2 [illegible]

(FORMA P 10)

07-06-2010

21

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-063303- -00000-0000
Fecha: 2010-05-26 16:30:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 323

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)	Nombre: **GENENTECH, INC.** Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América. Nacionalidad o Domicilio: South San Francisco, Estado de California, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Estado de Delaware, Estados Unidos de América. Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
(3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE** Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 39.690.713 TP 53.215
(4) INVENTOR(ES) (72)	Nombre: ABBAS, Alexander, R.; DANILENKO, Dimitry, M.; DE SAUVAGE, Frederic, J.; GHILARDI, Nico, P.; MODRUSAN, Zora; OUYANG, Wenjun; VALDEZ, Patricia, A. y ZHENG, Yan. Dirección: 2164 Carmelita Drive, San Carlos, CA 94070; 250 Lewis Avenue, Millbrae, CA 94030; 187 Shooting Star Isle, Foster City, CA 94404; 840 Brookside Lane, Millbrae, CA 94030; 3439 Isherwood Place, Fremont, CA 94536; 1057 Galley Lane, Foster City, CA 94404; 734 Grandview, San Francisco, CA 94114 y 3687 Gainsborough Terrace, Fremont, CA 94555. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.	

(5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/082890 Fecha: 07/11/08

Publicación Internacional No. WO 2009/062102 A3 Fecha: 14/05/09

(6) Título (54) **"COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MICROBIANOS"** (Folio 328)

(7) Clasificación Internacional (51) A61K 38/20

(8) Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	07/11/07	60/986,170
US	13/12/07	61/013,620
US	20/12/07	61/015,620

(9) Comprobante de Pago No. 10-30,008 **Fecha:** 20 de Abril de 2010

(10) **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Documento de Representación Legal.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones
- [ ] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- [ ] Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- [ ] Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] Arte Final 12X12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros: reporte de búsqueda internacional, publicación, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional y listado de secuencias.

(11) **FIGURA CARACTERISTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 30,008
FECHA : ABRIL 20 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-063303- -00000-0000
Fecha: 2010-05-26 16:30:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 323

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	52797264	19/04/2010	24,584,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL : $	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

2

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

Traducción Oficial Nº 10-31-191

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA
(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: TERI LEE
3. actuando en calidad de: Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello y estampilla de TERI LEE, Notario Público

CERTIFICADO

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCÍA
NOTARIA CUARENTA Y NUEVE (E.N.C.)

5. en Sacramento, California
6. el día tres (3) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario Adjunto de Estado, Estado de California
8. Número: **258054**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "The Great Seal of the State of California"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

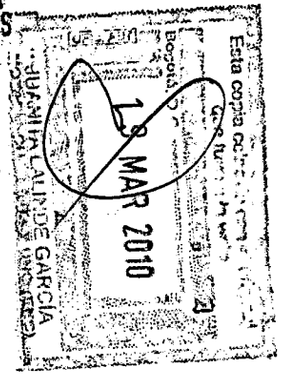
NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:58

174484

CUYA FIRMA APAREGE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



CALIFORNIA RECONOCIMIENTO PARA TODO FIN

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El día 13 de Septiembre, año 2005, ante mi, TERI LEE, Notario Público, compareció personalmente TIMOTHY R. SCHWARTZ, a quien personalmente conozco cómo la persona cuyo nombre suscribe el documento, y quien reconoció en mi presencia haber formalizado el mismo dentro de su investidura, y que mediante su firma en el documento, la persona o entidad en cuyo nombre actuó, formalizó el documento.

En TESTIMONIO firmo y sello

Firma (ilegible)

N. del T: hay un sello: TERI LEE, Comisión Nº 1514234, Notario Público, California, Condado de San Mateo.

OPCIONAL

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.N.C.)

Descripción del documento adjunto

Título o Clase de Documento: Colombia Power
Fecha: 9/13/2005
Número de páginas: 1
Firma diferente de la mencionada anteriormente: *Ninguna*

PODER DE REPRESENTACION LEGAL

Documento escrito en idioma Inglés y Español, suscrito por Genentech, Inc., con domicilio en 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, EEUU.

DADO Y FIRMADO EL DIA TRECE (13) DE Septiembre año 2005

Firma (ilegible)

N. del T.: Hay un sello de tinta: Timothy R. Schwartz, Ph. D.- Asesor Sección de Patentes – Genentech, Inc. – Signatario Corporativo Autorizado.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Traducción Oficial Nº 10-31-192

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265282**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado



N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

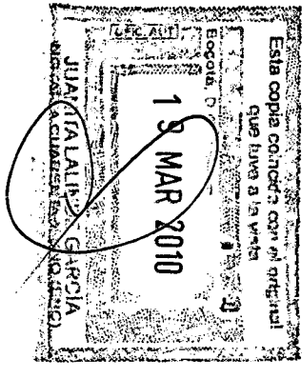
174485

COYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

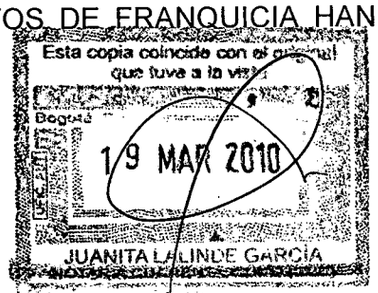
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE "GENENTECH, INC." ESTA DEBIDAMENTE INCORPORADO BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE DELAWARE Y GOZA DE BUENA REPUTACION Y TIENE EXISTENCIA CORPORATIVA LEGAL, TAL COMO LO MUESTRAN LOS REGISTROS DE ESTE DESPACHO, EN LA FECHA DEL SIETE (7) DE OCTUBRE, AÑO 2005.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE DICHO "GENENTECH, INC." FUE INCORPORADO EL DIA VEINTITRES (23) DE DICIEMBRE DEL AÑO 1986.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS REPORTES ANUALES HAN SIDO RADICADOS HASTA LA FECHA.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS IMPUESTOS DE FRANQUICIA HAN SIDO PAGADOS HASTA LA FECHA.



Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACIÓN: 4212779 FECHA 10-07-05

N. del T.:. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Traducción Oficial Nº 10-31-193

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265283**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado



N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174487

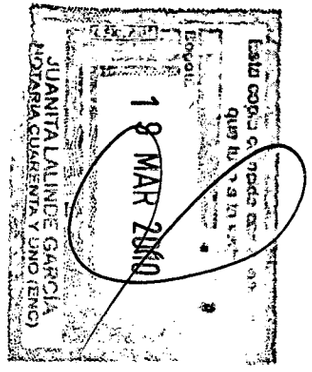
Albar Espand

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO REFORMULADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA VEINTIDOS DE JULIO DEL AÑO 1999, A LAS 9:00 A.M.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212780 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA

CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
MODIFICADO Y REFORMULADO
DE GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, por el presente modifica el Certificado de Incorporación de la Corporación, qué fue registrada originalmente el 23 de diciembre,1986 bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y posteriormente modificado.

El Certificado de Incorporación de la Corporación es por el presente reformulado y adicionalmente modificado, para leerlo en su integridad como sigue:

ARTÍCULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech Inc.

ARTÍCULO 2

La dirección del domicilio social de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, Condado de New Castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

Esta copia coincide con el original
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.N.)

ARTÍCULO 3

El objetivo social de la Corporación es llevar a cabo cualquier acto o actividad lícita para la cual puedan organizarse las corporaciones bajo la Ley Corporativa General del Estado de Delaware como la misma existe o cómo pueda modificarse de ahora en adelante ("Ley de Delaware").

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpeure Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

ARTICULO 4

SECCI0N 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas respectivamente, acción preferencial y

acción ordinaria. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de cuatrocientos millones (400.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, valor nominal $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trescientos millones (300.000.000) se denominarán acciones ordinarias, valor nominal $0.02 por acción ("**Acción Ordinaria**") La Acción Ordinaria de la Corporación, será toda de una clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones se puede aumentar o disminuir (pero no por debajo del número de acciones de las mismas, entonces circulación) mediante el voto afirmativo de una mayoría con poder de voto de la acciones en circulación de la Corporación tituladas para votar sobre ello, independiente de las disposiciones de la Sección 242(b)(2) de Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción ordinaria. (a) Emisión y Consideración.* Cualquiera Acción Ordinaria de tesorería o no emitida, puede emitirse para tal consideración según puede fijarse de acuerdo con la ley aplicable periódicamente por la Junta Directiva.

coincide con el original
que tuve a la vista
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CODAZZI

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(b) *Dividendos*. Sujeto a los derechos de los titulares de las Acciones Preferenciales, los titulares de las Acciones Ordinarias tendrán derecho a recibir, cuando y cómo lo declare la Junta Directiva, de los recursos de la Corporación que por ley están disponibles para éllo, dividendos pagables o en dinero en efectivo, o en propiedades, o en acciones y los titulares de Acciones Preferenciales no tendrán derecho a participar de tales dividendos (a menos que la Junta Directiva lo disponga de otra manera mediante una resolución, estipulando la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCI0N 4.03. *Acciones Preferenciales*

(a) Series y Límites de Variaciones entre las Series. Cualquier acción de tesorería o no emitida de Acciones Preferenciales puede emitirse periódicamente en una o más series para tal consideración, según puede fijarse periódicamente por la Junta Directiva. Antes de la emisión de alguna serie particular de Acciones Preferenciales, se debe registrar un certificado ante la Secretaría de Estado de Delaware manifestando la designación, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones a ser adjuntas a las Acciones Preferenciales de tal serie y cualesquiera otros asuntos que sean requeridos, y la Junta Directiva fijará y determinará; y por la presente está expresamente facultada para fijar y determinar, en la manera prevista por la ley, los pormenores de las acciones de tal serie (en tanto que no sean inconsistente con las disposiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluído, pero no limitado a lo siguiente:

(i) la designación característica de tal serie y el número de acciones que constituirán la misma, cuya cantidad puede aumentarse (excepto cuando la Junta Directiva lo disponga de otra manera en la creación de tal serie)

REBARA ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.N.C.)

disminuirse (pero no por debajo del número de acciones de las mismas entonces circulantes) periódicamente mediante acción similar de la Junta Directiva.

(ii) la tasa anual de dividendos pagables sobre acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales tales dividendos serán pagables y la fecha desde cuando los dividendos serán acumulativos; en tal evento la Junta Directiva determinará qué dividendos serán acumulativos;

(iii) si tal serie tendrá derecho a voto, además de los derechos de votación proporcionados por la ley, y si es así, las condiciones de tales derechos a voto;

(iv) si tal serie tendrá privilegios de conversión y, en ese caso, los términos y condiciones de tal conversión, incluído, pero no limitado a, disposiciones para el ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y en tal manera cómo lo determinará la Junta directiva;

(v) si o no, las acciones de tal serie serán redimibles y, en ese caso, los términos y condiciones de tal redención, incluso la fecha o fechas en o después de que ellas sean redimibles, y la cantidad pagable por acción en caso de redención, cuya cantidad puede variar bajo condiciones diferentes y en fechas diferentes de redención;

(vi) si tal serie tendrá un fondo de amortización para la redención o compra de acciones de esa serie y, en ese caso, las condiciones y cantidad de tal fondo de amortización;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de liquidación voluntaria o involuntaria, disolución o liquidación de la Corporación, y los derechos de prioridad relativos, si los hay, de pago de acciones de esa serie; y

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que reposa en la web
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA

(viii) cualesquiera otros derechos relacionados preferencias y limitaciones de tal serie.

ARTÍCULO 5

SECCIÓN 5.01. *Modificación de los Estatutos por los Directores.* (a.) En apoyo y no en limitación a los poderes conferidos por el estatuto, la Junta Directiva está autorizada expresamente para formular, modificar, corregir, derogar, y rescindir los estatutos de la Corporación, sujeto a las Secciones 5.01(b) y 5.01(c) del presente.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, y 5.06, de los estatutos sólo pueden ser modificados, corregidos, derogados, o rescindidos mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultados para votar sobre ello y que representen más del 60% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario titulados para votar sobre ello, y que representen más del 90% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

SECCIÓN 5.02. *Modificación del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación sólo puede modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para Votar sobre ella, que representen más del 60% de

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA DUARENTA Y CUATRO

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial

las acciones tituladas para ser votado sobre ello. La sección 5.01 (c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para votar sobre ello, que representen más del 90% de las acciones tituladas para ser votado sobre ello.

ARTÍCULO 6

SECCIÓN 6.01 - *Elección de Directores por los Titulares de Acciones Preferenciales.*

Durante cualquier período cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o una o más series de las mismas, votando como una clase, sean titulados para elegir un número específico de directores, por razón de dividendos vencidos u otras disposiciones otorgándoles el derecho para hacerlo, entonces y durante ese periodo de tiempo mientras continúe el derecho (i) el entonces autorizado número de directores se aumentará por tal número especificado de directores, y los titulares de tales Acciones Preferenciales o tal serie de las mismas, votando como una clase, se facultarán para elegir a los directores adicionales previstos, de conformidad con las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie; (ii) cada director adicional desempeñará el cargo durante tal término y tendrá tales poderes de votación como sea expresado en las disposiciones relacionadas con las Acciones Preferenciales o serie; y (iii) cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o serie de las mismas son despojados de tales derechos para elegir un número específico de directores, votando como una clase, conforme a las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie, los periodos del cargo de todos los directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, votando como una clase conforme a tales

Esta copia
que tuve a la vista
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCÍA
NOTARIO PÚBLICO

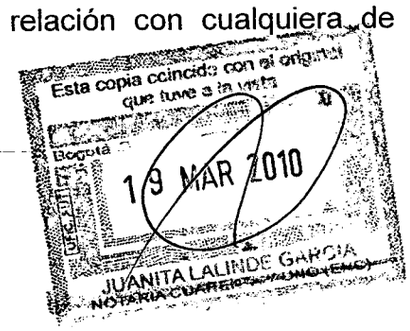
ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial

disposiciones, o eligieron llenar alguna vacante resultante de la muerte, dimisión o remoción de directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, terminará inmediatamente y el número autorizado de directores por consiguiente, se reducirá.

SECCIÓN 6.02. *Papeletas de votación.* Las elecciones de directores en una asamblea anual o especial no necesitan ser mediante papeletas escritas, a menos que los estatutos de la Corporación lo dispongan de otra manera.

SECCIÓN 6.03. *Eliminación de Cierta obligación Personal de los Directores.* (a.) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por los daños y perjuicios por contravención de deberes fiduciarios monetarios como director, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y los herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quién era o es una parte o es amenazada ser hecha una parte a, o está involucrada en alguna amenaza, pendiente o a cumplirse, de acción, demanda o procedimiento, sea civil, penal, administrativo o investigativo, por causa del hecho que tal persona es o fue un director de la Corporación, o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fideicomiso u otra empresa, será indemnizada y será exonerada de responsabilidad por la Corporación, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware - El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 también incluirá el derecho a ser pagado por la Corporación por los gastos incurridos en relación con cualquiera de tales



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial

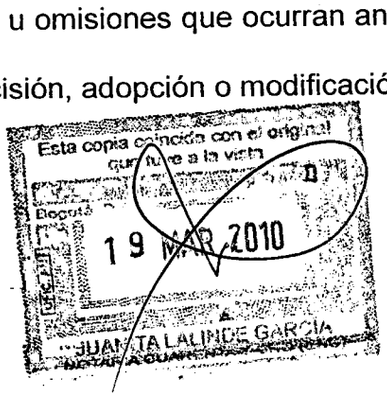
procedimientos, anticipadamente a la disposición final, hasta el máximo punto autorizado por la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, mediante la acción de su Junta Directiva, proporcionar la indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta el alcance y hasta tal efecto como lo determine la Junta Directiva que sea apropiado y autorizado por la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá la facultad para adquirir y mantener seguros en nombre de cualquier persona que es o fue director, funcionario, empleado o agente, de la Corporación o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente, de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fiduciaria u otra empresa; contra cualquier gasto, obligación o pérdida, incurrida por tal persona en cualquier capacidad o surgida de su status como tal, la Corporación tuviera o no la facultad para indemnizarlo contra tal obligación bajo la Ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán excluyentes de cualquier otro derecho el cual cualquier persona de otra manera pudiera tener o adquirir de ahora en adelante.

(f) Ni la modificación, corrección, derogación o rescisión, de esta Sección 6.03, ni la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación o los Estatutos de la Corporación, tampoco, al alcance máximo permitido por la Ley de Delaware, cualquier modificación legal, eliminará o reducirá el efecto de esta Sección 6.03 con respecto de cualesquier actos u omisiones que ocurran antes de tal modificación, corrección, derogación, rescisión, adopción o modificación.



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial

ARTÍCULO 7

SECCION 7.01. *Sección 203 de Ley de Delaware.* La Corporación por el presente, elige no ser regida por la Sección 203 de Ley de Delaware.

ARTÍCULO 8

SECCIÓN 8.01. *Relación con Roche.* En anticipación a que la Corporación deje de ser una subsidiaria totalmente propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se definió en la Sección 8.05) siga siendo accionista de la Corporación, y en anticipación a que la Corporación (como se definió en la sección 8.05) y Roche puedan involucrarse en similares o en las mismas actividades o líneas comerciales y tengan interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus continuas relaciones contractuales, corporativas y comerciales con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades inherentes a cualquier director quien desea y se esfuerza plenamente para satisfacer tales obligaciones fiduciarias del director, en la determinar el alcance total de tales obligaciones en una situación particular, las disposiciones de este Artículo 8 son expresadas para regular, definir y guiar la conducta de ciertos negocios de la Corporación por cuanto ellos pueden involucrar a Roche y a sus funcionarios y directores, y las facultades, derechos obligaciones y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con las mismas.

SECCIÓN 8.02. *Actividades Comerciales Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc - pueda de otro modo aceptar por escrito.

Esta copia coincide con el original que fue a la vista
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y CUATRO

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial

(a) Roche no tendrá una obligación de abstenerse, de comprometerse directa o indirectamente, en las mismas o similares actividades comerciales o líneas comerciales como la Corporación, y

(b) ni Roche ni ningún funcionario o director del mismo serán responsables ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario por causa de cualquiera de tales actividad de Roche o de la participación en ello de tal persona.

En caso que Roche tenga conocimiento de una transacción potencial o materia que pueda ser una oportunidad corporativa para Roche y la Corporación;

Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario como accionista de la Corporación o persona controladora de un accionista por el hecho que Roche prosiga o adquiera tal oportunidad corporativa para sí misma, dirija tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad o no comunique la información referente, o no ofrezca tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.03. *Oportunidades Corporativas*. En caso que un director, funcionario o empleado de la Corporación que también es director, funcionario o empleado de Roche, tenga conocimiento de una transacción potencial o material que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (si tal transacción potencial o material es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación), tal director, funcionario o empleado tendrá el privilegio de ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o a Roche, según tal director, funcionario o

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCÍA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés

empleado, lo juzgue apropiado bajo las circunstancias y a su entera discreción; y ningún director, funcionario o empleado, será responsable ante la Corporación o ante sus Accionistas por la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta de actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por causa del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado, ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de la Corporación) o no comunicó la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para sí mismo o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 8.

SECCIÓN 8.05. *Definiciones.* Para los propósitos de este Artículo 8 y Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" significará la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas, asociaciones y otras entidades en las cuales la Corporación posea beneficiosamente (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones votantes en circulación, poder de voto o intereses de votación similares, y (ii) el término "**Roche**" significará Roche Holdings, Inc. y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas , asociaciones y otras entidades (diferentes de la

Esta copia coincide con el que fue a la vista
Bogotá
18 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.N.C.)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés

Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta Sección 8.05) que son las "**afiliadas**" (como se definió en la Norma 12b-2 bajo las Leyes de la Bolsa de Valores (Securities Exchange) de 1934, (según enmienda) de Roche Holdings. Inc.

SECCIÓN 8.06. *Terminación: Efecto Vinculante*. No obstante algo al contrario en este Certificado de Incorporación, las disposiciones anteriores de este Artículo 8 expirarán en la fecha cuando Roche deje de poseer Acciones Ordinarias que representen por lo menos el 5% del número de acciones circulantes de Acciones Ordinarias de la Corporación y ninguna persona que siendo director o funcionario de la Corporación, sea también director o funcionario de Roche. Tampoco tal expiración, ni la modificación, corrección, cambio o derogación, de cualquier provisión de este Artículo 8, tampoco la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación Enmendado y Reformulado, inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 8, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 8, se acumulara o surgiera, antes de tal expiración, modificación, corrección, revocación o adopción.

SECCIÓN 8.07. *Artículo 9*. Las disposiciones de este Artículo 8 son adiciones a las disposiciones del Artículo 9.

ARTÍCULO 9

SECCIÓN 9.01. *Acuerdos no Invalidados*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de ellos) entre

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA

ILBARA. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial

la Corporación y Roche será inválido, nulo o anulable, solamente por la razón que Roche es una de las partes de ellos o solamente porque algunos directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados con Roche, están presentes en o participan en la asamblea de la Junta Directiva o comité de los mismos, lo cual autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, corrección, modificación o terminación, o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito; pero tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de los mismos) se regirá por las disposiciones de estos Estatutos de la Corporación Modificados y Reformulados, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y alguna otra ley aplicable. Para los propósitos de este Artículo 9, las expresiones la "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados manifestados en la Sección 8.05.

SECCIÓN 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que también son directores o funcionarios de Roche pueden ser contabilizados en la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba algún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo). Las Acciones Circulantes Ordinarias poseídas por Roche pueden contabilizarse para la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de accionistas que autoriza o aprueba cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo).

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALI DE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y CINCO DEL CIRCULO

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés

SECCIÓN 9.03 - *Ninguna Responsabilidad Por Actividades de Buena Fe.* Roche ni cualquier funcionario o director será responsable ante la Corporación o ante los accionistas para la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta para actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por el hecho de que Roche o algún funcionario o director del mismo, emprende cualquier acción o ejerce algunos derechos o entrega o retiene de buena fe cualquier aprobación en relación con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto sufragado u otra acción tomada por alguna persona que es director, funcionario u otro representante de Roche, cuyo voto es sufragado o tal persona emprende una acción en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho por o un consentimiento de Roche para los efectos de algún acuerdo o contrato.

SECCIÓN 9.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas*. Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 9.

SECCIÓN 9.05 - *Contratos Protegidos*. Para los propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o con cualquier corporación, sociedad, empresa conjunta, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posea beneficios (directa o indirectamente) del cincuenta por ciento o más de la acciones votantes en circulación, poder de

Esta copia coincide con el que se me presentó
9 MAY 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial

voto o intereses de votación similares, se juzgará ser un contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación.

SECCIÓN 9.06. *Efecto Vinculante.* Ni la modificación, corrección, cambio o derogación de cualquier provisión de este Artículo 9, tampoco la adopción de cualquier provisión inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 9, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 9, se acumulara o surgiera, antes de tal alteración, modificación, cambio, revocación o adopción.

SECCIÓN 9.07. *Artículo 8.* Las disposiciones de este Artículo 9 son en adición a las disposiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado, habiendo sido debidamente adoptado de acuerdo con las Secciones 242 y 245 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware y por el consentimiento escrito del único accionista de la Corporación de acuerdo con la Sección 228 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, ha sido otorgado este día veintidós (22) de Julio, 1999.

GENENTECH, INC.
Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título; Vicepresidente Senior.
Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C. 19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCÍA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.N.C.)

Traducción Oficial Nº 10-31-194

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265284**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

Esta copia coincide con el original que fue presentado a la vista en Bogotá D.C. 19 MAR 2010

JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (ENC)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

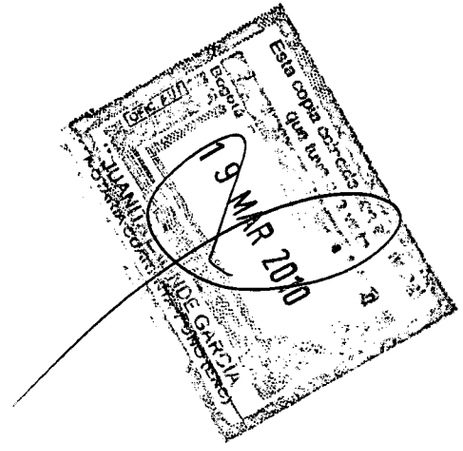
174488

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO DE MODIFICACION DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA QUINCE (15) DE MAYO DEL AÑO 2000, A LAS 5:00 P.M.

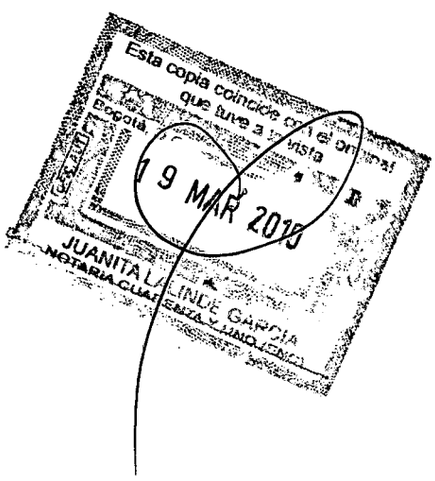
Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212781 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office, Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 05:00 PM 05/15/2000
001245251 – 2112549

CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de setecientos millones

Esta Copia es fiel con el original a la vista
18 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (ENC)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(700.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día quince (15) de Mayo, año 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

Esta copia es fiel y exacta con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C. 19 MAR 2010
JUANITA LA[illegible] DE GARCIA
NOTARIA CINCUENTA Y UNO (51)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Traducción Oficial Nº 10-31-195

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265285**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

Esta copia es fiel y exacta de la original
Bogotá D.C.
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (41) (E)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

17448

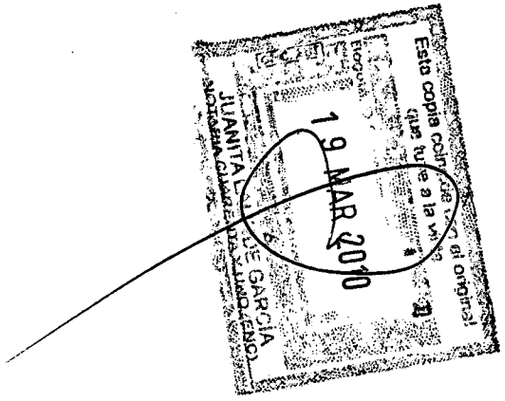
Ilbar Espand

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ (10) DE MAYO DEL AÑO 2001, A LAS 2:05 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212782 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 02:05 PM 05/10/2001
010226224 – 2112549

CERTIFICADO DE MODIFICACION DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de mil trescientos millones

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.N.O.)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(1.300.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Un mil doscientos millones (1.200.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez (10) de Mayo, año 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

Esta copia es fiel y exacta de la que me fue presentada con el original para su autenticación. Bogotá D.C. 19 MAR 2010 JUANITA ALINDE GARCIA

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Traducción Oficial Nº 10-31-196

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265286**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (ENC)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174490

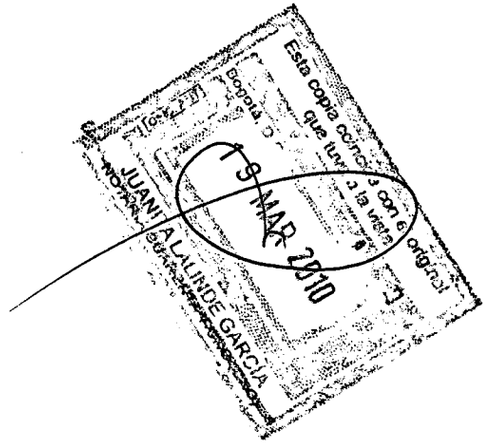
Ilbar Español

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 11:00

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

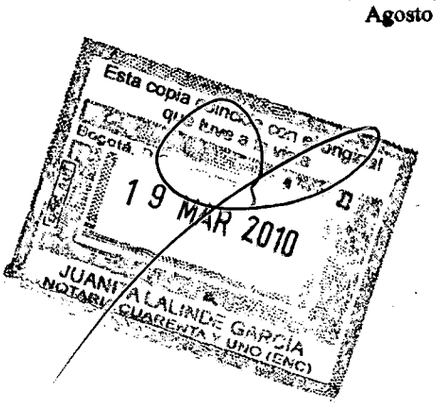
YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ Y SEIS (16) DE ABRIL DEL AÑO 2004, A LAS 7:39 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212783 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 07:39 PM 04/16/2004
040281669 – 2112549

CERTIFICADO DE TERCERA MODIFICACION DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de tres mil cien millones

Esta copia es fiel y exacta que concuerda con el original que tuve a la vista
Bogotá
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCÍA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (41) (E.N.)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(3.100.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3.000.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez y seis (16) de Abril, año 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

Copia coincide con el que he tenido a la vista

19 MAR 2010

JUANA LALINDE GARCIA

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by TERI LEE*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of TERI LEE, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 3rd day of October 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 258054*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*

Esta copia ... Bogotá, D.C. ... 19 MAR 2010 ... JUANITA LALINDE GARCIA NOTARIA CUARENTA Y UNO (ENC)

OFFICE OF THE SECRETARY OF STATE

Secretary of State

BY

NP-24 A (REV. 4-05) OSP 05 90772

191

37

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss.

On 9/13/2005 (Date) before me, Teri Lee, Notary Public (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")),

personally appeared Timothy R. Schwartz (Name(s) of Signer(s)),

☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/~~they~~ executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity(~~ies~~), and that by his/~~her/their~~ signature(~~s~~) on the instrument the person(~~s~~), or the entity upon behalf of which the person(~~s~~) acted, executed the instrument.

TERI LEE
Commission # 1514234
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Sep 18, 2006

WITNESS my hand and official seal.

Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Colombia Power

Document Date: 9/13/2005 Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: None

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name:

☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s):
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other:

Signer Is Representing:

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

Los abajo firmados,

GENENTECH, INC.
Una sociedad organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware [illegible], Estados Unidos de America.

con domicilio en

1 DNA way
South San Francisco, CA 94080, USA

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado a los 13 dias de Sep. 2005

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

The undersigned,

Genentech, Inc
A Corporate organized and existing under the laws od State of Delaware, E.U.A
domiciled at

1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, USA

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

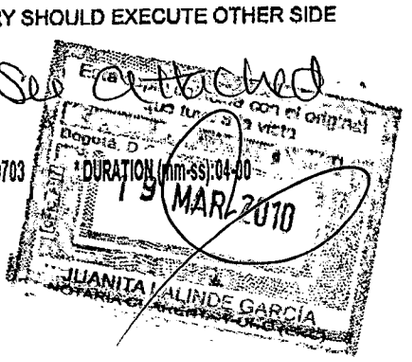
Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 13 Sept 2005

NOTA RY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

See Attached



(2)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

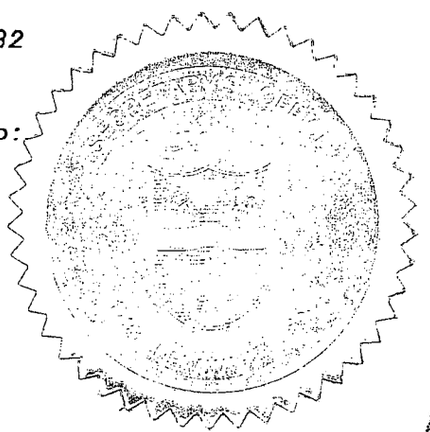
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265282

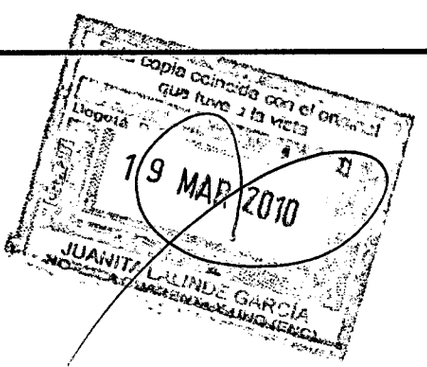
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

The First State

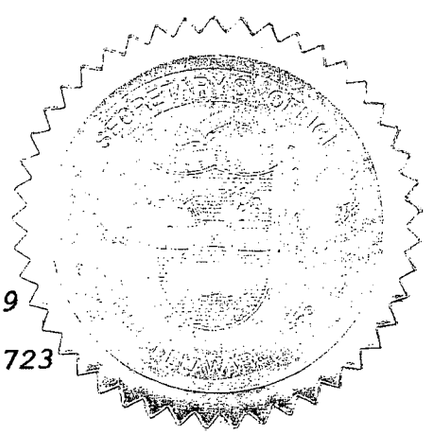
I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "GENENTECH, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE SEVENTH DAY OF OCTOBER, A.D. 2005.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "GENENTECH, INC." WAS INCORPORATED ON THE TWENTY-THIRD DAY OF DECEMBER, A.D. 1986.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212779

DATE: 10-07-05

(3)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

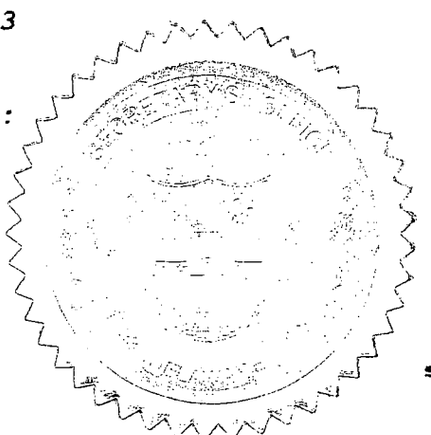
5. *at Dover, Delaware*

6. *the seventh day of October, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265283*

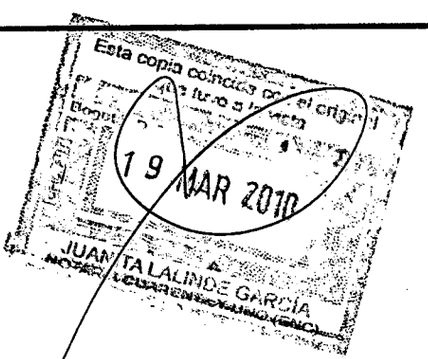
9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

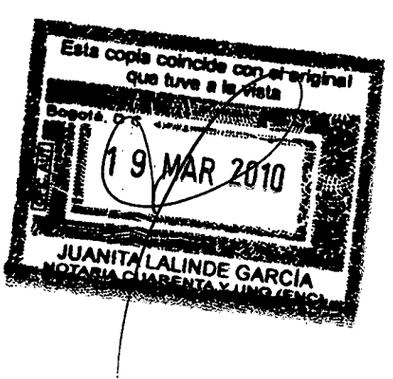


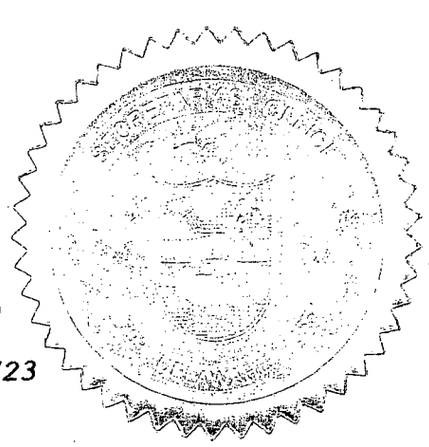
193

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212780

DATE: 10-07-05

AMENDED AND RESTATED

CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "**Corporation**"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

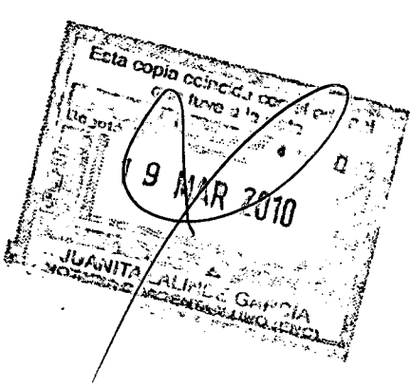
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("**Delaware Law**").



STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549

ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("**Preferred Stock**"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("**Common Stock**") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

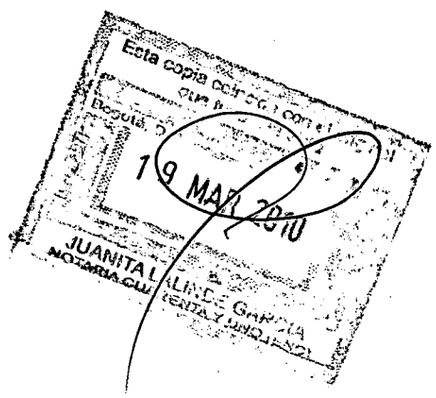
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

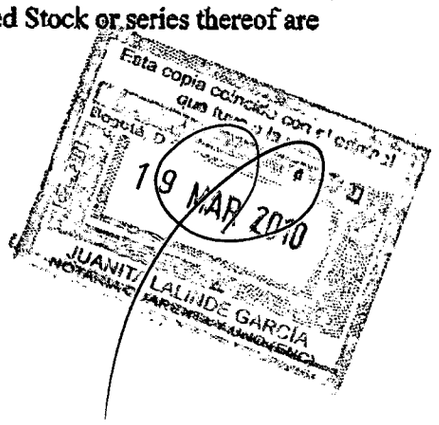
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

SECTION 6.02. *Ballots*. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors*. (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or

Esta copia corresponde con el original
19 MAR 2010
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (ENC)

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or recission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, recission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities



of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

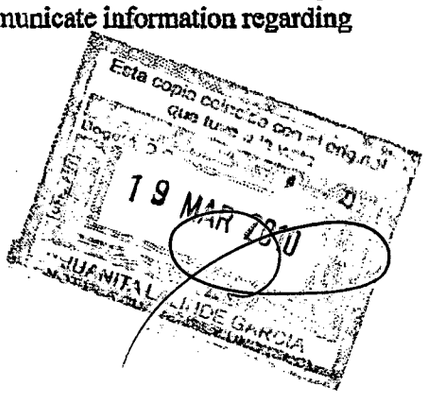
SECTION 8.02. *Similar Business Activities*. Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities*. In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

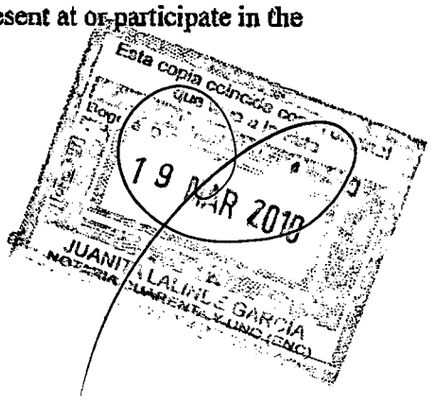
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term **"Corporation"** shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term **"Roche"** shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are **"affiliates"** (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination; Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the



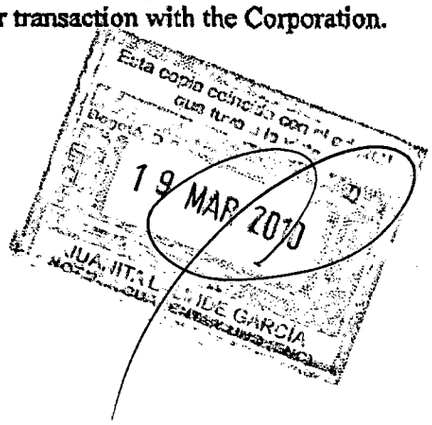
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "**Corporation**" and "**Roche**" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer of director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

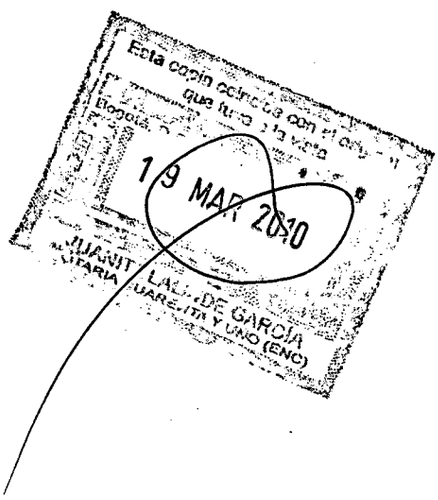
SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

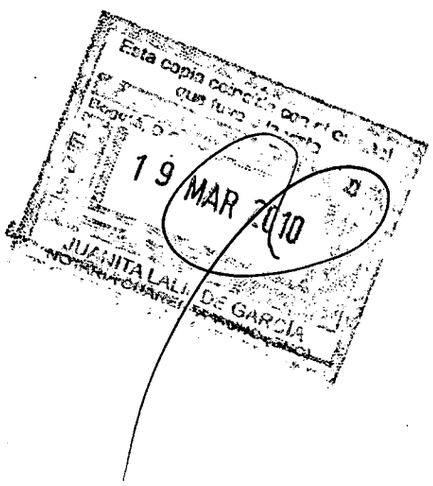
SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



(4)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

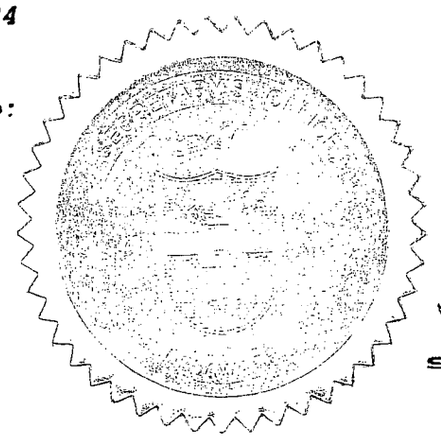
5. *at Dover, Delaware*

6. *the seventh day of October, A.D. 2005*

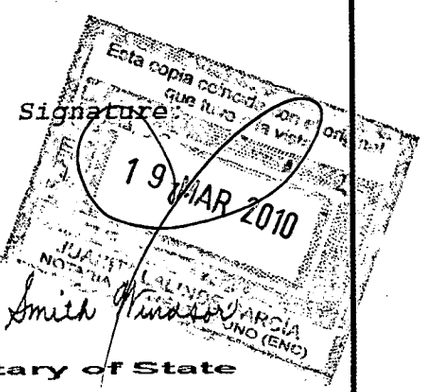
7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265284*

9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*



Harriet Smith Windsor

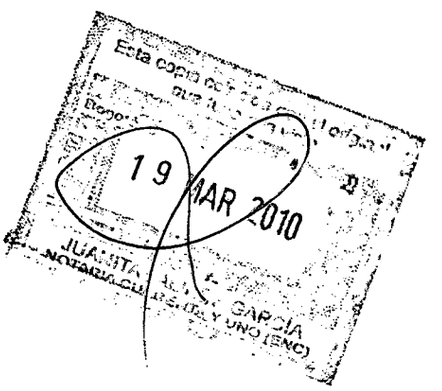
Secretary of State

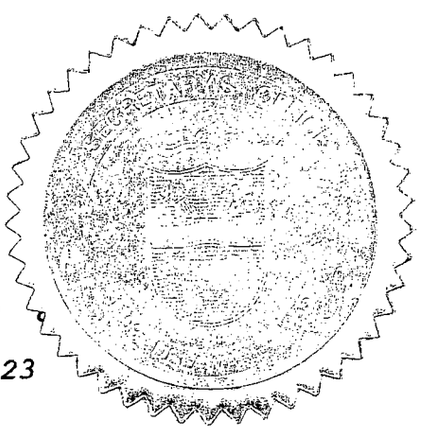
194

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212781

DATE: 10-07-05

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 05:00 PM 05/15/2000
001245251 - 2112549

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

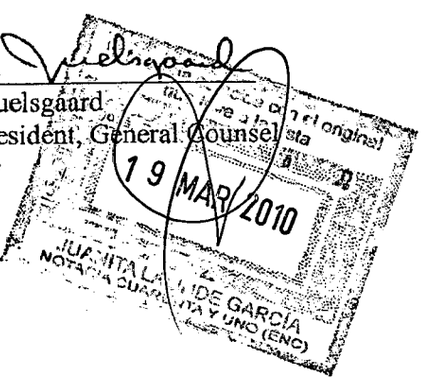
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary



75841

(5)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

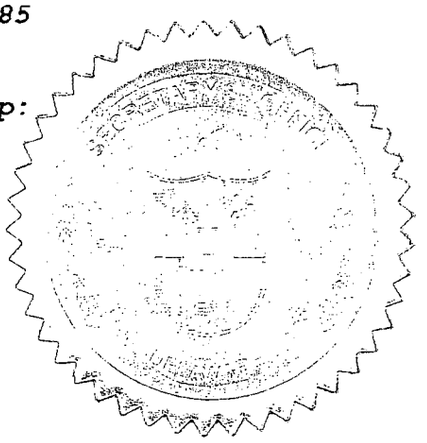
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265285

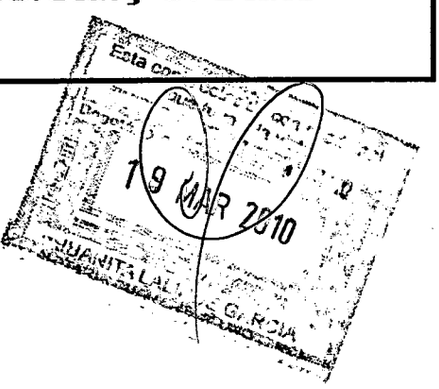
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.

2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212782

DATE: 10-07-05

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 02:05 PM 05/10/2001
010226224 - 2112549

S ////STATE/OF/DELAWARE///// V
T ///SECRETARY/OF/STATE///// O
A DIVISION/OF/CORPORATIONS// I
M FILED/02:00/AM/05/10/2001/ D
P ///010226224/+/2112549////
BY Sandy Miller

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

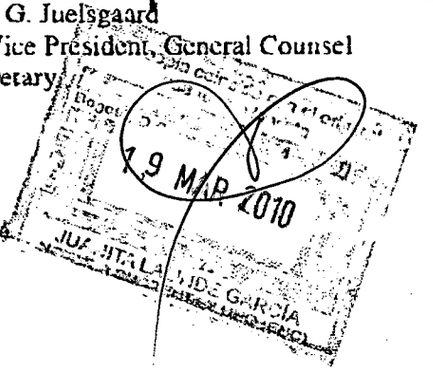
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary



80747

(6)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

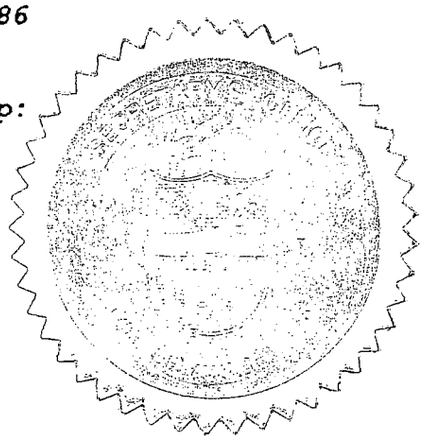
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265286

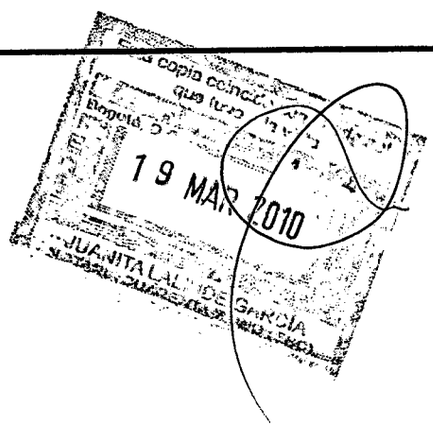
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



196

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.

2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212783

DATE: 10-07-05

18 MAR 2010

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SRV 040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

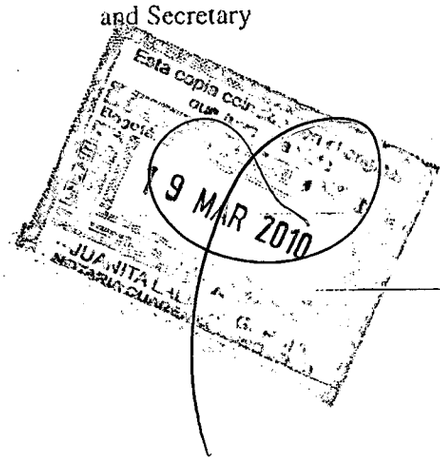
GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel and Secretary

#153087



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 26-05-10

(30) Prioridad

(31) *No. Prioridad*	(32) *Fecha*	(33) *País*
60/986,170	07-11-07	US
61/013,620	13-12-07	US
61/015,620	20-12-07	US

(51) Int Cl: A61K 38/20

(71) Solicitante(s): **GENENTECH, INC.**

(72) Inventor(es): ABBAS, Alexander, R.; DANILENKO, Dimitry, M.; DE SAUVAGE, Frederic, J.; GHILARDI, Nico, P.; MODRUSAN, Zora; OUYANG, Wenjun; VALDEZ, Patricia, A. y ZHENG, Yan.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 07-06-10

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 07-11-08
No. de solicitud: ***PCT/US2008/082890***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***14-05-09***
N° publicación: ***WO 2009/062102 A3***

(54) Titulo: **COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MICROBIANOS**

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un método para el tratamiento de una infección por un patógeno microbiano en un sujeto, mediante la modulación de una respuesta inmune anti-microbiana en dicho sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un polipéptido anti-microbiano (AMP), en donde dicho AMP es IL-22.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT __X__ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL __

(21) N° de solicitud:
(22) Fecha de solicitud: 26-05-10
(51) Clasificación Internacional: A61K 38/20

(71) Solicitante(s): **GENENTECH, INC.**

(72) Inventor(es): ABBAS, Alexander, R.; DANILENKO, Dimitry, M.; DE SAUVAGE, Frederic, J.; GHILARDI, Nico, P.; MODRUSAN, Zora; OUYANG, Wenjun; VALDEZ, Patricia, A. y ZHENG, Yan.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) ***No. Prioridad***	(32) ***Fecha***	(33) ***País***
	60/986,170	07-11-07	US
	61/013,620	13-12-07	US
	61/015,620	20-12-07	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 07-06-10
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 07-11-08
No. de solicitud: ***PCT/US2008/082890***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***14-05-09***
N° publicación: ***WO 2009/062102 A3***

(54) Titulo: **COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MICROBIANOS**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 26-05-10
(51) Clasificación Internacional: A61K 38/20

(71) Solicitante(s): **GENENTECH, INC.**

(72) Inventor(es): ABBAS, Alexander, R.; DANILENKO, Dimitry, M.; DE SAUVAGE, Frederic, J.; GHILARDI, Nico, P.; MODRUSAN, Zora; OUYANG, Wenjun; VALDEZ, Patricia, A. y ZHENG, Yan.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad

(31) *No. Prioridad*	(32) *Fecha*	(33) *País*
60/986,170	07-11-07	US
61/013,620	13-12-07	US
61/015,620	20-12-07	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 07-06-10
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 07-11-08
No. de solicitud: ***PCT/US2008/082890***

(87) Publicación internacional:
Fecha: ***14-05-09***
No. Publicación : ***WO 2009/062102 A3***

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Titulo:

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MICROBIANOS

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

Un método para el tratamiento de una infección por un patógeno microbiano en un sujeto, mediante la modulación de una respuesta inmune anti-microbiana en dicho sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un polipéptido anti-microbiano (AMP), en donde dicho AMP es IL-22.

JPB/RS
GNE-0303 WO

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
GOODWIN PROCTER LLP
Attn. Jeffrey P. Bernhardt
135 Commonwealth Drive
Menlo Park CA 94025
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Received
AUG 25 2009
Goodwin Procter LLP
Silicon Valley Office

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference GNE-0303PCT	Date of mailing *(day/month/year)* 19/08/2009
International application No. PCT/US2008/082890	**FOR FURTHER ACTION** See paragraphs 1 and 4 below
Applicant GENENTECH, INC.	International filing date *(day/month/year)* 07/11/2008

1. [x] The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

   Filing of amendments and statement under Article 19:
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

   When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Fascimile No.: (41-22) 338.82.70

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. [ ] The applicant is hereby notified that no International search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. [ ] **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   [ ] the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   [ ] no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

   Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90*bis*.1 and 90*bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

   The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

   Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

   In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Gabriele Pfitzner

Form PCT/ISA/220 (October 2005)

(See notes on accompanying sheet)

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims,description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped),whether

(i) the claim is unchanged;

(ii) the claim is cancelled;

(iii) the claim is new;

(iv) the claim replaces one or more claims as filed;

(v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."

2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."

3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."

4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1–10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43*bis*.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
GNE-0303PCT		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2008/082890	07/11/2008	07/11/2007
Applicant		
GENENTECH, INC.		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International search report consists of a total of 7 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This International search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [X] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
      [ ] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [X] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/082890

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [X] filed together with the international application in electronic form

   [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/082890

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/20 A61K38/16 A61P31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, GENSEQ, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/61617 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC [US]; RUBEN STEVEN M [US]; EBNER REINHARD [U) 2 December 1999 (1999-12-02) abstract pages 6,7 page 73 - page 79 page 83, line 5 - line 20 page 116, line 22 page 117, line 10 - line 31	1,3, 5-10, 15-23,28
Y	-----	24,26,27
X	WO 02/29098 A (ISIS INNOVATION [GB]; HILL ADRIAN [GB]; ZHANG LYNA [GB]; FRODSHAM ANGE) 11 April 2002 (2002-04-11) abstract page 17, lines 35,36	1,3,5,15

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 August 2009	19/08/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Weisser, Dagmar

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/082890

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WOLK K ET AL: "IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis" EUR J IMMUNOL, vol. 36, 2006, pages 1309-1323, XP002525091 the whole document	24,26,27
X	US 2005/277593 A1 (DIECKGRAEFE BRIAN K [US] ET AL) 15 December 2005 (2005-12-15) abstract paragraphs [0005], [0006], [0008] - paragraphs [0017], [0025], [0028] example 5 sequences 1,2	2,4,25
Y		14
Y	KEILBAUGH S A ET AL: "Activation of RegIII beta/gamma and interferon gamma expression in the intestinal tract of SCID mice: an innate response to bacterial colonisation of the gut" INFLAMMATORY BOWEL DISEASE, vol. 54, 2005, pages 623-629, XP002540221 page 625, column 4 page 626, column 2 page 628, columns 2-4	14
Y	BRANDL K ET AL: "MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal Listeria monocytogenes infection" THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 204, no. 8, 6 August 2007 (2007-08-06), pages 1891-1900, XP002540222 page 1892, column 4 page 1897, columns 1,2	14
Y	CASH H L ET AL: "Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin" SCIENCE, vol. 313, no. 5790, 25 August 2006 (2006-08-25), pages 1126-1130, XP002540223 abstract page 1126, column 5 page 1127, column 3 page 1128, column 5 page 1129, column 3	14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/082890

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-28

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1,3,5-13,15-24,26-28 (completely)

   A pharmaceutical composition comprising IL-22 and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

   ---

2. claims: 2,4,14,25 (partially)

   A pharmaceutical composition comprising IL-6 and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

   ---

3. claims: 2,4,14, 25 (partially)

   A pharmaceutical composition comprising IL-18 and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

   ---

4. claims: 2,4,14,25 (partially)

   A pharmaceutical composition comprising IL-23 and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

   ---

5. claims: 2,4,14,25 (partially)

   A pharmaceutical composition comprising a REG lectin family and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

   ---

6. claims: 2,4,14,25 (partially)

   A pharmaceutical composition comprising lymphotoxin and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/082890

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9961617	A	02-12-1999	AU	4208799 A	13-12-1999
			CA	2329274 A1	02-12-1999
			EP	1082433 A1	14-03-2001
			JP	2002516103 T	04-06-2002
WO 0229098	A	11-04-2002	AU	9212501 A	15-04-2002
US 2005277593	A1	15-12-2005	NONE		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
14 May 2009 (14.05.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/062102 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 38/20 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/082890

(22) International Filing Date:
7 November 2008 (07.11.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/986,170 7 November 2007 (07.11.2007) US
61/013,620 13 December 2007 (13.12.2007) US
61/015,620 20 December 2007 (20.12.2007) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 90480 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ABBAS, Alexander, R.** [US/US]; 2164 Carmelita Drive, San Carlos, CA 94070 (US). **DANILENKO, Dimitry, M.** [US/US]; 250 Lewis Avenue, Millbrae, CA 94030 (US). **DE SAUVAGE, Frederic, J.** [BE/US]; 187 Shooting Star Isle, Foster City, CA 94404 (US). **GHILARDI, Nico, P.** [CH/US]; 840 Brookside Lane, Millbrae, CA 94030 (US). **MODRUSAN, Zora** [CA/US]; 3439 Isherwood Place, Fremont, CA 94536 (US). **OUYANG, Wenjun** [US/US]; 1057 Galley Lane, Foster City, CA 94404 (US). **VALDEZ, Patricia, A.** [US/US]; 734 Grandview, San Francisco, CA 94114 (US). **ZHENG, Yan** [CN/US]; 3687 Gainsborough Terrace, Fremont, CA 94555 (US).

(74) Agents: **BERNHART, Jeffrey, P.** et al.; Goodwin Procter LLP, 135 Commonwealth Drive, Menlo Park, CA 94025 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(88) Date of publication of the international search report:
24 September 2009

WO 2009/062102 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATMENT OF MICROBIAL DISORDERS

(57) Abstract: The present invention relates to compositions and methods for treatment of microbial disorder by modulation of the host immune response. More particularly, the present invention relates to compositions that mediate an anti-microbial immune response, and methods of treating a microbial infection using such compositions.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2008/082890	07.11.2008	07.11.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K38/20 A61K38/16 A61P31/00

Applicant
GENENTECH, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Weisser, Dagmar Telephone No. +49 89 2399-7266

Form PCT/ISA/237 (Cover Sheet) (April 2005)

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2008/082890

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

      ☒ a sequence listing

      ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

      ☒ on paper

      ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

      ☒ contained in the international application as filed.

      ☒ filed together with the international application in electronic form.

      ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 2,4,14,16-20,25 (in parts)

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

☒ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. 2,4,14,16-20,25 (in parts) are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

see separate sheet

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2008/082890

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:

   ☒ paid additional fees

   ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee

   ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid

   ☐ not paid additional fees

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

   ☐ complied with

   ☒ not complied with for the following reasons:

   see separate sheet

4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☐ all parts.

   ☒ the parts relating to claims Nos. 1,3,5-13,15-24,26-28 and 2,4,14,25

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	11-14,19-24,26,27
	No:	Claims	1-10,15-18,25,28
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	11-13
	No:	Claims	1-10,14-28
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item III.

The subject-matter of the claims 16-20 ("an IL-22 agonist") is defined by means of functional features. Because of the character of the functional features, i.e. being ...an agonist, it cannot be guaranteed that the performed search is complete. It cannot be excluded that compounds fulfilling the requirements of the functional feature that have not been identified in the application have also not been covered by the search. Although the terms per se are clear, in a scientific sense, it is not clear which compounds of the prior art would also have said function, if they have not been identified as such in the present application.

The same objections applied for the term "an antimicrobial polypeptide modulator" used in claims 2,4,14 and 25. Furthermore, the term "modulator" per se is unclear, because it covers compounds having opposite functions. A modulator can be an activating as well as inhibiting modulator.

Moreover, the present application lacks any evidence that there is a therapeutic effect of any possible "an IL-22 agonist" or "an antimicrobial polypeptide modulator".

Re Item IV.

The International Examining Authority considers that there are six inventions covered by the claims indicated as follows:

I: Claims 1,3,5-13,15-24 and 26-28 (completely) disclose a pharmaceutical composition comprising IL-22 and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

II: Claims 2,4,14 and 25 (partially) disclose a pharmaceutical composition comprising IL-6 and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

III: Claims 2,4,14 and 25 (partially) disclose a pharmaceutical composition comprising IL-18 and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

IV: Claims 2,4,14 and 25 (partially) disclose a pharmaceutical composition comprising IL-23 and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

V: Claims 2,4,14 and 25 (partially) disclose a pharmaceutical composition comprising a REG lectin family and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

VI: Claims 2,4,14 and 25 (partially) disclose a pharmaceutical composition comprising lymphotoxin (LT) and its use for the treatment of a microbial disorder in a subject.

Each of groups of inventions I-VI is a distinct invention characterised by its own amino acid sequence not sharing a significant structural element that is essential to the common property or activity with other inventions.

It appears that the present application provides six different, unrelated solutions to the problem as how "to treat a microbial disorder".

The common technical concept of the different embodiments claimed, namely "use of peptides for treating a microbial disorder", cannot constitute "the single inventive concept" because it is known in the art:

WO 996117 A1 discloses the use of IL-22 for the treatment of a microbial disorder in a subject (abstract; pages 6,7,73-79).

US 2005 158317 A2 discloses the use of a modulator of IL-6 for the treatment of viral or bacterial infections (abstract; par. 38,39).

Hence, the present claims encompass six separate inventions not linked with a single inventive concept thus, the requirements for unity of invention referred to in Rules 13.1 and 13.2 PCT are not fulfilled.

The search was carried out only on the first invention mentioned in the claims entering into PCT phase, i.e. on claims 1,3,5-13,15-24 and 26-28.

Re Item V.

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following document:

D1: WO 99/61617 A
D2: WO 02/29098 A
D3: WOLK K ET AL: "IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis" EUR J IMMUNOL, vol. 36, 2006, pages 1309-1323, XP002525091
D4: US 2005/277593 A1
D5: KEILBAUGH S A ET AL: "Activation of RegIII beta/gamma and interferon gamma expression in the intestinal tract of SCID mice: an innate response to bacterial colonisation of the gut" INFLAMMATORY BOWEL DISEASE, vol. 54, 2005, pages 623-629, XP002540221
D6: BRANDL K ET AL: "MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal Listeria monocytogenes infection" THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 204, no. 8, 6 August 2007 (2007-08-06), pages 1891-1900, XP002540222
D7: CASH H L ET AL: "Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin" SCIENCE, vol. 313, no. 5790, 25 August 2006 (2006-08-25), pages 1126-1130, XP002540223

Claims 1,2,5-27 relate to the subject-matter which is considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as patentable claims to the methods of medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

The following preliminary opinion concerning novelty and inventive step is given for claims 1,3,5-13,15-24 and 26-28 referring to a method of treatment using IL-22 (alternatively comprising the claimed amino acid sequence of SEQ ID NO:8) and the pharmaceutical composition thereof and for claims 2,4,14 and 25 referring to a method for treatment using the claimed member of the REG lectin family (alternatively comprising the claimed amino acid sequence of SEQ ID NO:12,14,16,18,20,24,26).

I. The first group of inventions (claims 1,3,5-13,15-24 and 26-28):

Novelty:

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1,3,5-10,15-18 and 28 is not new in the sense of Article 33(2) PCT; the reasons being as follow:

D1 discloses (abstract; pages 6,7,73-79, page 83, l. 5-20; page 116, l. 22 and page 117, l. 10-31):
- A pharmaceutical composition (e.g. a kit) comprising IL-22 or its agonist used for the treatment of microbial disorders caused by bacteria or viruses in a subject,
- wherein said disorders are, for example, inflammatory bowel disease or Crohn's disease,
- wherein said bacteria are gram negative or positive,
- wherein said IL-22 is used for gene therapy. Thus, D1 anticipates novelty of claims 1,3,5-10,15-18 and 28.

D2 discloses (abstract; col. page 17, l. 35,36):
- A composition comprising IL-22 used for the treatment of viral hepatitis and HIV. Thus, anticipates novelty of claims 1,3,5 and 15.

The subject-matter of claims 11-13,19-24,26 and 27 was neither disclosed nor mentioned in any prior art and seems to be new.

Inventive step:

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 19-24,26 and 27 does not involve inventive step in the sense of Article 33(3) PCT; the reasons being as follow:

Claims 19:

D1 is considered to be the closest prior art and it discloses a pharmaceutical composition comprising IL-22 or its agonist used for the treatment of microbial disorders caused by bacteria like Clostridium, Campylobacterium, Bacteroidaceae, Salmonella etc...

The subject-matter of claim 19 differs from D1 in that said agonist is a fusion protein.

The problem to be solved may be therefore regarded as how to provide an alternative of the known agonist used for the treatment.

Besides of the IL-22 agonist used for the treatment, D1 disclosed antibodies and fusion proteins of IL-22 used for a diagnostic purpose. Even if the further specification of the IL-22 agonist used in D1 for the claimed treatment was not exactly mentioned, the present application does not show any technical effect resulted from said difference. No examples showing the use of a fusion protein are provided. Therefore, since no technical effect was shown, starting from D1, the use of an IL-22 agonist in from of a fusion protein would be regarded only as a straightforward possibility which comes within the scope of customary practice followed by the skilled person. Hence, no inventive step seems to be present.

Claims 20-23:

For the same reason, also the further specification of an IL-22 agonist used, namely said agonist is a Fc fusion protein (claim 20), is an antibody (claim 21), wherein said antibody is monoclonal (claim 22) or humanized (claim 23) cannot contribute to acknowledgement of inventive step of these claims.

Claim 24:

D1 is considered to be the closest prior art and it discloses a pharmaceutical composition comprising IL-22 or its agonist used for the treatment of microbial disorders caused by bacteria like Clostridium, Campylobacterium, Bacteroidaceae, Salmonella etc...

The subject-matter of claim 24 differs from the closest prior art in that said IL-22 comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:8.

The problem to be solved may be therefore regarded as how to provide use of an alternative IL-22.

IL-22 was already described in the art as a regulator of expression of genes responsible for antimicrobial defence (see D3). Moreover, also the idea of using IL-22 for the treatment of microbial disorders, especially then bacterial disorders of the digestive system, is known. Even if the use of IL-22 comprising the claimed sequence was not disclosed in any available prior art, the present application lacks any evidence that it has a therapeutical effect. No data supporting said effect are provided. Therefore, starting from D1 and being aware of the fact that no therapeutical effect was shown, the use of IL-22 comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:8 does not seem to be inventive.

Claims 26 and 27:

For the same reason, claims 26 and 27 referring to possible nucleic acid sequences encoding said IL-22, namely any one of SEQ ID NO: 7 (claim 26) or 1,3,5,9,11,13,15,17,19,21,23,25,49 or 51 (claim 27) do not appear to be inventive.

Claim 11:

The subject-matter of claim 11 differs form D1 in that IL-22 is used for treating an infection by a microbial pathogen, wherein said pathogen is an attaching or effacing (A/E) bacteria. The positive effect of IL-22 was demonstrated in the

provided examples using a mice A/E pathogen, namely C. rodentium, closely related to E.coli. Therefore, the use of IL-22 in case of attaching or effacing bacteria would be regarded as inventive.

Claims 12 and 13:

Consequently, also claims 12 and 13 referring to the specific kind of attaching or effacing bacteria, namely said bacteria are enterohemorragic E. coli or enteropathogenic E. coli of strains 0157:H7 or 055:h7, appear to content inventive step.

II. The fifth group of inventions (claims 2,4,14 and 25):

Novelty:

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 2,4 and 25 is not new in the sense of Article 33(2) PCT; the reasons being as follow:

D4 discloses (passages cited in the SR):
- A pharmaceutical composition comprising RegIII (RegIII alpha; sharing 100% homology with the claimed amino acid sequence of SEQ ID NO:20) or RegIV used for the treatment of sepsis (an infectious state caused by a microbial pathogen) or further inflammatory disorders like IBD or optic neuritis.
Thus, D4 anticipates novelty of claims 2,4 and 25.

The subject-matter of claim 14 was neither disclosed nor mentioned in any prior art and seems to be new.

Inventive step:

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claim 14 does not involve inventive step in the sense of

Article 33(3) PCT; the reasons being as follow:

Claim 14:

D4 is considered to be the closest prior art and it discloses a pharmaceutical composition comprising RegIII (RegIII alpha) or RegIV used for the treatment of sepsis (an infection state caused by a microbial pathogen) or further inflammatory disorders like IBD or optic neuritis.

The subject-matter of claim 14 differs from the closest prior art in that said Reg III polypeptide is RegIII beta or RegIII gamma.

The problem to be solved may be therefore regarded as how to provide an alternative to RegIII alpha polypeptide.

In general, the idea of using RegIII polypeptides (RegIII alpha) for the treatment of infectious disorders or diseases is already known (D4). Even if RegIII beta or gamma have not been employed for such a treatment yet, their antibacterial activities are well-known in the art (see D5-D7). Moreover, the present application lacks any evidence that the use of RegIII beta or gamma has any additional or unexpected effect over the known RegIII alpha. No data supporting said effect are provided. Therefore, starting from D4 in combination with any one of D5-D7, and being aware of the fact that no therapeutical effect was shown, the use of RegIII beta or gamma would be regarded only as an obvious alternative. Hence, no inventive step of claim 14 seems to be present.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

BNSDOCID: <XS 2007040100K >

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS CPRTENFRDE

BNSDOCID: <XS 2006100103CF I >

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MICROBIANOS

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con composiciones para el tratamiento de trastorno microbiano mediante la modulación de la respuesta inmune del hospedero. Más particularmente, la presente invención se relaciona con composiciones que median una respuesta inmune anti-microbiana, y métodos para el tratamiento de una infección microbinana usando tales composiciones.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MICROBIANOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona generalmente con el tratamiento de trastornos microbianos mediante la modulación de la respuesta inmune del hospedero.

ANTECEDENTES

La infección por patógenos microbianos representa una causa importante de muerte a nivel mundial y continua planteando una amenaza seria a la salud global (WHO, *The World Health Report* (2004)). Por ejemplo, La unión y borradura (A/E) de patógenos bacterianos, tales como *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* enteropatogénica (EPEC) están entre las bacterias que causan diarrea, morbilidad y mortalidad, especialmente entre infantes y niños en el mundo en desarrollo *(2). E. coli* O157:H7, una de las cepas de EHEC, hizo que mucha gente fuera hospitalizada y 3 mortalidades el año pasado en los Estados Unidos (*MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 55, 1045 (Sep 29, 2006)). También se cree que más del 90% de todos los casos del síndrome urémico hemolítico post diarrea (HUS) en países industrializados fue causado por infección por *E. coli* O157:H7 (R. L. Siegler, *Pediatr Clin North Am* 42, 1505 (Dec, 1995)). Ootras cepas de EPEC, tales como *E coli* O55:H7 también causan enfermedad intestinal entre infantes a nivel mundial (T. S. Whittam *et al. Infect Immun* 61, 1619 (May, 1993)). Mucho de nuestro conocimiento de cómo los hospederos controlan la infección por patógenos A/E proviene del estudio de la infección por *Citrobacter rodentium*, un patógeno natural en ratones (L. Eckmann, *Ann NY Acad Sci* 1072, 28 (Agosto 1, 2006)). Similar a la patogénesis de EHEC o EHPC en el humano, la unión íntima de *C.*

rodentium a células epiteliales colónicas murinas produce borradura del borde en cepillo de la microvellosidad, denominado lesión de unión y borradura (A/E), e hiperplasia colónica (D. B. Schauer, S. Falkow, *Infect Immun* 61, 2486 (Jun, 1993)).

Tanto las células epiteliales intestinales como las inmunes juegan papeles críticos en la defensa del hospedero contra los patógenos de A/E. Las uniones estrechas de las células epiteliales intestinales presentan la primera barrera para evitar que los microbios salgan del lumen intestinal (T.T. MacDonald, G. Monteleone, Science 307, 1920 (Marzo 25, 2005)). Adicionalmente, las células epiteliales secretan péptidos anti-microbianos para controlar los patógenos en el tracto gastrointestinal (GI) (A. Takahashi *et al., FEBS Lett* 508, 484 (Nov 23, 2001)). Estudios con cepas de ratones inmuno deficientes durante la infección por *C. rodentium* establecieron que las células T $CD4^+$, células B, y las respuestas específicas de anticuerpo anti-*C. rodentium* son todos componentes esenciales de la inmunidad adaptativa para contener y erradicar la infección (L. Bry, M. B. Brenner, *J Immunol* 172, 433 (Enero 1, 2004)). Muchas citoquinas producidas por los linfocitos durante la infección pueden mejorar las respuestas inmunes innatas de las células epiteliales. Las funciones específicas de estas citoquinas, sin embargo, permanecen poco claras durante la infección por patógeno de A/E. La IL-22, una citoquina de la familia IL-10, es producida por linfocitos, particularmente células Th17 (Y. Zheng *et al, Nature* 445, 648 (Feb 8, 2007)). Las células Th17 pertenecen a un subconjunto colaborador de célula T $CD4^1$ descubierto recientemente, que también produce IL-17. La IL-17 tiene funciones importantes en el control de infecciones bacterianas extracelulares (K. I. Hlappel *et al., J. Exp. Med.* 202, 761 (Septiembre 19, 2005)). El papel de IL- 22, sin embargo, en la defensa del hospedero es aún desconocido en su mayoría. Las proteínas relacionadas con el Factor de Necrosis de Tumor (TNF) son reconocidas en la técnica como una gran familia de proteínas que tienen una variedad de actividades que van

desde la defensa del hospedero a la regulación inmune para apoptosis. El TNF fue identificado primero como un factor derivado del suero que era citotóxico para varias líneas celulares transformadas *in vitro* y producía necrosis de ciertos tumores *in vivo*. Se identificó un factor similar en la superfamilia y se refirió como linfotoxina ("LT"). Debido a las similitudes observadas entre TNF y LT a principios de los 80's, se propuso que el TNF y LT sean referidos como TNF-α y TNF-β, respectivamente. La literatura científica, por ende, hace referencia a ambas nomenclaturas. Como se usa en la presente solicitud, el término "TNF" se refiere a TNF-α. Investigaciones recientes revelaron dos formas de linfotoxina, referidas como LTα y LTβ. US 2005-0129614 describe otro miembro polipéptido de la super familia de ligando de TNF basado en las similitudes estructurales y biológicas, designado TL-5. Los miembros de la familia de proteínas de TNF existen en formas ligadas a membrana que actúan mediante un contacto célula-célula, o como proteínas secretadas. Una familia de receptores relacionados con TNF reacionan con estas proteínas y desencadenan una variedad de rutas de señalización incluyendo muerte celular o apoptosis, proliferación celular, diferenciación de tejido, y respuestas proinflamatorias. El TNF-α por sí mismos ha estado implicado en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, infecciones virales, bacterianas, y parasíticas, malignancias, y/o enfermedades neurodegenerativas y es un objetivo útil para la terapia biológica específica en enfermedades tales como RA enfermedad de Crohn.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención provee composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos microbianos mediante modulación de la respuesta inmune del hospedero. Por ejemplo, una respuesta inmune anti-microbiana es un hospedero puede ser mejorada o inhibida aumentando o disminuyendo una actividad de uno o más polipéptidos antimicrobianos (AMPs) que median la

respuesta inmune anti-microbiana. Más particularmente, la presente invención provee AMPs, moduladores de los mismos, y métodos de uso de tales composiciones para el tratamiento de trastornos microbianos. Tales trastornos microbianos incluyen pero no se limitan a, enfermedades infecciosas, por ejemplo, diarrea causada por EHEC y EPEC, Enfermedad Inflamatoria del Intestino (IBD) y, más particularmente, Colitis Ulcerativa (UC) y Enfermedad de Crohn (CD). Los AMP de la presente invención son polipéptidos que median una respuesta inmune anti-microbiana, e incluyen, pero no se limitan a, LT, IL-6, IL-18, IL-22, IL-23 (incluyen p.e., IL-23 p19 o IL-23 p40), y Reg o proteínas relacionadas cn Reg codificadas por los genes de la super familia Reg. La super familia Reg incluye genes Reg y relacionados con Reg de humano, rata, y ratón y están agrupados en cuatro subclases, tipos I, II, III, y IV. Por ejemplo, el tipo 1 incluye *REG Iα* humano, REG Iβ humano, *Reg1* de rata, y *Reg1* de ratón; el tipo II incluye *RegII* de ratón; el tipo III incluye REG III humano, *HIP/PAP* humano (gen expresado en carcinoma hepatocelular-intestino-páncreas/gen que codifica la proteína asociada con la pancreatitis), *PAP/Péptido23* de rata, *RegIII/PAPII* de rata, *PAP III* de rata, RegIIIα, RegIIIβ, RegIIIγ de ratón, RegIIIδ de ratón, e INGAP de hámster (proteína asociada con la neogénesis de islote). El tipo IV contiene *REG IV* humano. En un aspecto, la proteína REG está codificada por un miembro de la familia de gen REG humano que incluye, pero no se limita a, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV, y la secuencia relacionada con Reg (RS).

En algunos aspectos, la secuencia de amino ácido de un AMP de la presente invención comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del siguiente grupo: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46,

SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, y SEQ ID NO: 56.

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

Una actividad de un AMP de la presente invención puede ser aumentada o disminuida y/o regulada diferencialmente con relación a la actividad de otro AMP o el mismo AMP. Ejemplos de una actividad de un AMP de la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, expresión de AMP, unipon a un compañero de unión, transducción de señal, actividad anti-microbiana, u otra actividad biológica o inmunológica del mismo.

En un aspecto, un aumento de la actividad de uno o más AMP de la presente invención produce una respuesta inmune anti-microbiana mejorada en un sujeto.

En un aspecto, los AMP de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que interactúan directamente o indirectamente con IL-22, p.e., polipéptidos que están aguas arriba o aguas abajo de una ruta de transducción de señal de IL-22 que media la resistencia del hospedero a la infección por un patógeno microbiano (p.e., una bacteria o virus). Ejemplos de

tales AMP incluyen, pero no se limitan a, LT, IL-6, IL-18, e IL-23 (incluyendo p.e., IL-23 p19 o IL-23 p40).

Los moduladores de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos y moléculas de ácido nucleico (p.e., una molécula de ADN o molécula de ARN) que modulan directamente o indirectamente una actividad de un AMP. Ejemplos de tal modulación incluyen, pero no se limitan a, un aumento, disminución, inducción o activación, inhibición o regulación (p.e., regulación ascendente o descendente) de una actividad de un AMP de la presente invención.

En un aspecto, el modulador modula indirectamente la actividad de IL-22 disminuyendo o inhibiendo la actividad de la Proteína de Unión a IL-22 (BP) y de esta forma, aumentando la actividad de IL-22. En un aspecto particular, el modulador disminuye o inhibe la unión de la BP de IL-22 a IL-22 y por consiguiente, aumenta la actividad de IL-22. En algunos aspectos, el modulador es un polipéptido p.e., un polipéptido que se une o interactúa de otra forma con un AMP para aumentar, inducir o regular una actividad de un AMP. En un aspecto, el modulador es un polipéptido de fusión que modula una actividad de un AMP.

En un aspecto, el modulador es un anticuerpo que se une a un AMP. En un aspecto particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otro aspecto, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o $(Fab')_2$. En otro aspecto, el anticuerpo es un polipéptido de fusión (p.e., un polipéptido de fusión a Fc). En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En un aspecto particular, el anticuerpo es humanizado. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otro aspecto, el anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo seleccionado de uno humano, primate no humano, u otro mamífero (p.e.,

cerdo, oveja, conejo, marmota, rata, o ratón). En un aspecto particular, el anticuerpo es un agonista de AMP. En otro aspecto particular, el modulador es un AMP recombinante o molécula de ácido nucleico que codifica un AMP (p.e., una molécula de ADN o ARN).

La presente invención provee adicionalmente métodos para tratar un trastorno microbiano mediante la modulación de una respuesta inmune anti-microbiana. En un aspecto, la presente invención provee un método para tratar un trastorno microbiano en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de composición farmacéutica que comprende un AMP o modulador del AMP, en donde el AMP se seleccioa de un grupo que consiste de: LT, IL-6, IL-18, IL-22, IL-23, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV secuencia relacionada con Reg (RS). En un aspecto, el trastorno es una enfermedad infecciosa, por ejemplo, diarrea causada por EHEC o EPEC, Enfermedad Inflamatoria del Intestino (IBD) o, más particularmente, Colitis Ulcerativa (UC) o Enfermedad de Crohn (CD).

En aspectos particulares, la presente invención provee métodos para modular una respuesta inmune anti-microbiana estimulando o inhibiendo una ruta de señalización mediada por AMP y/o la función de célula Th_{IL-17}. Tales métodos son útiles para el tratamiento de trastornos microbianos. Por ejemplo, en un aspecto, la presente invención provee un método para mejorar una respuesta inmune anti-microbiana estimulando una ruta de señalización mediada por AMP, p.e., ruta de señalización mediada por IL-22 y/o IL-23. En otro aspecto, la presente invención provee métodos para modular una respuesta inmune anti-microbiana estimulando o inhibiendo una ruta de señalización mediada por citoquina. Por ejemplo, en un aspecto, la presente invención provee métodos para mejorar una respuesta inmune anti-microbiana estimulando una ruta de señalización mediada por citoquina, p.e., una ruta de señalización de IL-22 y/o IL-23. Más aún, la presente invención provee

métodos para modular una respuesta inmune anti-microbiana estimulando o inhibiendo una función de célula Th_{IL-17}.

En un aspecto, la presente invención provee un método para estimular una ruta de señalización mediada por AMP en un sistema biológico, el método comprende proveer un agonista de AMP al sistema biológico. Ejempos de tal sistema biológico incluyen, pero no se limitan a, células mamíferas de un sistema de cultivo celular in vitro o en un organismo in vivo. En otro aspecto, la presente invención provee un método para inhibir una ruta de señalización mediada por AMP en un sistema biológico, el método comprende proveer un antagonista de AMP al sistema biológico. En un aspecto particular, la presente invención provee un método para mejorar una respuesta inmune anti-microbiana en un sistema biológico, estimulando una ruta de señalización mediada por IL-23 y/o IL-22 en un sistema biológico, el método comprende proveer un IL-22 o un agonista de IL-22 o al sistema biológico. En un aspecto, un agonista de IL-22 es IL-22. En otro aspecto, el agonista de IL-22 es un anticuerpo que se une a IL-22. En otro aspecto, se provee un método para inhibir una ruta de señalización mediada por IL-23 en un sistema biológico, el método comprende proporcionar un antagonista de IL-22 al sistema biológico. En un aspecto, El antagonista de IL-22 es un anticuerpo, p.e., un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante y/o un anticuerpo anti-IL-22R neutralizante.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para estimular una función de célula T_{IL-17}, el método comprende exponer una célula Th_{IL-17} a un agonista de un AMP que media la ruta de señalización mediada por IL-23 (p.e., IL-23, IL-6, o IL-22). Tales métodos son útiles para el tratamiento de un trastorno microbiano. En un aspecto, un agonista de IL-22 es IL-22. En otro aspecto, el agonista de IL-22 es un anticuerpo que se une a IL-22.

En otro aspecto, se provee un método para inhibir una función de célula T_{IL-17}, el método comprende exponer una célula T_{IL-17} a un antagonista de un AMP que media la ruta de señalización mediada por IL-23 (p.e., IL-23, IL-6, o IL-22). En un aspecto, el antagonista es un anticuerpo anti-IL-22, p.e., un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante.

Las funciones de célula T_{IL-17} ejemplares incluyen, pero no se limitan a, estimulación de la inmunidad mediada por célula (hipersensibilidad del tipo retardado); reclutamiento de células inmunes innatas, tales como células mieloides (p.e., monocitos y neutrófilos) a sitios de inflamación; y estimulación de infiltración de célula inflamatoria a tejidos. En un aspecto, una función de célula T_{IL-17} es mediada por IL-23 y/o IL-22.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un método para el tratamiento de una infección por un patógeno microbiano (p.e., una bacteria o virus), en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de composición farmacéutica que comprende un AMP o modulador del AMP, en donde el AMP se selecciona de un grupo que consiste de: LT, IL-6, IL-18, IL-22, IL-23, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV y la secuencia relacionada con Reg (RS).

En otro aspecto, la presente invención provee un método para tratar un trastorno microbiano en un sujeto, que comprende contactar células del sujeto con una molécula de ácido nucleico (p.e., una molécula de ADN o ARN) que codifica un AMP o modulador del AMP, en donde el AMP se selecciona de un grupo que consiste de: LT, IL-6, IL-18, IL-22, IL-23, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV y secuencia relacionada con Reg (RS). En un aspecto, el trastorno es una enfermedad infecciosa, por ejemplo, diarrea causada por EHEC o EPEC, Enfermedad Inflamatoria del Intestino (IBD) o, más particularmente, Colitis Ulcerativa (UC) o Enfermedad de Crohn (CD).

En otro aspecto, la presente invención provee un método para modular la actividad de un AMP en células de un sujeto infectado con un patógeno microbiano (p.e., una bacteria o virus), que comprende contactar las células con una molécula de ácido nucleico (p.e., una molécula de ADN o ARN) que codifica un AMP o modulador del AMP, en donde el AMP se selecciona de un grupo que consiste de: LT, IL-6, IL-18, IL-22, IL-23, REG Iα, RLG Iβ, HIP/PAP, REG III (p.e., REG IIIβ o REGIIIγ), REG IV, secuencia relacionada con Reg (RS).

Ejemplos de un patógeno microbiano incluyen, pero no se limitan a, una bacteria o virus. En un aspecto, el patógeno microbiano es una bacteria p.e., una bacteria gram-negativa o gram-positiva. En un aspecto particular, la bacteria es una bacteria gram-negativa. En otro aspecto, la bacteria es una bacteria de unión o borradura (A/E) y, más particularmente, una Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) o E. Coli enteropatogénica (EPEC). En un aspecto, la bacteria es E. coli enteropatogénica (LHLC) es E. coli 0157:H7 o E. coli 055:H7.

En otro aspecto, la presente invención provee polinucleótidos que codifican un AMP de la presente invención, o modulador del mismo. En otro aspecto, la invención provee un vector que comprende el polinucleótido. En otro aspecto, la invención provee una célula hospedera que comprende el vector. En un aspecto, la célula hospedera es una célula eucariótica. En otro aspecto, la célula hospedera es una célula CHO, célula de levadura, o célula bacteriana (p.e., E. coli).

En un aspecto, la presente invención provee un método para preparar un anticuerpo que se une a un AMP de la presente invención, en donde el método comprende cultivar la célula hospedera bajo condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, y aislar el

anticuerpo. En un aspecto particular, la invención provee un método para preparar un anticuerpo que es un agonista de un AMP de la presente invención.

En un aspecto, la presente invención provee un mpetodo para detectar la presencia de un AMP en una muestra biológica, que comprende contactar la muestra biológica con un anticuerpo al AMP, bajo condiciones que permitan la unión del anticuerpo al AMP, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y AMP.

En otro aspecto, la presente invención provee un kit que comprende uno o más AMP de la presente invención y/o moduladores de los mismos. En otro aspecto, la presente invención provee un kit que comprende una o más composiciones farmacéuticas, que comprende cada una un AMP de la presente invención o modulador del mismo.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La **Fig. 1** describe datos que demuestran la defensa del hospedero contra infección por *C. rodenlium infection*. La Fig. 1(A) describe los resultados de un análisis de RT-PCR en tiempo real sobre subunidades del receptor para IL-22 en el tracto GI de ratón tipo salvaje no infectado; La Fig. 1 (B-F) describe un análisis RT-PCR en tiempo real sobre varias expresiones de citoquina en cólones de ratón tipo salvaje a la infección por *C. rodenlium*; La Fig. 1(G) describe la supervivencia de ratones C57B1/6 (n=5), IL-23p40$^{-/-}$ (n=5), e IL-6$^{-/-}$ (n=5) después de infección por *C. rodentium*; y la Fig. 1(H) describe un análisis de RT-PCR en tiempo real en curso sobre expresiones de IL-22 e IL-17 en cólones de ratón C57B1/6, IL- 23p40$^{-/-}$, e IL-6$^{-/-}$ a la infección por *C. rodentium*. Para la infección por *C. rodentium*, los ratones fueron inoculados oralmente con

$2x10^9$ CFU de bacteria. Todos los datos anteriores son representativos de dos experimentos independientes.

La **Fig. 2** describe los datos que demuestran que la deficiencia de IL-22 hace a los ratones susceptibles a infección por *C. rodentium*. Ratones de 6-7 semanas IL-$22^{-/-}$ (Fig. 2(A-C)), IL-$17RC^{-/-}$ (D), IL-$20R\beta^{-/-}$ (Fig. 2(F)) o ratones tipo salvaje (Fig. 2(A-C, E)) fueron inoculados oralmente con $2x10^9$ CFU de *C. rodentium* y se pesaron a puntos de tiempo indicados. Análisis histológico de cólones de ratones IL-$22^{-/-}$ y tipo salvaje, 8 días después de la inoculación usando tinción hematoxilina-y-eosina (H&E) (Fig. 2(B y C)). Las flechas indican inflamación de submucosa (Fig. 2(B)), e invasión bacteriana en glándulas de mucosa (Fig. 2(C)). Se muestran datos representativos (barras = 100 µm para la Fig. 2(B) y barras = 25 µm para la Fig. 2(C)). Los ratones C57B1/6 tipo salvaje recibieron 150 µg de mAb anti-IL-22 o mAb IgG1 de control isotipo intraperitonealmente. Cada día de por medio, partiendo del día 0 o día 8 post inoculación (Fig. 2(E)). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **Fig. 3** describe datos que demuestran el efecto de la deficiencia de IL-22 en ratones durante la infección por *C.rodentium*. Los ratones C57B1/6 (Fig. 3(A, B, y F)), IL-$22^{-/-}$ y tipo salvaje (Fig. 3(C-E, y G)) fueron inoculados oralmente con $2x10^9$ CFU de *C. rodentium*. Los ratones también recibieron 150 µg de mAb anti-IL-22 o mAB IgG1 de control isotipo intraperitonealmente día de por medio partiendo el mismo día de la inoculación de *C. rodentium* (Fig. 3(A y B)). En el día 10, los cólones fueron fotografiados y se midieron las longitudes de colon individuales (Fig. 3(A)). Se realizó el análisis histológico de los cólones usando tinción hematoxilina-y-eosina (FI&E) (Fig. 3(B)). El análisos histológico de los cólones e hígados (día 8) de ratones IL-$22^{-/-}$ y tipo salvaje se realizó usando tinción H&E (Fig. 3(C y E)). Las flechas en la Fig. 3(C) indican inflamación transmural colónica y ulceración. La Fig. 3(E) describe un

microabceso séptico hepático en el ratón IL-22$^{-/-}$. Los datos representativos se muestran en la Fig. 3(C), en donde las barras = 500 µm para los paneles superiores y barras = 100 µm para los paneles inferiores. En la Fig.3(E), las barras = 25 µm. La Fig. 3(D) describe el $\log_{10}$ de CFU de *C. rodentium* en colon, hígado, bazo, y glanglio linfático mesentérico. La Fig. 3(F-G) describe los niveles de IgG anti-*C. rodentium* en suero mediante ELISA. * $p < 0.05$. Todos los datos anteriores son representativos de dos experimentos independientes.

La **Fig. 4** describe datos que demuestran que IL-22 induce la expresión de la proteína de la familia RegIII anti-microbiana a la infección por *C. rodentium*. El cultivo in vitro de cólones de ratón C57B1/6 se trató con 10 µg de IL-22 por 24 horas, los ARN fueron aislados y se usaron para el análisis de microarreglo Fig.4(A)) y el análisis de RT-PCR en tiempo real (Fig. 4(B)). En la Fig. 4(C), los ratones IL-22$^{-/-}$ y sus compañeros de camada tipo salvaje fueron inoculados oralmente con $2x10^9$ CFU de *C. rodentium*, y la RT-PCR en tiempo real se realizó sobre ARN aislado de colon de ratón individual recolectado en los puntos de tiempo indicados. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **Fig. 5** describe datos que demuestran la interrupción objetiva del gen *IL-17 RC* murino. La Fig. 5(A) describe la estrategia para la generación de ratones knockout de *IL-17RC*. Los exones 1-5 (casillas abiertas) que abarcan la secuencia de codificación de *IL-17RC* fueron reemplazados con un cassette de resistencia a neomicina. La Fig. 5(B) describe el genotipado de la prole de ratones tipo salvaje (WT) y knockout (KO) usando los conjuntos de cebadores indicados (P1, P2 y P3). Se generaron fibroblastos en punta de cola de ratones WT y KO y se estimularon con diferentes concentraciones de IL-17A e IL-17F *in vitro* por 24 horas, y los sobrenadante del cultivo se recolectaron para ELISA IL-6 (Fig. 5(C)).

La **Fig. 6** describe datos de un análisis de RT-PCR en tiempo real sobre la expresión de IL-19, IL-20 e IL-24 en cólones de ratón tipo salvaje a la infección por *C. rodentium*, en el tiempo. Los ratones C57B1/6 fueron inoculados oralmente con $2x10^9$ CFU de *C. rodentium*. Los cólones fueron recolectados en los puntos de tiempo indicados y los ARN aislados fueron usados para el análisis de RT-PCR en tiempo real.

La **Fig. 7** describe los datos que demuestran la expresión de IL-20Rα e IL-20Rβ en el tracto GI. Análisis de RT-PCR en tiempo real sobre las subunidades de receptor para IL-19, IL-20 e IL-24 en tracto GI de ratón tipo salvaje no infectado.

La **Fig. 8** describe datos que demuestran la alteración objetiva del gen *IL-20Rβ* murino. La Fig. 8(A) describe la estrategia para la generación de ratones knockout de IL-20Rβ. El exón 1 (casillas abiertas) fue reemplazado con un cassette resistente a neomicina. La Fig. 8(B) describe el fenotipado de la prole de ratones tipo salvaje, (WT), heterozigóticos (HET) y knockout (KO) usando los conjuntos de cebadores indicados (p1, p2 y p3). La Fig. 8(C) las orejas de los ratones WT y KO fueron inyectadas intradérmicamente con 500 ng de IL-20 recombinante en PBS 20 µl o con PBS 20 µl solo. Después de 24 horas, las orejas de ratón fueron recolectadas para aislamiento del ARN. Los ARN aislados fueron usados para análisis de RT-PCR en tiempo real para los genes conocidos por ser reguladores ascendentes a la señalización de IL- 20.

La **Fig. 9** describe datos de un análisis histológico de cólones de ratón de ratones tipo salvaje tratados con mAb anti-IL-22 incolulados con *C. rodentium*. Los ratones C57B1/6 fueron inoculados oralmente con $2x10^9$ CFU de *C. rodentium*. Los ratones también recibieron 150 µg de mAb anti-IL-22 o mAb IgG1 de control isotipo intraperitonealmente, día de por medio, partiendo del mismo día que la inoculación como *C. rodentium*. En el día 10, se realizó el

análisis histológico de los cólones usando tinción hematoxilina-y-eosina (H&E). Las flechas indican la ulceración de la mucosa con inflamación transmural. Se muestran imágenes representativas, barras = 500 µm para los paneles superiores y barras = 250 µm para los paneles inferiores.

La **Fig. 10** describe datos que demuestran los niveles de Ig en suero en ratones IL-22$^{-/-}$ y sus compañeros de camada tipo salvaje durante la infección por *C. rodentium*. Los ratones IL-22$^{-/-}$ y sus compañeros de camada tipo salvaje fueron inoculados oralmente con 2x10^{9} CFU de *C. rodentium*. En los puntos de tiempo indicados se recolectó la sangre del ratón. Se determinaron los niveles de IgM e IgG en suero totales (Fig. 10(A)) e IgG2a, IgG2b, IgG2c y IgG3 anti-*C rodentium* en suero (Fig. 10(B)) mediante ELISA. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **Fig. 11** describe datos que demuestran una ELISA de cultivo de colon *ex vivo* de la expresión de IL-22 (Fig. 11 (A)) e IL-17 (Fig. 11 (B)) en cólones de ratón C57B1/6, IL-23p19$^{-/-}$, y IL-6$^{-/-}$ después de la infección por *C. rodentium*. Para la infección por *C. rodentium*, los ratones fueron inoculados oralmente con 2x10^{9} CFU de bacterias. Todos los datos son representativos de por lo menos dos experimentos independientes.

La **Fig. 12** describe un análisis FACS de la expresión de IL-22R en IEL, LPMC y células epiteliales colónicas de ratón aisladas (Fig. 12 (A)), y un análisis de FACS de la expresión de IL-22R sobre células epiteliales colónicas humanas primarias (Fig. 12 (B)). Todos los datos son representativos de por lo menos dos experimentos independientes.

La **Fig. 13** describe datos que demuestran que la IL-22, producida por células dendríticas (DCs), es crítica para las respuestas inmunes innatas contra infección por *C. rodentium*. En la Fig. 13(A), los ratones Rag2$^{-/-}$ y Balb/c tipo

salvaje fueron inoculados oralmente con $2x10^9$ CFU de *C. rodentium*. En la Fig. 13(B y C), los ratones también recibieron 150 µg de mAb IgG1 de control isotipo o mAb anti-IL-22 intraperitonealmente, día de por medio, partiendo el mismo día que la inoculación con bacterias y fueron pesados en los puntos de tiempo indicados. La Fig. 13(B) describe un análisis RT-PCR en tiempo real en curso, y la Fig. (13(C) describe una ELISA de cultivo de colon *ex vivo* de la expresión de IL-22 e IL-17 en cólones de ratones Balb/c tipo salvaje y $Rag2^{-/-}$ después de la infección por *C. rodentium*. La Fig. 13(D) describe la tinción inmunohistoqupimica para IL-22, CD11c, y DAPI en cólones de 4 días desde la infección por *C. rodentium* de ratones $Rag2^{-/-}$ Aumento: 400x. La Fig. 13(E) describe datos que demuestran que la IL-23 induce directamente la producción de IL-22, medida por ELISA, a partir de DC $CD11c^+$ murinos aislados *in vitro*. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **Fig. 14** ilustra datos que demuestran que la IL-22 puede inducir la activación de STAT3 en líneas celulares de colon humanas. En la Fig. 14(A), los ratones $IL\text{-}22^{-/-}$ y sus compañeros de camada tipo salvaje fueron inoculados oralmente con $2x10^9$ CFU de *C. rodentium*. Un grupos de ratones $IL\text{-}22^{-/-}$ también recibió proteína de fusión mRegIIIγ-Ig. Los animales fueron pesados y monitoreados en los puntos de tiempo indicados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. En la Fig. 14(B), la IL- 23 induce directamente la producción de IL-22 de DC humanos aislados, medidos mediante ELISA. La Fig. 14(C) ilustra la expresión de IL-22R mediante FACS sobre líneas celulares de colon humanas. La Fig. 14(D) ilustra una transferencia Western que muestra que la IL-22 puede inducir la activación de STAT3 en líneas celulares de colon humanas. La Fig.14(E) describe un análisis RT-PCR en tiempo real para la expresión de RegIIIβ y RegIIIγ en líneas celulares epiteliales colónicas humanas tratadas con IL-22. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La **Fig. 15** ilustra la caracterización de mAb anti-IL-22 por inmunohistoquímica. La Fig. 15(A) describe las secciones de colon desde el día 4, infectadas con *C. rodentium* de ratones IL-22$^{-/-}$ y tipo salvaje o ratones tipo salvaje no infectados, teñidos con mAb anti-IL-22 conjugado con Alexa555 (8E11) o control de isotipo. La Fig 15(B) describe los sedimentos de célula de células 293 que expresan IL-22 teñidas con mAb anti-IL-22 conjugado con Alexa555 (8E11) o control isotipo. La ampliación es de 200x.

La **Fig. 16** describe un análisis en curso de tiempo sobre la expresión de RegIIIγ y RegIIIβ en cólones de ratón C57B1/6 e IL-23p19$^{-/-}$ después de la infección por *C. rodentium*. Los ratones C57B1/6 e IL-23p19$^{-/-}$ fueron inoculados oralmente con 2x10^9 CFU de *C. rodentium*. En los puntos de tiempo indicados, los cólones de ratón fueron recolectados para extracción de ARN y posterior análisis de RT-PCR en tiempo real sobre la expresión de RegIIIγ y RegIIIβ de ratón.

La **Fig. 17** ilustra un análisis en curso de tiempo sobre expresiones de otros miembros de la familia Reg en cólones de ratón IL-22$^{-/-}$ y tipo salvaje después de la infección por *C. rodentium*. Los ratones IL-22$^{-/-}$ y sus compañeros de camada tipo salvaje fueron inoculados oralmente con 2x10^9 CFU de *C. rodentium*. En los puntos de tiempo indicados, los cólones de ratón fueron recolectados para análisis de ARN y posterior análisis de RT-PCR en tiempo real.

La **Fig. 18** describe datos que demuestran que la proteína de fusión RegIII_ humana recombinante puede proteger parcialmente IL-22$^{-/-}$ después de la infección por *C. rodentium*. Los ratones IL-22$^{-/-}$ y sus compañeros de camada tipo salvaje fueron inoculados oralmente con 2x10^9 CFU de *C. rodentium*. Un grupo de ratones IL-22$^{-/-}$ también recibió proteínas de fusión RegIII -cFlag

humanas. Los animales fueron pesados y monitoreados en los puntos de tiempo indicados. * $p < 0.05$.

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

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

La **Fig. 21** ilustra datos que demuestran que tanto LTbRFc y mAb anti-IL-22 mAb conducen a la mortalidad después de la infección por *C. rodentium.*

La **Fig. 22** describe datos que demuestran la regulación de la ruta LT de múltiples aspectos, aguas arriba involucrados en la producción de IL-22.

La **Fig. 23** ilustra datos que demuestran que IL-22 rescata parcialmente los defectos vistos en ratones tratados con LTbR.

La **Fig. 24** describe datos que demuestran que el tratamiento con mAb anti-IL-22 conduce a folículos de colon reducidos, organización de B/T comprometida, y números de DC, célula T y célula B reducidos en el colon.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención provee composiciones para el tratamiento de trastornos microbianos mediante modulación de la respuesta inmune del hospedero.

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

Como se muestra en la presente, las citoquinas tales como IL-22, que son producidas por células inmunes durante las etapas tempranas de infección son necesarias para que las células epiteliales intestinales produzcan una respuesta anti-microbiana total y respuesta de curación de heridas con el fin de evitar la invasión sistémica de microbios patógenos en el hospedero. Los presentes estudios muestran que la IL-22 protege la integridad de la barrera epitelial intestinal y evita la invasión bacteriana con propagación sistémica. Adicionalmente, los presentes estudios indican que la IL-22 está involucrada con la producción de las respuestas IgG anti-bacterianas tempranas, y es indispensable para la inducción de lectinas anti-microbianas, tales como RegIIIβ y RegIIIγ, de las células epiteliales colónicas durante la infección bacteriana. La falta de cualquiera o ambos de estos mecanismos puede contribuir a la respuesta en defensa del hospedero comprometida con una propagación sistémica aumentada y mortalidad en ratones IL-22$^{-/-}$ durante la infección por *C. rodentium*.

Como se muestra en la presente, la inducción de RegIIIβ y RegIIIγ indica que la IL-22 puede tener funciones más amplias para el control de varias infecciones bacterianas. Los estudios presentes sustentan adicionalmente el

papel de las células Th_{IL-17} y sus citoquinas efectoras en trastornos infecciosos y trastornos autoinmunes. Adicionalmente, los presentes estudios indican que la IL-22 y sus productos aguas abajo, tales como RegIIIβ y RegIIIγ, pueden ser benéficos para el tratamiento de trastornos infecciosos.

Por lo tanto, la presente invención provee métodos para el tratamiento de tales trastornos microbianos mediante la modulación de la respuesta inmune del hospedero. Por ejemplo, una respuesta inmune anti-microbiana en un sujeto puede ser mejorada o inhibida aumentando o disminuyendo una actividad de uno o más polipéptidos antimicrobianos (AMP) que median la respuesta inmune anti-microbiana.

Más particularmente, la presente invención provee AMP, moduladores de los mismos, y métodos para usar tales composiciones para el tratamiento de trastornos microbianos. Tales trastornos microbianos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades infecciosad, por ejemplo, diarrea causada por EHEC y EPEC, Enfermedad Inflamatoria del Intestino (IBD) y, más particularmente, Colitis Ulcerativa (UC) y enfermedad de Crohn (CD).

Todas las referencias, incluyendo patentes, solicitudes y literatura científica, citados en la presente están aquí incorporados mediante referencia, en su totalidad.

TÉCNICAS GENERALES

Las técnicas y procedimientos aquí descritos o referenciados son generalmente entendidos y empleados comúnmente usando metodología convencional por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual,* y *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita et al., eds., J. B. Lippincott Company, 1993).

I. DEFINICIONES

Para propósitos de interpretar esta descripción, se aplicarán las siguientes definiciones y siempre que sea apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y vice versa. En caso que cualquier

definición indicada más adelante esté en conflicto con cualquier documento aquí incorporado por referencia, regirá la definición indicada más adelante.

Un "polipéptido anti-microbiano" o "AMP" es un polipéptido que media, o de otra forma efectúa, una respuesta inmune anti-microbiana a un patógeno microbiano, y abarca un fragmento, variante, análogo, derivado o imitador del mismo que retiene una actividad de AMP, p.e., una antividad anti-microbiana, o actividad para modular una respuesta inmune anti-microbiana. Estos métodos se pueden usar para tratar sujeros que están infectados o en riesgo de infección con un patógeno microbiano infeccioso, p.e., un virus o bacteria. La actividad del AMP puede ser modulada o regulada diferencialmente (p.e., regulada ascendente o descendentemente) con relación a otro AMP o el mismo AMP.

Un AMP de la presente invención abarca un AMP nativo y formas variantes del mismo (que se definen adicionalmente en la presente), y pueden ser asilados de una variedad de fuentes, tales como de tejido humano o de otra fuente, o preparados mediante métodos recombinantes o sintéticos. Un AMP nativo puede ser de cualquier especie, p.e., murino o humano. Los AMP de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, LT, IL-6, IL-18, IL-22, IL-23 (incluyendo p.e., IL-23 p19 o IL-23 p40), y Reg o proteínas relacionadas con Reg codificadas por los genes de la superfamilia Reg. La superfamilia Reg incluye Reg y genes relacionados con Reg de humano, rata, y ratón, y están agrupados en cuatro subclases, tipos I, II, III, y IV. Por ejemplo, el tipo I incluye *REG Iα* humano, *REG Iβ* humano, *RegI* de rata, y *RegI* de ratón; el tipo II incluye *RegII* de ratón; el tipo III incluye REG III humano, *HIP/PAP* humano (gen expresado en carcinoma hepatocelular-intestino-páncreas/gen que codifica la proteína asociada con la pancreatitis), *PAP/Péptido23* de rata, *RegIII/PAPII* de rata, *PAP III* de rata, *RegIIIα, RegIIIβ, RegIIIγ* de ratón, *RegIIIδ* de ratón, e *INGAP* de hámster (proteína asociada con la neogénesis de islote).

El tipo IV contiene *REG IV* humano. Adicionalmente, se informa que la Secuencia relacionada con Reg humana (RS) es un seudogén. En una realización, la proteína REG está codificada por un miembro de la familia de gen REG humano que incluye, pero no se limita a, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV, y la secuencia relacionada con Reg (RS).

La linfotoxina (LT) es una citoquina trimérica en la familia de necrosis de tumor; expresada por células T, B y NK; y está involucrada en la señalización de respuesta inflamatoria y la arquitectura de órgano linfoide secundario. La "Linfotoxina" o "LT" se define aquí como un polipéptido biológicamente activo que tiene la secuencia de amino ácido mostrada en la FIG. 2A de la Pat. US No. 5,824,509. La "LT" está definida para excluir específicamente la TNFα humana o sus análogos animales naturales (Pennica *et al, Nature* 312:20/27:724-729 (1984) y Aggarwal *et al, J. Biol. Chem.* 260: 2345-2354 (1985)). Como se usa aquí, "LT" se refiere a una o más subunidades de LT descritas aquí.

La "Linfotoxina-α" o "'LTα" está definida para excluir específicamente la LTβ humana definida, por ejemplo, en US 5,661,004. "trímero de linfotoxina-3" o "LTα3" se refiere a un homotrímero de monpomeros de LTα. Este homotrímero está anclado a la superficie celular mediante LTβ, la transmembrana y los dominios citoplásmicos.

La "Linfotoxina-αβ" o "'LTαβ" o "complejo LTαβ" se refiere a un heterotrímero de LTα con LTβ. Estos heterotrímeros contienen dos subunidades cualquiera de LTα y una subunidad de LTβ (LTα2β1), o una subunidad de LTα y dos de LTβ (LTα1β2). El término "'LTaβ" o "LTab" como se usa aquí se refiere a un heterotrímero constituido por una subunidad de LTα y dos de LTβ (LTα1β2).

"receptor 1 del factor de necrosis de tumor" o "TNFR1" y "receptor II del factor de necrosis de tumor" o "TNFRII" se refiere a los receptores de TNF de superficie celular para el homotrímero LTα3, también conocidos como p55 y p75, respectivamente.

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

En algunas realizaciones, la secuencia de amino ácido de un AMP de la presente invención comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del siguiente grupo: SEQ ID NO: 2 (IL-6 humana), SEQ ID NO: 4 (IL-12B humana), SEQ ID NO: 6 (IL-18 humana), SEQ ID NO: 8 (IL-22 humana), SEQ ID NO: 10 (IL-23 p19 o IL-23A humana), SEQ ID NO: 12 (REG1A humana), SEQ ID NO: 14 (REG 1B humana), SEQ ID NO: 16 (REG3A humana, variante 1), SEQ ID NO: 18 (REG3A humana, variante 2), SEQ ID NO: 20 (REG3A humana, variante 3), SEQ ID NO: 22 (REG3G humana, variante 2), SEQ ID NO: 24 (REG3G humana, variante 1), SEQ ID NO: 26 (REG4 humana), SEQ ID NO: 28 (IL-6 murina), SEQ ID NO: 30 (IL- 12B murina), SEQ ID NO: 32 (IL-18 murina), SEQ ID NO: 34 (IL-22 murina), SEQ ID NO: 36 (IL-23 p19 o IL-23A murina), SEQ ID NO: 38 (PAP murina), SEQ ID NO: 40 (REG1 murina), SEQ ID NO: 42 (REG2 murina), SEQ ID NO: 44 (REG3A murina), SEQ ID NO: 46 (REG3D murina), SEQ ID NO: 48 (REG4 murina), SEQ ID NO: 50 (LTα humana), SEQ ID NO: 52 (LTβ humana), SEQ ID NO: 54 (LTα murina), y SEQ ID NO: 56 (LTβ murina).

En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un AMP de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del siguiente grupo: SEQ ID NO: 1 (IL-6 humana), SEQ ID NO: 3 (IL-12B humana), SEQ ID NO: 5 (IL-18 humana). SEQ ID NO: 7 (IL-22 humana), SEQ ID NO: 9 (IL-23 p19 o IL-23A humana), SEQ ID NO: 11 (REG1A

humana), SEQ ID NO: 13 (REG1B humana), SEQ ID NO: 15 (REG3A humana, variante 1), SEQ ID NO: 17 (REG3A humana, variante 2), SEQ ID NO: 19 (REG3A humana, variante 3), SEQ ID NO: 21 (REG3G humana, variante 2), SEQ ID NO: 23 (REG3G humana, variante 1), SEQ ID NO: 25 (REG4 humana), SEQ ID NO: 27 (IL-6 murina), SEQ ID NO: 29 (IL-12B murina), SEQ ID NO: 31 (IL-18 murina), SEQ ID NO: 33 (IL-22 murina), SEQ ID NO: 35 (IL-23 p19 o IL-23A murina), SEQ ID NO: 37 (PAP murina), SEQ ID NO: 39 (REG1 murina), SEQ ID NO: 41 (REG2 murina), SEQ ID NO: 43 (REG3A murina), SEQ ID NO: 45 (REG3D murina), SEQ ID NO: 47 (REG4 murina), SEQ ID NO: 49 (LTα humana), SEQ ID NO: 51 (LTβ humana), SEQ ID NO: 53 (LTα murina), y SEQ ID NO: 55 (LTβ murina).

Un "polipéptido AMP de secuencia nativa" o "polipéptido AMP de secuencia nativa" se refiere a un polipéptido que comprende la misma secuencia de amino ácido que un polipéptido AMP correspondiente derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos AMP de secuencia nativa pueden ser aislados de la naturaleza o pueden ser producidos por medios recombinantes o sintéticos. Los términos abarcan específicamente formas truncadas o secretadas que se encuentran naturalmente del polipéptido AMP específico (p.e., una IL-22 que le falta su péptido de señal asociado), formas variantes que se encuentran naturalmente (p.e., formas alternativamente cortadas y empalmadas), y variantes alélicos del polipéptido que se encuentran naturalmente. En varias realizaciones de la invención, los polipéptidos AMP de secuencia nativa aquí revelados son polipéptidos maduros o de secuencia nativa de longitud total.

Un polipéptido "variante" se refiere a un polipéptido activo que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de amino ácido con una secuencia de polipéptido nativa de longitud total. Comúnmente, un polipéptido variante tendrá por lo menos aproximadamente 80% de identidad

de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 81% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 82% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 83% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 84% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 86% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 87% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 88% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 89% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 91 % de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 92% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 93% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 94% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 96% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 97% de identidad de secuencia de amino ácido, alternativamente por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia de amino ácido, y alternativamente por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de amino ácido, con una secuencia de polipéptido nativa madura o de longitud total.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de amino ácido" se define como el porcentaje de residuos de amino ácido en una secuencia candidata

que son idénticos a los residuos de amino ácido en una secuencia de polipéptido específica o de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de amino ácido se puede lograr de diferentes formas que están dentro de la pericia de la técnica, por ejemplo, usando software de computadora disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud total de las secuencias que están siendo comparadas. Para las comparaciones de secuencia de amino ácido, el % de identidad de secuencia de amino ácido de una secuencia de amino ácido A dada a, con, o contra una secuencia de amino ácido B dada (la cual puede alternativamente ser expresada como una secuencia de amino ácido A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de amino ácido a, con, o contra una secuancia de amino ácido B dada) se calcula de la siguiente forma:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de amino ácido marcados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencia en esa alineación de programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de amino ácido en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de amino ácido A no es igual a la longitud de la secuencia de amino ácido B, el % de identidad de secuencia de amino ácido de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de amino ácido de B a A. Como ejemplos de cálculo de % de identidad de secuencia de amino ácido usando este método, las Tablas 1 y 2 siguientes demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencia de amino ácido de la secuencia de amino ácido designada "Proteína de Referencia" a la secuencia de amino ácido designada "IL-22", en donde "IL-22"

representa la secuencia de amino ácido de un polipéptido IL-22 de interés, la "Proteína de Referencia" representa la secuencia de amino ácido de un polipéptido contra el cual se está comparando el polipéptido "IL-22" de interés, y "X, "Y" y "Z" representan cada uno diferentes residuos de amino ácido.

Tabla 1

IL-22 XXXXXXXXXXXXXXX (Longitud = 15 amino ácidos)

Proteína de Referencia XXXXXYYYYYYY (Longitud = 12 amino ácidos)

% de identidad de secuencia de amino ácido =
(el número de residuos de amino ácido que coinciden idénticamente entre las dos secuencias de polipéptido) dividido por (el número total de residuos de amino ácido del polipéptido IL-22) =

5 dividido po 15 = 33.3%

Tabla 2

IL-22 XXXXXXXXXX (Longitud = 10 amino ácidos)

Proteína de Referencia XXXXXYYYYYYZ/YZ (Longitud = 15 amino ácidos)

% de identidad de secuencia de amino ácido =
(el número de residuos de amino ácido que coinciden idénticamente entre las dos secuencias de polipéptido) dividido por (el número total de residuos de amino ácido del polipéptido IL-22) =

5 dividido por 10 = 50%

Una molécula biológica "aislada", tal como los diferentes polipéptidos, polinucleótidos, y anticuerpos revelados aquí, se refiere a una molécula biológica que ha sido identificada y separada y/o recuperada a partir de al menos un componente de su ambiente natural.

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

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea parcialmente o totalmente, inhibe, o neutraliza una actividad biológica de un polipéptido. "Antagonista" también abarca moléculas que inhiben totalmente o parcialmente la transcripción o traslación de ARMm que codifica el polipéptido. Moléculas antagonistas adecuadas incluyen, p.e., anticuerpos antagonistas o fragmentos de anticuerpo; fragmentos o variantes de secuencia de amino ácido de un polipéptido nativo; péptidos; oligonucleótidos en contrasentido; moléculas orgánicas pequeñas; y ácidos nucleicos que codifican antagonistas de polipéptido o anticuerpos antagonistas. La referencia a "un" antagonista abarca un solo antagonista o una combinación de dos o más antagonistas diferentes.

El término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita parcialmente o totalmente una actividad biológica de un polipéptido, p.e., un AMP nativo. "Agonist" también abarca moléculas que estimulan la transcripción o traslación del ARMm que codifica el polipéptido. Moléculas agonistas adecuadas incluyen, p.e., anticuerpos agonistas o

fragmentos de anticuerpo: un polipéptido nativo; fragmentos o variantes de secuencia de amino ácido de un polipéptido nativo; péptidos; oligonucleótidos en contrasentido; moléculas orgánicas pequeñas; y ácidos nucleicos que codifican agonistas de polipéptidos o anticuerpos. La referencia a "un" agonista abarca un solo agonista o una combinación de dos o más agonistas diferentes.

Una "respuesta inmune anti-microbiana" incluye, pero no se limita a, resistencia o defensa a infección por un patógeno microbiano. Tal resistencia o defensa puede producir una inhibición o disminución de la infectividad microbiana, replicación, proliferación u otra actividad de un patógeno microbiano. En particular, el tratamiento que produce una respuesta inmune anti-microbiana puede resultar en alivio de un trastorno microbiano o síntoma de un trastorno microbiano.

"Alivio", "aliviar" o equivalentes de los mismos, se refiere tanto al tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas, en donde el objeto es mejorar, evitar, hacer más lenta (decrecer), disminuir o inhibir el trastorno microbiano objetivo o síntoma del mismo. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos susceptibles a tener el trastorno o aquellos a quienes se les ha evitado el trastorno.

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

La administración "crónica" se refiere a la administración de agente(s) de un modo continuo opuesto a un modo agudo, con el fin de mantener el efecto terapéutico inicial por un período de tiempo extendido, la administración

"intermitente" es el tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

"Mamífero" para propósitos del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, roedores (p.e., ratones y ratas), y monos; animales domésticos y de granja; y animales de zoológico, deportes, laboratorio, o mascotas, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. En algunas realizaciones, el mamífero se selecciona de un humano, roedor o mono. Igualmente, el "sujeto" para los propósitos del tratamiento, se refiere a un sujeto mamífero, e incluye sujetos humanos y veterinarios.

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

"Vehículos" como se usa aquí, incluyen vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizantes que no son tóxicos a la célula o mamífero que está siendo expuesto a este, en las dosis y concentraciones empleadas. Usualmente, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa amortiguada de pH. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; amino ácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contrapones formadores de sal tales

como sodio; y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, polietilen glicol (PEG), y PLURONICS™.

Los "anticuerpos" (Abs) e "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas que tienen características estructurales similares. Mientras los anticuerpos exhiben especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas tipo anticuerpo que generamente carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos de la última clase son, por ejemplo, producidos a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles aumentados por los mielomas.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan intercambiablemente en el sentido más amplio, e incluyen anticuerpos monoclonales (p.e., anticuerpos monoclonales de longitud total o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (p.e., anticuerpos biespecíficos con tal que muestren la actividad biológica deseada) y pueden también incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (descritos en más detalle en la presente). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

Un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno particular se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno con suficiente afinidad, de forma que el anticuerpo es útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico para el marcado del antígeno. Preferiblemente, el alcance de unión de tal anticuerpo a un polipéptido no marcado es de aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo al antígeno marcado, medido, p.e., mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a un antígeno marcado tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, o ≤ 0.1 nM.

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

El término "variable" se refiere al hecho que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a través de los dominios variables. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables (HVRs) tanto en los dominios variables de cadena ligera como pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones de marco (FR). Los dominios variables de cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en gran parte una configuración de lámina beta, conectada por tres CDRs, las cuales forman asas que se conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina beta. Las CDRs en cada cadena son mantenidas en proximidad cercana por las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente

distintos, llamados kappa (K) y lambda (λ), con base en las secuencias de amino ácido de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de amino ácido de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden ser asignados a diferentes clases. Existen cinto clases importantes de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden estar divididas adicionalmente en subclases (isotipos), p.e., IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, e IgA_2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen generalmente en, por ejemplo, Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud total" "anticuerpo intacto" y "anticuerpo entero" se usan aquí intercambiablemente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no fragmentos de anticuerpo definidos más adelante. Los términos se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen la región Fc.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solamente una porción de un anticuerpo intacto, en donde la porción retiene al menos una, y tantas como la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas con esa porción, cuando están presentes en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto, y así, retiene la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, retiene

al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión FcRn, la modulación de vida media del anticuerpo, la función ADCC y la unión de complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, tal fragmento de anticuerpo puede comprender un miembro de unión a antígeno unido a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

La digestión de papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y es aún capa de unirse curzadamente al antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste de un dímero de dominio variable de una cadena ligera y una cadena pesada en asociación estrecha, no covalente. En una especie de Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden está unidos covalentemente mediante un enlazador de péptido flexible de forma que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a aquella en una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie de un dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDRs confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDRs específicas para un antígeno) tiene la

habilidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión entero.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena ligera y pesada, y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primero dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el terminal carboxi del dominio de cadena pesada CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación aquí para Fab' en el cual el(los() residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Fragmentos de anticuerpo de "Fv de cadena simple" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena sencilla de polipéptido. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlazador de polipéptido entre los dominios VH y VL que permiten al scFv formar la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv, ver Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer- Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Al usar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejado entre los dos dominios sobre la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con dominios

complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos están descritos completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO93/1 161; Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también están descritos en Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, p.e., los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, p.e., mutaciones que se encuentran naturalmente, que pueden estar presentes en cantidades menores. Así, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que no está en una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, tal anticuerpo monoclonal incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que se une a un objetivo, en donde la secuencia de polipéptido de unión a objetivo se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una sola secuencia de polipéptido de unión a objetivo a partir de una pluralidad de secuencias de polipéptido. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon de una pluralidad de clones, tales como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fago, o clones de ADN recombinante. Se entenderá que una secuencia de unión objetivo puede ser adicionalmente alterada, por ejemplo, para mejorar la afinidad para el objetivo, para humanizar la secuencia de unión del objetivo, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión objetiva alterada también es un anticuerpo monoclonal de esta invención. En contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo

monoclonal está dirigido contra un determinante simple en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal tienen la ventaja que típicamente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que es obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser usados de acuerdo con la presente invención puede ser hechos por una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (p.e., Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (ver, p.e., Patente U.S. No. 4,816,567), tecnologías de despliegue del fago (ver, p.e., Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol Biol.* 222: 581 -597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl Acad. Sci.* USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol Methods* 284(1-2):119-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o tipo humano en animales que tienen parte o todos los puntos de inmunoglobulina humana o genes que codifican las secuencias de inmunoglobulina humana (ver, p.e., WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); Patentes U.S. Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; Marks et al., *Biotechnology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol* 14: 845-851 (1996); Neuberger,

Nature Biotechnol 14: 826 (1996) y Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales presentes incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los cuales una proción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correpondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente U.S. No. 4,816,567; y Morrison et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 81 :6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p.e., murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo recipiente) en la cual los residuos de una región hipervariable del recipiente son reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo, o primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad y/o capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la región de marco (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo recipiente o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se pueden hacer para refinar adicionalmente el desempeño del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las asas hipervariables corresponden a aquellas de una inmunoglobulina

no humana, y todos o sustancialmente todos los FRs son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al., Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Ver también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas allí: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de amino ácido que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha hecho usando cualquiera de las técnicas para hacer anticuerpos humanos reveladas aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Dependiendo de la secuencia de amino ácido del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases. Existen cinco clases importantes de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), p.e., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2.

Un anticuepo "madurado de afinidad" es uno con una o más alteraciones en uno o más HVRsdel mismo, que producen un mejoramiento en la afinidad del anticuerpo para antígeno, comparada con un anticuerpo base que no posee estas alteraciones. En una realización, un anticuerpo madurado de afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados de afinidad pueden ser producidos

mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al., Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración de afinidad mediante mezclado del dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de HVR y/o residuos de marco se describe en: Barbas et *al. Proc Nal. Acad. Sci.* USA 91:3809-3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169: 147- 155 (1995); Yelton *et al. J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al, J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al, J. Mol. Biol.* 226:889- 896 (1992).

Un anticerpo de "bloqueo", anticuerpo "neutralizante", o anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno al que se une. Tales anticuerpos puede inhibir sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo agonista" como se usa aquí, es un anticuerpo que imita parcialmente o totalmente una actividad biológica de un polipéptido de interés.

"Funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc se secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de amino ácido) de un anticuerpo, y varía con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de receptores de superficie celular (p.e., receptor de célula B); y activación de célula B.

"Afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza del total de la suma de interacciones no covalentes entre un sitio de unión sencillo de una molécula (p.e., un anticuerpo) y su compañero de unión (p.e., un antígeno). A menos que se indique de otra forma, como se usa aquí, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre

miembros de un par de unión (p.e., anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede generalmente ser representada por la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en la presente. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen a antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conoce en la técnica una variedad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales se puede usar para los propósitos de la presente invención. Realizaciones ilustrativas específicas se describen a continuación.

En una realización, la "Kd" o "valor Kd" de acuerdo con esta invención, se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe en el siguiente ensayo. La afinidad de unión de solución de Fabs por antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno (^{125}I)-marcado en la presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, luego capturando el antígeno unido con un anticuerpo anti-Fab – placa recubierta (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microlitro (Dynex) son recubiertas con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9.6), y posteriormente bloqueadas con 2% (p/v) de albúmina de suero bovina en PBS por dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), se mezclan [^{125}I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones seriales de un Fab de interés (p.e., consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). El Fab de interés es entonces incubado durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar por un período más largo (p.e., aproximadamente 65 horas)

para asegurar que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, las mezclas son transferidas a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (p.e., por una hora). La solución es entonces removida y la placa lavada ocho veces con Tween-20 al 0.1% en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150 µl/pozo de centelleo (MicroScint-20; Packard), y las placas son contadas sobre un gama Topcount (Packard) por diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que dan menor o igual al 20% de unión máxima para uso en ensayos de unión competitivos.

De acuerdo con otra realización, el Kd o valor Kd se mide mediante ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmobilizado a ~10 unidades de respuesta RU). Brevemente, los chips de biosensor de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) son activados con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El antígeno es diluido con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, hasta 5 µg/ml (~0.2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1M para bloquear los grupos no reaccionados. Para las medidas cinéticas, se inyectan diluciones seriales dobladas de Fab (0.78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0.05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y las velocidades de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir uno-a-uno simple (Software de Evaluación de BIAcore versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de equilibrio de disociación (Kd) se calcula como la relación k_{off}/k_{on}. Ver, p.e., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881. Si la velocidad on excede $10^6 M^{-1}s^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces se puede

determinar la velocidad on usando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o descenso de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7.2, enla presencia de concentraciones en aumento de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) oun espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "velocidad on", "velocidad de asociación", "'tasa de asociación", o "K_{on}" de acuerdo con esta invención también se puede determinar como se describe anteriormente, usando un sistema BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo será purificado (1) a más del 95% en peso del anticuerpo determinado por el método de Lowry, y de manera más preferida más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de amino ácido N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratorioa, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes ya que por lo menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Comúnmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación.

La palabra "marcador" cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directamente o indirectamente a una molécula (tal como un ácido nucléico, polipéptido, o anticuerpo) con el fin de generar una molécula "marcada". El marcador puede ser detectable por sí mismo (p.e. marcadores de radioisótopo o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato, produciendo un producto detectable.

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la cual se puede adherir una molécula (tal como un ácido nucleico, polipéptido, o anticuerpo). Ejemplos de fases sólidas abarcadas aquí incluyen las formadas parcialmente o totalmente de vidrio (p.e., vidrio de poro controlado), polisacáridos (p.e., agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, polivinil alcohol y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pozo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (p.e., una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente U.S. No. 4,275, 149.

Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactante, la cual es útil para la liberación de un fármaco (tal como un ácido nucleico, polipéptido, anticuerpo, agonista o antagonista) a un mamífero. Los componentes del liposoma están comúmente dispuestos en una formación de bicapas, similar a la distribución de lípido de membranas biológicas.

Una "molécula pequeña" o "molécula orgánica pequeña" se define aquí como una molécula orgánica que tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

Un "oligopéptido" que se une a un polipéptido objetivo es un oligopéptido que es capaz de unirse al polipéptido objetivo con suficiente afinidad de forma que el oligopéptido es útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico para el marcado del polipéptido. En ciertas realizaciones, el grado de unión de un oligopéptido a un polipéptido no marcado, no relacionado es de menos de aproximadamente 10% de la unión del oligopéptido al polipéptido objetivo, medido p.e., mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En ciertas realizaciones, un oligopéptido se une a un polipéptido objetivo con una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, o ≤ 0.1 nM.

Una "molécula orgánica" que se une a un polipéptido objetivo es una molécula orgánica diferente a un oligopéptido o anticuerpo definido aquí, que es capaz de unirse a un polipéptido objetivo con suficiente afinidad de forma que la molécula orgánica es útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico para marcar el polipéptido. En ciertas realizaciones, la extensión de unión de una molécula orgánica a un polipéptido no relacionado, no marcado es menos de aproximadamente 10% de la unión de la molécula orgánica al polipéptido objetivo medida, p.e., mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En ciertas realizaciones, una molécula orgánica se une a un polipéptido objetivo con una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, o ≤ 0.1 nM.

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

"Trastorno microbiano" se refiere a una enfermedad o condición en donde un patógeno microbiano cause, media, o contribuye de otra forma a una morbilidad de la enfermedad o condición. También se incluyen enfermedades en las cuales la estimulación o intervención de una respuesta anti-microbiana

tiene un efecto mejorador en la progresión de la enfermedad. Sentro de este término se incluyen enfermedades o condiciones infecciosas, y enfermedades oportunistas resultantes de la infección primaria por un patógeno microbiano. Ejempos de tal enfermedad infecciosa, incluyen, pero no se limitan a, diarrea causada por EHEC y EPEC, Enfermedad Inflamatoria del Intestino (IBD) y, más particularmente, Colitis Ulcerativa (UC) y enfermedad de Crohn (CD).

El término "enfermedad mediada por célula T" significa una enfermedad en la cual las células T median directa o indirectamente o contribuyen de otra forma a una morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por célula T puede estar asociada con efectos mediados por célula, efectos mediados por linfoquina, etc., e incluso efectos asociados con células B si las células B son estimuladas, por ejemplo, por las linfoquinas secretadas por las células T.

Un "trastorno autoinmune" o "autoinmunidad" se refiere a cualquier condición en la cual se monta una respuesta humoral o inmune mediada por célula contra un tejido propio del cuerpo. Un "trastorno autoinmune mediado por IL-23" es cualquier trastorno autoinmune que es causado por, mantenido o exacerbado por la actividad de IL-23.

"Inflamación" se refiere a la acumulación de leucocitos y la dilatación de los vasos sanguíneos en un sitio de lesión o infección, causando típicamente dolor, hinchazón y enrojecimiento,

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

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

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

"Enfermedad Inflamatoria del Intestino" o "IBD" se refiere a un trastorno crónico caracterizado por inflamación del tracto gastrointestinal. La IBD abarca Colitis Ulcerativa, la cual afecta el intestino grueso y/o recto, y endermedad de Crohn, la cual puede afectar el sistema gastrointestinal entero, pero afecta más comúnmente al intestino delgado (íleo) y posiblemente al intestino grueso.

El término "cantidad efectiva" es una concentración o cantidad de una molécula (p.e., un ácido nucleico, polipéptido, agonista, o antagonista) que produce el logro de un propósito particular indicado. Una "cantidad efectiva" puede ser determinada empíricamente. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una concentración o cantidad de una molécula que es efectiva para lograr un efecto terapéutico indicado. Esta cantidad también puede ser determinada empíricamente.

El término "agente citocóxico" como se usa aquí se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (p.e., I^{131}, I^{123}, Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterápicos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, o fragmentos de las mismas.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula que sobreexpresa un gen, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Así, un agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan tales genes en fase S. Ejempos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes qie bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio diferente a la fase S), tales como

agentes que incluyen la detención de G1 y la detención de fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxol, e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposida, y bleomivina. Estos agentes que detienen G1 también se mezclan en la detención en la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "*Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs*" de Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la p.13.

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra población de células como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas son las linfoquinas, monoquinas, y las hormonas de polipéptido tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, N-metionil hormona de crecimiento humana, y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteína tales como hormona de estimulación de folículo (FSH), hormona de estimulación de tiroides (TSH), y horomona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblasto; prolactina; lactógeno placentario; factor-α y –β de necrosis de tumor; linfotoxina-α y -β, sustancia inhibidora de mullerianos; péptido asociado con la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); factores de crecimiento de nervio tales como NGF-β; factor de crecimiento de plaqueta; factores de crecimiento transformantes (TGFs) tales como TGF-α y TGF-β; factor I y II de crecimiento tipo insulina; eritropoietina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferon-α, β, y γ; factores estimuladores de colonia

(CSFs) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tales como IL-1, IL-1α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, 1L-8. IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-6, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23; un factor de necrosis de tumor tal como TNF-α o TNF-β; y otros factores de polipéptido incluyendo LIF y ligando kit (KL). Como se usa aquí, el termino citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de célula recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

Como se usa aquí, el término "células inflamatorias" designa células que mejoran la respuesta inflamatoria tales como células mononucleares, eosinófilos, macrófagos, y neutrófilos polimorfonucleares (PMN).

II. Composiciones y Métodos de la Invención

A. Polipéptidos Anti-Microbianos (AMP) y Moduladores de los mismos

Los polipéptidos anti-microbianos (AMPs) de la presente invención son polipéptidos que median, o de otra forma efectúan una respuesta inmune anti-microbiana a un patógeno microbiano. Los AMPs de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, LT, IL-6, IL-22, IL-23 (incluyendo p.e., IL-23 p19 o IL-23 p40), y Reg o proteínas relacionadas con Reg codificadas por los genes de la super familia Reg. La super familia Reg incluye Reg y genes relacionados con Reg de humano, rata, y ratón y están agrupados en cuatro subclases, los tipos I, II, III, y IV. Por ejemplo, el tipo I incluye *REG Iα* humano, *REG Iβ* humano, *RegI* de rata, y *RegI* de ratón; el tipo II incluye *RegII* de ratón; el tipo III incluye REG III humano, *HIP/PAP* humano (gen expresado en carcinoma hepatocelular-intestino-páncreas/gen que codifica la proteína asociada con la pancreatitis), *PAP/Péptido23* de rata, *RegIII/PAPII* de rata, *PAP III* de rata, RegIIIα, RegIIIβ, RegIIIγ de ratón, *RegIIIδ* de ratón, e INGAP de hámster

(proteína asociada con la neogénesis de islote). El tipo IV contiene *REG IV* humano. Adicionalmente, se informa que la Secuencia relacionada con Reg humana (RS) es un seudogén. En una realización, la proteína REG está codificada por un miembro de la familia de gen REG humano que incluye, pero no se limita a, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV, y la secuencia relacionada con Reg (RS).

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

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

Una actividad de un AMP de la presente invención puede ser aumentada o disminuida y/o regulada diferencialmente con relación a la actividad de otro AMP o el mismo AMP. Ejemplos de una actividad de AMP de la presente

invención, incluye pero no se limita a, expresión de AMP, transducción de señal, unión a un compañero de unión, respuesta anti-microbiana, u otra actividad biológica o inmunológica del mismo.

En una realización, un aumento de la actividad de uno o más AMPs de la presente invención produce una respuesta inmune anti-microbiana mejorada o inducida en un sujeto.

En una realización, los AMPs de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que interactúan directamente o indirectamente con IL-22, p.e., polipéptidos que están aguas arriba o aguas debajo de una ruta de trasducción de señal de IL-22 que media la resistencia del hospedero a la infección por un patógeno microbiano (p.e., una bacteria o virus). Ejemplos de tales AMPs incluyen, pero no se limitan a, LT, IL-6, IL-18, e IL-23 (incluyendo p.e., IL-23 p19 o IL-23 p40).

Los moduladores de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos y moléculas de ácido nucleico (p.e., una molécula de ADN o molécula de ARN) que modula directamente o indirectamente una actividad de un AMP. Ejemplos de tal modulación incluyen, pero no se limitan a, un aumento, disminución, inducción o activación, inhibición, o regulación (p.e., regulación ascendente o descendente) de una actividad de un AMP de la presente invención.

En una realización particular, el modulator modula indirectamente la actividad de IL-22 disminuyendo o inhibiendo la actividad de la Proteína de Unión a IL-22 (BP) y de esta forma, aumentar la actividad de IL-22. En una realización adicional, el modulador disminuye o inhibe la unión de BP IL-22 a IL-22 y así, aumenta la actividad de IL-22.

En algunas realizaciones, el modulador es un polipéptido p.e., un polipéptido que se une o de otra forma interactúa con un AMP para aumentar, inducir, o regular una actividad de un AMP. En una realización, el modulador es un polipéptido de fusión que modula una actividad de AMP.

En una realización, el modulador es un anticuerpo que se une a un AMP. En una realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o $(Fab')_2$. En otra realización, el anticuerpo es un polipéptido de fusión (p.e., un polipéptido de fusión a Fc). En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En una realización particular, el anticuerpo es humanizado. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otra realización, el anticuerpo se une al mismo epítopo como un anticuerpo seleccionado de uno humano, primate no humano, u otro mamífero p.e.,cerdo, oveja, conejo, marmota, rata, o ratón). En una realización particular, el anticuerpo es un agonista de AMP.

En una realización particular, el modulador es un AMP recombinante o molécula de acido nucleico que codifica un AMP (p.e., una molécula de a ADN o ARN). En otra realización particular, el modulador es un AMP recombinante o molécula de acido nucleico que codifica un AMP (p.e., una molécula de ADN o ARN) que puede ser expresada en una célula.

Los AMPs de la presente invención abarca AMPs maduros o nativos de longitud total así como variantes de los mismos. Los variantes de AMP se pueden preparar introduciendo cambios de nucleotido apropiados en el ADN que codifica un AMP, y/o mediante síntesis del polipéptido anti-microbiano deseado. Los expertos en la técnica apreciarán que los cambios de amino ácido pueden alterar el procesamiento post-transduccional de un polipéptido de

la presente invención, tal como el cambio del número o posición de los sitios de glicosilación o las características de anclaje de membrana.

Las variaciones en el AMP nativo o en varios dominios del AMP, descritos aquí se pueden hacer, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y lineamientos para las mutaciones conservadoras y no conservadoras indicadas, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 5,364,934. Las variaciones pueden ser una sustitución, deleción o inserción de uno o más codones que codifican el AMP que produce un cambio en la secuencia de amino ácido del AMP comparado con un AMP de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un amino ácido con cualquier otro amino ácido en uno o más dominios del AMP. La guía para determinar cual residuo de amino ácido puede ser insertado, sustituido o eliminado sin afectar adversamente la actividad deseada se puede encontrar comparando la secuencia del AMP con la de moléculas de proteína conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de amino ácido hechos en las regiones de alta homología. Las sustituciones de amino ácido pueden ser el resultado de reemplazar un amino ácido con otro amino ácido que tiene estructura y/o propiedades químicas similares, tales como el reemplazo de una leucina con una serina, p.e., reemplazos de amino ácido conservadores. Las inserciones o eliminaciones pueden estar opcionalmente en el rango de aproximadamente 1 a 5 amino ácidos. La variación permitida puede ser determinada haciendo inserciones, deleciones o sustituciones sistemáticamente de amino ácidos en la secuencia, y probando los variantes resultantes para actividad exhibida por la secuencia nativa madura o de longitud total.

En realizaciones particulares, las sustituciones conservadoras de interés se muestran en la Tabla 3 bajo el encabezado sustituciones preferidas. Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces más

cambios sustanciales, denominados sustituciones ejemplares en la Tabla 6, o descritas adicionalmente más adelante con referencia a las clases de amino ácido, se introducen y los productos son seleccionados.

Tabla 3

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

Las modificaciones sustanciales de función o identidad inmunogólgica del polipéptido AMP se realizan seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura del armazón del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo o (c) la masa de la cadena lateral. Los residuos que se encuentran naturalmente se dividen en grupos con base en propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
(2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;
(3) ácidos: asp, glu;
(4) básicos: asn, gin, his, lys, arg;
(5) residuos que influyen en la orientación de cadena: gly, pro; y
(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras permitirán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales residuos sustituidos también pueden ser introducidos en los sitios de sustitución conservadores o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

Se pueden hacer variaciones usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótico (dirigida al sitio), barrido por alanina, y mutagénesis de PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids Res.,* 10:6487 (1987)], la mutagénesis de cassette [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], la mutagénesis de sitio de restricción [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas se puede realizar sobre ADN clonado para producir un ADN que codifica un AMP variante.

Los fragmentos de un AMP u otros polipéptidos de la presente invención también se proporcionan en la presente. Tales fragmentos pueden ser truncados en el terminal N o terminal C, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína nativa de longitud total. Ciertos fragmentos carecen de residuos de amino ácido que no son esenciales para una actividad biológica deseada de un AMP o polipéptido de la presente invención. En consecuencia, en ciertas realizaciones, un fragmento de un AMP u otro polipéptido de la presente invención, es biológicamente activo. En ciertas realizaciones, un fragmento de AMP de longitud total carece de la secuencia del péptido de señal N-terminal. En ciertas realizaciones, un fragmento del AMP de longitud total es una forma soluble de un AMP unido a membrana. Por ejemplo, una forma soluble de AMP puede carecer de toda o una porción sustancial del domino transmembrana.

Las modificaciones covalentes de los AMPs u otros polipéptidos de la presente invención están incluidas dentro del alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de amino ácido marcados de un polipéptido de la presente invención con un agente derivatizados orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N o C terminaales del polipéptido. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para entrecruzar el polipéptido con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en el método para purificar anticuerpos al polipéptido, y vice-versa. Los agentes de entrecruzamiento usados comúnmente incluyen, p.e., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-acidosalicílicon, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo disuccinimidil ésteres tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen desamidación de residuos glutaminil y asparaginil a los residuos glutamil y aspartil correspondientes, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de seril o treonil, metilación de los grupos α-amino de cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente de un polipéptido de la presente invención incluido dentro del alcance de esta invención comprende alterar el patrón de glicosilación nativo del polipéptido. "Alterar el patrón de glicosilación nativo" significa, para estos propósitos, eliminar una o más mitades carbohidrato encontradas en la secuencia nativa de un polipéptido de la presente invención (ya sea removiendo el sitio de glicosilación subyacente o eliminando la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o agregando uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa del polipéptido. Adicionalmente, la frase incluye cambios cualitativos de la glicosilación de las proteínas nativas, que involucra un cambio de la naturaleza y proporciones de las diferentes mitades carbohidrato presentes.

Un polipéptido de la presente invención también puede ser modificado para formar una molécula quimérica que comprende el polipéptido fusionado a otro polipéptido o secuencia de amino ácido heteróloga. En una realización, una molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido con un polipéptido marcador el cual provee un epítopo al cual se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-marcador. El marcador de epítopo es colocada generalmente en el terminal amino o carboxilo del polipéptido. La presencia de tales formas de epítopo marcado del polipéptido pueden ser detectadas usando un anticuerpo contra el polipéptido marcado. Además, la

provisión del marcador de epítopo permite que el AMP sea fácilmente purificado mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-marcador u otro tipo de matriz de afinidad que se une al marcador de epítopo. Se conocen bien en la técnica varios tipos de polipéptidos marcadores y sus respectivos anticuerpos. Ejemplos incluyen marcadores de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gli); el polipéptido marcador HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E 10. G4, B7 y 9E10 de estos [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)|; y marcador de glicoproteína D del virus del Herpes Simplex (gD) y su anticuerpo (Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos marcadores incluyen el péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido del epítopo de KT3 [Martin et al., Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido de epítopo de alfa-tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el marcador del péptido de proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 87:6393-6397 (1990)].

En otra realización, una molécla quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido de la presente invención con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también referida como una "inmunoadhesina"), tal fusión podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble de un polipéptido de la presente invención (p.e., un AMP o modulador polipéptido del mismo) en lugar de almenos una región variable dentro de una molécula Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones de bisagra, CH2 y CH3, o bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina ver también la Patente US No. 5,428,130 emitida el 27 de Junio de 1995.

1. Preparación de Polipéptidos

Los polipéptidos de la presente invención se pueden preparar por métodos recombinantes de rutina, p.e., cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica un AMP o modulador polipéptido del mismo. También se proveen las células hospederas que comprenden cualquier vector. A manera de ejempo, las células hospederas pueden ser células CHO, *E. coli*, o levadura. Un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos aquí descritos se provee adicionalmente y comprende cultivar células hospederas bajo condiciones adecuadas para expresión del polipéptido deseado, recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

En otras realizaciones, la invención providee moléculas quiméricas que comprenden cualquiera de los polipéptidos aquí descritos fusionado a un polipéptido heterólogo o secuencia de amino ácido. Ejemplos de tales moléculas quiméricas incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los polipéptidos aqupi descrito fusionado a una secuencia marcadora de epítopo o una región Fc de una inmunoglobulina.

Se pueden emplear métodos alternativos, que son bien conocidos en la técnica, para preparar un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, una secuencia que codifica un polipéptido o porción del mismo, se puede producir mediante síntesis directa del péptido usando técnicas de fase sólida [ver, p.e., Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963)]. Se puede llevar a cabo síntesis de proteína *in vitro* usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, usando un sintetizador de Péptido Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Varias porciones de un polipéptido de la

presente invención o porción de los mismos, se puede sintetizar químicamente por separado y combinar usando métodos enzimáticos para producir el polipéptido de longitud total o porción del mismo.

Los polipéptidos expresados recombinantemente de la presente invención pueden ser recuperados del medio de cultivo o de lisados de células hospederas. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase reversa; cromatograf+ia sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatoenfoque; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración de gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de Proteína A Sefarosa para remover contaminantes tales como IgG; y columnas de quelación de metal para unir las formas marcadas con epítopo de un polipéptido de la presente invención. Se pueden emplear varios métodos de purificación de proteína y tales métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo en Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). El (los) paso(s) de purificación seleccionado(s) dependerá, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y el polipéptido particular producido. Los polipéptidos de LT pueden ser purificados expresando un polipéptido de Lt marcado, tal como, por ejemplo, un polipéptido LTα-marcado (SEQ ID NO:61).

2. Detección de la Expressión de Gen

La expresión de un gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser detectada por varios métodos dela técnica, p.e., detectando al expresión de ARNm que codifica el polipéptido. Como se usa aquí, el término "detectar" abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Para

detectar la expresión de un polipéptido de la presente invención, se puede identificar, p.e., aquellos tejidos que expresan este gen. La expresión de gen se puede medir usando ciertos métodos conocidos por los expertos en la técnica, p.e., transferencia Northern, (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 77:5201-5205 [1980]); PCR cuantitativa; o hibridación *in situ*, usando una sonda apropiadamente marcada, con base en las secuencias proporcionadas aquí. Alternativamente, la expresión del gen se puede medir por métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto gen. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de muestra abarca cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente. De manera conveniente, los anticuerpos se pueden preparar contra una secuencia nativa que codifica p.e., un AMP de la presente invención; contre un péptido sintético que comprende un fragmento de la secuencia del AMP; o contra una secuencia exógena fusionada a un polipéptido o fragmento del mismo (incluyendo un péptido sintético).

B. Anticuerpos

Se proveen anticuerpos que se unen a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o más adelante. En una realización, anticuerpo aislado que se une a un AMP de la presente invención y de esta forma modula la actividad del AMP, p.e., aumentando una actividad del AMP. Anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, humanos, biespecícficos, y heteroconjugados. Un anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, p.e., un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')2. En una realización, se provee un anticuerpo aislado que se une a una IL-22. En tal realización, un anticuerpo aumenta parcialmente o completamente la actividad de un AMP de la presente invención.

Los anticuerpos monoclonales ejemplares que se unen a un AMP de la presente invención se describen en la presente. Estos anticuerpos incluyen los anticuerpos anti-IL-22 designados 3F11.3 ("3F11"), 11H4.4 ("11H4"), y 8E11.9 ("8E11"), y los anticuerpos anti-IL-22R designados 7E9.10.8 ("7E9"), 8A12.32 ('8A12"), 8H11.32.28 ("8H11"), y 12H5. En una realización, se provee un hibridoma que produce cualquiera de estos anticuerpos. En una realización, se proveen anticuerpos monoclonales que compiten con 3F11.3, 11H4.4, o 8E11.9 para la unión a IL-22. En otra realización, se proveen anticerpos monoclonales que se unen al mismo epítopo que 3F11.3, 11H4.4, o 8E11.9. En otra realización, se proveen anticerpos monoclonales que compiten con 7E9, 8A12, 8H11, o 12H5 para la unión a IL-22R. En una realización, se proveen anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítopo que 7E9, 8A12, 8H11, o 12H5. Varias realizaciones de los anticuerpos se proporcinan a continuación:

1. Anticuerpos Policlonales

Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos policlonales. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos. Los anticuerpos policlonales pueden ser cultivados en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante será inyectado en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido de interés o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil para conjugar el agente inmunizante a uba proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero que está siendo inmunizado. Ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, include pero no se limitan a hemocianina keyhole limpet, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de grano de soja. Ejemplos de adyuvantes que se pueden emplear incluyen adyuvante de Freund completo y adyuvante MPL-TDM (Lípido A monofosforilo, trehalosa dicorinomicolato

sintética). El protocoll de inmunización puede ser seleccionado por el experto en la técnica sin experimentación excesiva.

2. *Anticuerpos Monoclonales*

Los anticuerpos pueden, alternativamente, ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un animal hospedero ratón, hámster, u otro apropiado, es típicamente inmunizado con un agente inmunizante para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá típicamente el polipéptido de interés o una proteína de fusión del mismo. Generalmente se usa cualquier linfocito de sangre periférica ("PBLs") si se desean células de origen humano, o se usan células del bazo o células de glándulas linfáticas si se desean fuentes mamíferas no humanas. Los linfocitos son entonces fusionados con una línea celular inmortalizadas usando un agente de fusión adecuado, tal como polietileno glicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son usualmente células mamíferas transformadas, particularmente células de mieloma de roedor, bovino y origen humano. Usualmente se usan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden ser cultivadas en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células no fusionadas, inmortalizadas. Por ejemplo, si las células base carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá

típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células con HGPRT deficiente.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan alto nivel estable de expresión de anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son las líneas de mieloma murino, las cuales se pueden obtener, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y el American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también han sido descritas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51 - 63].

El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma son cultivadas puede entonces ser ensayado para la presencia de anticuerpos monoclonales que se unen al polipéptido de interés. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunsorbente ligado a enzima (ELISA). Tales técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal., Biochem, 107:220 (1980).

Después que se identifican las células de hibridoma deseadas, los clones pueden ser subclonados limitando los procedimientos de dilución y crecimiento u mediante métodos estándar [Goding, supra]. Los medios de

cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden ser cultivadas *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden ser aislados o purificados del medio de cultivo o fluido ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales se pueden hacer usando bibliotecas combinacionales para seleccionar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la técnica una variedad de métodos para generar bibliotecas de despliegue del fago y seleccionar tales librerías para anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Tales métodos se describen generalmente en Hoogenboom et al. (2001) en *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ), y en ciertas realizaciones, en Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340: 1073-1093.

En principio, los clones de anticuerpo sintéticos son elegidos seleccionando bibliotecas de despliegue del fago que contienen fago que muestra varios fragmentos de región variable de anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína de recubrimiento del fago. Tales bibliotecas son filtradas por cormatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan ñps fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado son adsorbidos al antígeno y de esta forma, separados de los clines no unidos en la biblioteca. Los clones de unión son entonces diluidos del antígeno, y pueden ser enriquecidos adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de la invención se pueden obtener diseñando un procedimiento de selección de antígeno adecuado para elegir el

clon de fago de interés seguido por la construcción de un clon de anticuerpo de longitud total usando las secuencias Fv del clon de fago de interés y las secuencias de región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, NIH Publication 91 -3242, Bethesda MD (1991), vols. 1 -3.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente U.S. No. 4,816,567. El AND que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención pueden ser aislados fácilmente y secuenciados usando procedimientos convencionales (p.e., usando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión, que son luego transfectadosen células hospederas tales como células COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células hospederas recombinantes. El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas [Patente U.S. No. 4,816,567; Morrison et al., supra] por unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido diferente a inmunoglobulina. Tal polipéptido diferente de inmunoglobulina puede ser sustituido para los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o pueden ser sustituidos por los dominios variables de un sitio que combina antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

3. Anticuerpos Monovalentes

También se proveen anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método involucra la expresión recombinante de la cadena ligera de inmunoglobulina y la cadena pesada modificada. La cadena pesada está truncada generalmente en cualquier punto en la región Fc con el fin de evitar el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes están sustituidos con otro residuo de amino ácido o están eliminados para evitar el entrecruzamiento.

Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar los anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, se puede realizar usando técnicas de rutina conocidas en la técnica.

4. Fragmentos de Anticuerpo

También se proveen fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser generados por métodos tradicionales, tales como digestión enzimática, o por técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias, existen ventajas de usar fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos enteros. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite la rápida depuración, y puede conducir a acceso mejorado a tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpo, ver Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, p.e., Morimoto et al., *Journal*

of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-1 17 (1992); y Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora producirse directamente mediante células hospederas recombinantes. Los fragmentos Fab, Fv y ScFv de anticuerpo pueden todos expresarse en y secretarse de E. coli, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser aislados de las bibliotecas de fago de anticuerpo discutidas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden ser recuperados directamente de E. coli y acoplados químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., Bio/Technology 10: 163- 167 (1992)). De acuerdo con otro criterio, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden ser aislados directamente del cultivo de célula hospedera recombinante. Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ con vida media in vivo aumentada que comprenden residuos de epítopo de unión a receptor de rescate se describen en la Pat. U.S. No. 5,869,046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán obvias para el experto profesional. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de anticuerpo de cadena sencilla (scFv). Ver WO 93/16185; Pat. U.S. Nos. 5,571,894; y 5,587,458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; así, estos pueden ser adecuados para la unión no específica reducida durante su uso in vivo use. Las proteínas de fusión a scFv pueden ser construidas para producir la fusión de una proteína efectora en cualquiera del terminal amino o carboxi de un scFv. Ver Antibody Engineering, ed. Borrebaeck. supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", p.e., como se describe en la Pat. U.S. No. 5,641,870, por ejemplo. Tales anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos Humanizados

También se proveen anticuerpos humanizados. Se conocen varios métodos en la técnica para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de amino ácido introducidos en este, de una fuente que es no humana. Estos residuos de amino ácido no humanos son usualmente referidos como residuos "importados", que son típicamente tomados de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239: 1534-1536), sustituyendo secuencias de región hipervariables para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente U.S. No. 4,816,567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales los residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a ser usados en la preparación de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad de acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor es seleccionada contra la biblioteca entera de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana es que la más cercana a la del roedor es entonces aceptada como el marco humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151 :2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Otro método usa un marco particular derivado de la secuencia de concenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. El mismo marco puede usarse para

varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 89:4285; Presta *et al.*, (1993) *J. Immunol.*, 151 :2623.

Generalmente, es deseable además que los anticuerpos sean humanizados con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados son preparados mediante un proceso de análisis de las secuencias base y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensioales de las secuencias base y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares a los expertos en la técnica. Están disponibles programas de computadora que ilustran y muestran las estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidatas. La inspección de estas representaciones gráficas permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionaminto de la secuencia de inmunoglobulina candidata, p.e., el análisis de residuos que incluyen en la habilidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden ser seleccionados y combinados del recipiente y las secuencias importadas de forma que se logra la característica del anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada para el(los) antígeno(s) objetivo(s). En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente involucrados en la influencia de la unión al antígeno.

6. *Anticuerpos Humanos*

También se proveen anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos pueden ser construidos combinando la(s) secuencia(s) de dominio variable clon seleccionada(s) de bibliotecas de despliegue del fago derivadas de humano con secuencia(s) de domino constante humano conocidas descritas

anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden hacer mediante el método de hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51 -63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987): y Boerner et al., *J. Immunol*, 147: 86 (1991).

Ahora es posible producir animales transgénicos (p.e., ratones) que son capaces, a la inmunización, de producir un repertorio total de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógea. Por ejemplo, se ha descrito que la deleción homozigótica del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógena. La trasferencia del arreglo génico de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos al sometimiento con antígeno. Ver, p.e., Jakobovits et al, *Proc. Natl. Acad. Sci* USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann et al, *Year in Immunol*, 7: 33 (1993).

También se puede usar mezclado de gen para derivar anticuerpos humanos de no humanos, p.e,. anticuerpos de roedor, en donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, llamado "imprimación de epítopo", cualquiera de la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de despliegue del fago, descrito aquí, es reemplazado con un repertorio de genes del dominio V humano, creando una población de quimeras scFv o Fab de cadena no humana/humana. La selección con antígeno produce el aislamiento de un scFv or Fab quimérico de cadena no humana/humana en donde la cadena humana

restaura el sitio de unión a antígeno destruido a la remoción de la cadena no humana correspondiente en el clon de despliegue del fago primario, p.e. el epítopo imprime la elección del compañero de cadena humano. Cuando el proceso es repetido con el fin de reemplazar el resto de la cadena no humana, se obtiene un anticuerpo humano (ver PCT WO 93/06213 publicada el 1 de April de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injertos de CDR, está técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

7. Anticuerpos Biespecíficos

También se proveen anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespec+ificos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es para un polipéptido de interés y la otra es para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de un polipéptido de interés. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos a las células, los cuales expresan un polipéptido de interés, tal como un polipéptido de superficie celular. Estos anticuerpos poseen un miebro de unión a TAT226 y un miembro que se une a un agente citotóxico, tal como, p.e., saporina, anti-interferon-α, alcaloide vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radioactivo. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud total o fragmentos de anticuerpo (p.e., anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos

biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificicades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la variedada aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace usualmente mediante pasos de cromatografía de afinidad, es más bien engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se revelan procedimientos similares en WO 93/08829 publicada en Mayo 13 de 1993, y en Traunecker *et al*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con un criterio diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) son fusionados con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADNs que cdifican las fudiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, son insertados en vectores de expresión separados, y con co-transfectados en un organismo hospedero adecuado. Esto provee gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido usado en la construcción proveen los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión, cuando la expresión de alm menos dos cadenas de

polipéptido en relaciones iguales produce altos rendimientos o cuando las relaciones no son de importancia particular.

En una realización de este criterio, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un miembro, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporcionan una segunda especificidad de unión) en el otro miembro. Se encontró que la estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica provee una forma fácil de separación. Este criterio está revelado en WO 94/04690. Para mayores detalles de generación de anticuerpos biespecíficos, ver por ejemplo, Suresh el al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro criterio, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede ser diseñada para maximizar el porcentaje de heterodímeros que son recuperados del cultivo celular recombinante. La interfaz comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de amino ácido pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo son reemplazadas con cadenas laterales más pequeñas (p.e., tirosina o triptofan). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de amino ácido grandes por unas más pequeñas (p.e., alanina o treonina). Esto provee un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre los productos finales indeseados tales como homodímeros. Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado

puede estar acoplado a avidina, el otro para biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, han sido propuestos para marcar células de sistemas inmunes a células no deseadas (Patente US No. 4,676,980), y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/00373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden hacerse usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos en la técnica, y están revelados en la Patente US No. 4,676,980, junto con un número de técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en donde los anticuerpos intactos son clivados proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos son reducidos en la presencia del agente complejando de litiol, arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados son entonces convertidos en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB es luego reconvertido al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y es mezclado con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para a inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de E. coli, los cuales pueden ser químicamente acoplados para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula $F(ab')_2$ de anticuerpo biespecífico totalmente humanizada. Cada fragmento Fab' fue secretado por separado de *E. coli* y sometido al acoplamiento químico dirigido *in vitro* para

formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a las células que sobreexpresan el receptor HER2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumos de seno humanos.

También se han descrito varias técnicas para preparar y asilar fragmentos de anticuerpo biespecíficos a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al., J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun fueron enlazados a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de gen. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se oxidaron de nuevo para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede ser utilizado para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazante, el cual es demasiado corto para permitir el emparejado entre los dos dominios sobre la misma cadena. En consecuencia, los dominios VH y VL de un fragmento son forzados a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de esta manera dos sitios de unión a antígeno. También se ha reportado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Ver Gruber et *al., J. Immunol*, 152:5368 (1994).

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

8. Anticuerpos Multivalentes

También se proveen anticuerpos multivalentes. Un anticuerpo multivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) más rápido que un anticuerpo bivalente mediante una célula que expresa un antígeno al cual se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de la clase IgM), con tres o más sitios de unión a antígeno (p.e., anticuerpos tetravalentes), los cuales pueden ser producidos fácilmente mediante expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptido del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste de) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unióna a antígeno amino-terminales a la región Fc. En ciertas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste de) tres a aproximadamente ocho sitios de unión a antígeno. En tal realización, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste de) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptido (por ejemplo, dos cadenas de polipéptido), en donde la(s) cadena(s) de polipéptido comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido pueden comprender VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc. En donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptido de una región Fc, X1 y X2 representan un amino ácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido puede(n) comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalent presente puede además comprender por lo menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalent presente puede, por ejemplo, comprender aproximadamente dos a aproximadamente ocho

polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligara y opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

9. Anticuerpos de Dominio Sencillo

También se proveen *anticuerpos de dominio sencillo*. Un anticuerpo de dominio sencillo es una cadena de polipéptido sencilla que comprende toda o una porción del dominio variable de cadena pesada o toda o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de dominio sencillo es un anticuerpo de dominio sencillo humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, p.e., Patente U.S. No. 6,248,516 B1). En una realización, un anticuerpo de dominio sencillo consiste de toda o una porción del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

10. Variantes de Anticuerpo

En algunas realizaciones se contemplan modificación(es) de secuencia de amino ácido de los anticuerpos aquí descritos. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Los variantes de secuencia de amino ácido del anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleotido que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis de péptido. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de amino ácido del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llevar al constructor final, siempre y cuando el constructor final posea las características deseadas. Las alteraciones de amino ácido pueden ser introducidas en la secuencia de amino ácido de anticuerpo sujeto al momento de hacer la secuencia.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" descrita por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. Aquí, se identifica un residuo o grupo de residuos objetivo (p.e., residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan por un amino ácido neutro o cargado negativamente (p.e., alanina o polialanina) para afectar la interacción de los amino ácidos con el antígeno. Estas ubicaciones de amino ácido que demuestran la sensibilidad funcional a las sustituciones son entonces redinadas para introducir variantes adicionales o diferentes en, o para los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de amino ácido es predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar el desempeño de una mutación en un sitio dado, el barrido por ala o mutagénesis aleatoria es conducida en el codón o región objetivo y las inmunoglobulinas expresadas son seleccionadas para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de amino ácido incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminal que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de un solo o múltiples residuos de amino ácido. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal. Otros variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima (p.e., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención es alterado para aumentar o disminuir el alcance al cual es anticuerpo es glicosilado. La glicosilación de polipéptidos está típicamente enlazada a N o a O. Enlazada a N se refiere a la unión de una mitad carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y

asparagina-X -treonina, en donde X es cualquier amino ácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la mitad carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-aceilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiamino ácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición o deleción de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de amino ácido de forma que se crea o remueve una o más de las secuencias de tripéptido descritas anteriormente (para los sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también se puede hacer mediante la adición, deleción o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glicosilacipon unidos a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a este puede ser alterado. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carecen de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la Sol de Pat. US No US 2003/0157108 (Presta, L.). Ver también US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisecante (GleNAc) en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo están referenciados en WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* y Patente US No. 6,602,684, Umana *et al.* Anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacérido unido a una región Fc del anticuerpo están reportados en WO 1997/30087, Patel *et al.* Ver también, WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) relacionada con anticuerpos con carbohidrato alterado unido a la región Fc del mismo. Ver también US

2005/0123546 (Umana et al.) sobre moléculas de unión a antígeno con glicosilación modificada.

En ciertas realizaciones, un variante de glicosilación comprende una región Fc, en donde una estructura de carbohidrato unida a la región Fc carece de fucosa. Tales variantes tienen función ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones de amino ácido en ella, lo cual mejora la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos Eu). Ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "desfucosilados" o "deficientes de fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/01 15614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en proteína de fucosilación (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Sol de Pat US No US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares knockout, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO knockout (Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Otro tipo de variante en un variante se sustitución de amino ácido. Estos variantes tienen al menos un residuo de amino ácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de interés para mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 3 anteriore, bajo el encabezado "sustituiciones preferidas". Si tales sustituciones producen un cambio deseable de la actividad

biológica, entonce se pueden introducir más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 3, o como se describió mejor anteriormente con referencia a las clases de amino ácido classes, y los anticuerpos resultantes son seleccionados para las propiedades de unión deseadas.

Un tipo de variante por sustitución involucra sustituir una o más regiones hipervariables de un anticuerpo base (p.e., un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, variante(s) resultante(s) seleccionado(s) para desarrolo adicional tendrá propiedades biológicas modificadas (p.e., mejoradas) con relación al anticuerpo base del cual se generan. Una forma conveniente para generar tales variantes por sustitución involucra la maduración de afinidad usando despliegue del fago. Brevemente, varios sitios de región hipervariable (p.e., 6-7 sitios) son mutados para generar todas las sustituciones posibles de amino ácido en cada sitio. Los anticuerpos así generados son mostrados de partículas de fago filamentosas como fusiones a al menos parte de una proteína de recubrimiento del fago (p.e., el producto de gen III de M13) empacados dentro de cada partícula. Los variantes mostrados en el fago son entonces seleccionados para su actividad biológica (p.e. afinidad de unión). Con el fin de identificar los sitios de región hipervariable candidatos para modificación, se puede realizar la mutagénesis por barrido (p.e., barrido de alanina) para identificar los residuos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser benéfico analizar una estructura de cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y los residuos vecinos son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas conocidas en el arte, incluyendo las aquí elaboradas. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes es sometido a selección usando técnicas conocidas en el arte, incluyendo las aquí

descritas, y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes, para desarrollo adicional.

Las moléculas de ácido nucleic que condifican variantes de secuencia de amino ácido del anticuerpo se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de amino ácido que se encuentran naturalmente) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida al sitio), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de cassette de un variante preparado anteriormente o una verión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de amino ácido en una región Fc de los anticuerpos de la invención, generando de esta forma un variante de región Fc. El variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (p.e., una Región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de amino ácido (p.e., una sustitución) en una o más posiciones de amino ácido incluyendo la de una cisteína bisagra.

De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención pueda comprender una o más alteraciones comparado con el anticuerpo de contraparte del tipo salvaje, p.e., en la región Fc. Estos anticuerpos retendrían, sin embargo, sustancialmente las mismas características requeridas para utilidad terapéutica comparados con su contraparte tipo salvaje. Por ejemplo, se enseña que se pueden hacer ciertas alteraciones en la región Fc que producirían unión a C1q y/o Citotoxicicidad Dependiente de Complemento (CDC) alteradas (p.e., mejoradas o disminuidas), p.e., descrito en WO99/51642. Ver también Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988);

Patente U.S. No. 5,648,260; Patente U.S. No. 5,624,821; y WO94/29351 relacionadas con otros ejemplos de variantes de región Fc. WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcRs. El contenido de estas publicaciones de patente está específicamente incorporado aquí mediante referencia. Ver también, Shields *et al. J. Biol. Chem.* 9(2): 6591 -6604 (2001). Los anticuerpos con vidas medias aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), el cual es responsable de la transferencia de IgGs maternos al feto (Guyer *et al., J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al., J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton *et al.)*. Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en ella, que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Los variantes de polipéptido con secuencias de amino ácido de región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida, se describen en la Patente US No. 6,194,551 B1, WO99/51642. Los contenidos de estas publicaciones de patente están específicamente incorporados aquí mediante referencia. Ver también, Idusogie *et al. J. Immunol.* 164: 4178- 4184 (2000).

En una realización, la invención provee anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfaz de polipéptidos Fc, que comprenden la región Fc, en donde las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y una cavidad en un segundo polipéptido Fc, en donde la protuberancia se puede posicionar en la cavidad con el fin de promover el complejamiento del primer y segundo polipéptidos Fc. Los métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la técnica, p.e., descritos en la Pat. U.S. No. 5,731 ,168.

11. Derivados de Anticuerpo

Los anticuerpos pueden ser modificados adicionalmente para contener mitades no proteináceas adicionales que son conocidas en la técnica y están disponibles fácilmente. Preferiblemente, las mitades adecuadas para derivatización del anticuerpo son los polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietileno glicol (PEG), copolímeros de etilen glicol/propilen glicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maléico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilen glicol, homopolímeros de propropilen glicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (p.e., glicerol), polivinil alcohol, y mezclas de los mismos. El polietilen glicol propionaldehído puede tener ventajas de manufactura debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si más de un polímero está unido, estos pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para derivatización se puede determinar con base en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo a ser mejorado, so el derivado de anticuerpo será usado en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proveen conjugados de un anticuerpo y mitades no proteináceas que pueden ser calentadas selectivamente mediante exposición a radiación. En una realización, la mitad no proteinácea es un nanotubo de carbono (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluyem pero no se limita a las longitudes de onda que no dañan células comunes, pero que calientan la mitad no proteinácea hasta una temperatura a la cual las células próximas al anticuerpo-mitad no proteinácea, son eliminadas.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo puede estar marcado y/o puede estar inmovilizado en un soporte sólido. En una realización adicional, un anticuerpo es un anticuerpo anti-idiotípico.

12. Anticuerpos Heteroconjugados

También se proporcionan anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para marcar células del sistema inmune para células indeseadas [Patente U.S. No. 4,676,980], y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteína sintética, incluyendo aquellos que involucran agentes de entracruzamiento. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden ser construidas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace de tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los revelados, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 4,676,980.

13. Diseño de la Función Efectora

Puede ser deseable modificar un anticuerpo con respecto a la función efectora, con el fin de mejorar, p.e., la efectividad del anticuerpo en el tratamiento de un trastorno microbiano. Por ejemplo, se puede introducir residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de esta forma la formación del enlace de disulfuro entre cadenas en esta región, Los anticuerpos homodiméricos con actividad anti-anti-microbiana mejorada también se pueden preparar usando entrecruzadotes heterobifuncionales. Alternativamente, un anticuerpo puede ser diseñado para tener regiones Fc duales y puede, de esta forma tener actividad mejorada.

14. Vectores, Células Hospederas, y Métodos Recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo, en una realización, el ácido nucleico que lo codifica es aislado e insertado en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo es fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales (p.e., usando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula hospedera a se usada. Generalmente, las células hospederas son de origen procariótico o eucariótico (generalmente mamíferas). Se apreciará que se pueden usar regiones constantes de cualquier isotipo para este propósito, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y tales regiones constantes pueden ser obtenidas de cualquier especie humana o animal.

a) Generación de anticuerpos usando células hospederas procarióticas:

(1) Construcción del Vector

Las secuencias de polinucleótido que codifican los componentes de polipéptido de un anticuerpo se pueden obtener usando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias de polinucleótido deseadas pueden ser aisladas y secuenciadas de células que producen anticuerpo tales como células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos pueden ser sintetizados usando sintetizador de nucleótido o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos son insertadas en un vector recombinante capaz de replicar y expresar los polinucleótidos heterólogos en hospederos procerióticos. Se pueden usar para el propósito de

la presente invención muchos vectores que están disponibles en la técnica y son conocidos. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a ser insertados en el vector y la célula hospedera particular a ser transformada con el vector. Cada vector contiene varios componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedera particular en la cual reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión de ribosoma (RBS), una secuencia de señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de transcripción.

En general, se pueden usar vectores plásmidos que contienen replicón y secuencias de que son derivadas de especies compatibles con la célula hospedera en conexión con estos hospederos. El vector porta comúnmente un sitio de replicación, así como secuencias de marcado que son capaces de proveer selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, E. coli es típicamente transformada usando pBR322, un plásmido derivado de una especie E. coli species. pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a la ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y así proveen medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos pueden contener también, o ser modificados para contener promotores que pueden ser usados por el organismo microbiano para expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter et al., Patente U.S. No. 5,648,237.

Adicionalmente, se pueden usar vectores de fago que contienen replicón y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo hospedero como vectores transformantes en conexión con estos hospederos. Por ejemplo,

el bacteriófago tal como λGEM.TM.-11 se puede utilizar para hacer un vector recombinante que se puede usar para transformar células hospederas susceptibles tales como E. coli LE392.

Un vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes de polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada aguas arriba (5') a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procarióticos típicamente caen en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición del cultivo, p.e., la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

Se conoce un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células hospederas potenciales. El promoter seleccionado puede estar operativamente enlazado al ADN de cistrón que codifica la cadena ligera y pesada removiendo el promotor del ADN fuente mediante digestión de enzima de restricción e insertando la secuencia de promotor aislada en el vector de la invención. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos se pueden usar para la amplificación directa y/o expresión de los genes objetivo. En algunas realizaciones se utilizan promotores heterólogos porque generalmente permiten mayor transcripción y mayores rendimientos de gen objetivo expresado comparados con el promotor de polipéptido objetivo nativo

Promotores adecuados para uso con hospederos procarióticos incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotor de β-galactamasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac o el trc. Sin embargo, también son adecuados otros promotores

que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos). Sus secuencias de nucleotido han sido publicadas, permitiendo así que un experto las lige operablemente a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada objetivo (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269) usando enlazantes o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción adecuado.

En una realización de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia de señal de secreción que dirige la traslocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de polipéptido objetivo que es insertado en el vector. La secuencia de señal seleccionada para el propósito de esta invención debe ser una que es reconocida y procesada (p.e., clivada por una peptidasa de señal) por la célula hospedera. Para células hospederas procarióticas que no reconocen y procesan las secuencias de señal nativas a los polipéptidos heterólogos, la secuencia de señal es sustituida por una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp, olíderes de enterotoxina II (STII) estable al calor, LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias de señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señal STII o variantes de las mismas.

En otra realización, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención puede encontrarse en el citoplasma de la célula hospedera, y por lo tanto no requiere la presencia de las secuencias de señal de secreción dentro de cada cistrón. En ese aspecto, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina son expresadas, dobladas y ensambladas para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas hospederas (p.e., las cepas trxB de E. coli) proveen condiciones del citoplasma que son

favorables para la formación del enlace de disulfuro, permitiendo así el plegado y ensamble apropiado de las subunidades de proteína expresadas. Proba y Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Los anticuerpos de la invención también pueden ser producidos usando un sistema de expresión en el cual la relación cuantitativa de los componentes de polipéptido expresados pueden se modulada con el fin de maximizar el rendimiento de anticuerpos de la invención secretados y ensamblados apropiadamente. Tal modulación se realiza al menos en parte modulando simultáneamente fuerzas transduccionales para los componentes del polipéptido.

Una técnica para modular la fuerza transduccional se revela en Simmons et al., Pat. U.S. No. 5,840,523. utiliza variantes de la región de iniciación trasnduccional (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, se puede crear una serie de variantes de amino ácido o de secuencia de ácido nucleico con un rango de fuerzas transduccionales, proporcionando un medio conveniente para ajustar este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Los variantes de TIR pueden ser generados mediante técnicas de mutagénesis convencionales que producen cambios de codón que pueden alterar la secuencia de amino ácido. En ciertas realizaciones, los cambios en la secuencia de nucleotido son silenciosos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o espaciamiento de secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia de señal. Un método para generar secuencias de señal mutantes es la generación de un "banco de codón" en el inicio de una secuencia de codificación que no cambia la secuencia de amino ácido de la secuencia de señal (p.e., los cambios son silenciosos). Esto se puede realizar cambiando la tercera posición de nucleotido de cada codón; adicionalmente, algunos amino ácidos, tales como leucina, serina, y arginina, tienen múltiples primera y segunda posiciones

que pueden agregar complejidad para hacer el banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura et al. (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151 -158.

En una realización, se genera un set de vectores con un rango de fuerzas de TIR para cada cistrón en estos. Este conjunto limitado provee una comparación de niveles de expresión de cada cadena así como el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo varias combinaciones de fuerza de TIR. Las fuerzas de TIR pueden ser determinadas cuantificando el nivel de expresión de un gen reportero descrito en detalle en Simmons et al., Pat. U.S. No. 5,840,523. Con base en la comparación de fuerza transduccional, las TIRs individuales deseadas son seleccionadas para ser combinadas en los constructos de vector de expresión de la invención.

Las células hospederas procarióticas adecuadas para expresar los anticuerpos de la invención incluyen Archaebacteria y Eubacteria, tales como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Ejemplos de bacterias útiles incluyen Escherichia (p.e., E. coli), Bacilli (p.e., B. subtilis), Enterobacteria, especies pseudomonas (p.e., P. aeruginosa), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla, o Paracoccus. En una realización se usan células gram-negativas. En una realización, se usan células de E. coli como hospederos para la invención. Ejemplos de cepas E. coli incluyen la cepa W311 10 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D. C: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; Depósito ATCC No. 27,325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente U.S. No. 5,639,635). También son adecuadas otras cepas y derivados de las mismas, tales como E. coli 294 (ATCC 31,446), E. coli B, E. coliλ 1776 (ATCC 31,537) y E. coli RV308 (ATCC 31,608). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Los métodos para construir

derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente, que tienen genotipos definidos, son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Generalmente es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, las especies E. coli, Serratia, o Salmonella pueden ser usadas convenientemente como el hospedero cuando se usan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC 177, o pKN410 para suministrar el replicón. Típicamente, la célula hospedera debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inhibidores de proteasa adicionales pueden ser incorporados en forma deseada en el cultivo celular.

(2) Producción de Anticuerpo

Las células hospederas son transformadas con los vectores de expresión descritos anteriormente y cultivadas en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en el hospedero procariótico de forma que el ADN sea replicable, ya sea como un elemento extracromosómico o mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedera usada, la transformación se hace usando técnicas estándar apropiadas para tales células. El tratamiento de calcio empleando cloruro de calcio se usa generalmente para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro método para transformación emplea polietileno glicol/DMSO. Aún otra técnica que se usa es la electroporación.

Las células procarióticas usadas para producir los polipéptidos de la invención son cultivadas en medios conocidos en la técnica y adecuados para cultivar las células hospederas seleccionadas. Ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de luria (EB) más complementos de nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, los medios también contienen un agente de selección, elegido con base en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procarióticas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se agrega ampicilina al medio para crecimiento de células que expresan el gen resistente a la ampicilina.

También se puede incluir cualquier complemento necesario además de carbono, nitrógeno, y fuentes de fosfato inorgánicas a concentraciones apropiadas introducidas solas o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una suente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste de glutationa, cisteína, cistainina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitol.

Las células hospederas procarióticas son cultivadas a temperaturas adecuadas. En ciertas realizaciones, para el crecimiento de E. coli, las temperaturas de crecimiento varían de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C; de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37°C; o aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedero. En ciertas realizaciones, para E. coli, el pH es de aproximadamente 6.8 a aproximadamente 7.4. o aproximadamente 7.0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de proteína es inducida bajo condiciones adecuadas para la activación del promotor. En una realización de la invención, los

promotores PhoA se usan para controlar la transcripción de los polipéptidos. En consecuencia, las células hospederas transformadas son cultivadas en un medio limintante de fosfato para la inducción. En ciertas realizaciones, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P. (ver, p.e., Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263: 133-147). Se puede usar una variedad de otros inductores, de acuerdo con el constructo de vector empleado, según sea conocido en la técnica.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención son secretados en, y recuperados del periplasma de las células hospederas. La recuperación de proteína involucra típicamente alteración del microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez las células son alteradas, los desechos celulares o las células enteras pueden ser removidos mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden ser purificadas adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía de resina de afinidad. Alternativamente, las proteínas pueden ser transportadas en el medio de cultivo y aisladas allí. Las células pueden ser removidas del cultivo y el sobrenadante del cultivo ser filtrado y concentrado para purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden ser aislados e identificados usando métodos conocidos comúnmente tales como electroforesis de gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de inmunotransferencia Western.

En una realización de la invención, la producción de anticuerpo se conduce en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Varios procedimientos de fermentación alimentados por lotes, a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen capacidad de por lo menos 1000 litros, y en ciertas realizaciones, aproximadamente 1,000 a 100,000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores agitadores para distribuir el oxígeno y los

nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteúna se inicia típicamente después que las células han sido cultivadas bajo condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, p.e., un OD550 de aproximadamente 180-220, etapa en la cual las células están en la hase estacionaria temprana. Se puede usar una variedad de inductores, de acuerdo con el constructor de vector empleado, según se conoce en la técnica y se describe anteriormente. Las células pueden ser cultivadas por períodos más cortos antes de la inducción. Las células son usualmente inducidas por aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede usar un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, se pueden modificar varias condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamble y plegado apropiado de los polipéptidos de anticuerpo secretados, se pueden usar vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad chaperona) para co-transformar las células hospederas procarióticas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegado apropiado y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en las células hospederas bacterianas. Chen et al. (1999) *J Biol. Chem.* 274: 19601-19605; Georgiou et al., Patente U.S. No. 6,083,715; Georgiou et al., Patente U.S. No. 6,027,888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17100-

17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J Biol. Chem.* 275: 17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), se pueden usar ciertas cepas hospederas deficientes de enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células hospederas pueden ser modificadas para efectuar mutación(es) genética(s) en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas de E.coli deficientes de proteasa están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), *supra*; Georgiou et al., Patente U.S. No. 5,264,365; Georgiou et al., Patente U.S. No. 5,508,192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En una realización, se usan las cepas de E. coli deficientes de enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas como células hospederas en el sistema de expresión de la invención.

(3) Purificación de Anticuerpo

En una realización, un anticuerpo aquí producido es purificado adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos u usos adicionales. Se pueden emplear métodos de purificación de proteína estándar conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento o inmunoafinidad o columnas de intercambio iónicos, proceipitación con etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía sobre sílice o sobre resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatoenfoque, SDS-

PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración de gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En una realización, se usa Proteína A immovilizada sobre una fase sólida para purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de la invención. La Proteína A es una proteína de pared celular de 41 kD de *Staphilococcus aureas* que se une con alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark *et al* (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. La fase sólida a la cual la Proteína A es inmovilizada puede ser una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, o una columna de vidrio poroso controlado o una columna de ácido silicílico, la columna está recubierta con un reactivo, tal como glicerol, para evitar posiblemente adherencia no específica de contaminantes.

Como el primer paso de purificación, se puede aplicar una preparación derivada del cultivo celular descrito anteriormente sobre la Proteína A inmovilizada en fase sólida, para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la Proteína A. La fase sólida sería entonces lavada para remover contaminantes no específicamente unidos a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés es recuperado de la fase sólida mediante elución.

b) Generación de anticuerpos usando células hospederas eucarióticas:

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

(1) Componente de Secuencia de Señal

Un vector para uso en una célula hospedera eucariótica también puede contener una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de clivado específico en el N-terminal de la proteína madura o el polipéptido de interés. La secuencia de señal heteróloga seleccionada puede ser una que es reconocida y procesada (p.e., clivada por una peptidasa de señal) por la célula hospedera. En la expresión de célula mamífera están disponibles las secuencias de señal mamíferas, así como los líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simplex. El ADN para tal región precursora está ligado en marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(2) Origen de replicación

Generalmente no se requiere de un origen de componente de replicación para los vectores de expresión mamífera. Por ejemplo, el origen SV40 puede usarse típicamente porque contiene el promotor inicial.

(3) Selección del componente génico

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también llamado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p.e., ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) deficiencias auxotrópicas de complemento, cuando sea relevante, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en el medio complejo.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedera. Estas células que con transformadas exitosamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere la resistencia al fármaco, y por ende, sobreviven al régimen de selección.

Ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcados seleccionables adecuados para células mamíferas son aquellos que permiten la identificación de células competentes para tomar el ácido nucleico del anticuerpo, tales como DFIFR, timidina quinasa, metalotioneina-I y -II, preferiblemente genes de la metalotioneina de primate, adenosin desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células transformadas con el gen de selección de DHFR son primero identificadas cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un agonista competitivo de DHFR. En algunas realizaciones, una célula hospedera adecuada que se usa cuando se emplea DHFR tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente de actividad de DHFR (p.e., ATCC CRL-9096).

Alternativamente, las células hospederas (particularmente hospederos tipo salvaje que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, la proteína DHFR tipo salvaje, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante crecimiento de la célula en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como antibiótico aminoglicósido, p.e., kanamicina, neomicina, o G418. Ver la Patente U.S. No. 4,965,199.

(4) Componente Promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen usualmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedero y está operablemente enlazado al ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p.e., un anticuerpo). Las secuencias promotoras son conocidas para eucariotas. Por ejemplo, virtualmente todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT localizada a aproximadamente 25 a 30 bases aguas arriba del sition en donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases aguas arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en donde N puede ser cualquier nucleotido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos está una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia de codificación. En ciertas realizaciones, cualquiera de estas secuencias puede ser insertada convenientemente en los vectores de expresión eucarióticos.

La transcripción de los vectores en células hospederas mamíferas es controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis-B y Vuris 40 simio (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, p.e., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque al calor, siempre y cuando tales promotores sean compatibles con los sistemas de células hospederas.

Los promotores iniciales y tardíos del virus SV40 son obtenidos de manera conveniente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen viral de replicación de SV40. El promotor inicial inmediato del citomegalovirus humano se obtiene de manera conveniente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospederos mamíferos usando el virus de papiloma bovino como un vector se revela en la Patente U.S. No. 4,419,446. Una modificación de este sistema se describe en

la Patente U.S. No. 4.601 ,978. Ver también Reyes el al., *Nature* 297:598-601 (1982), que describe la expresión de ADNc de β-interferon humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simplex. Alternativamente, se puede usar la repetición terminal larga del Virus de Sarcoma de Rous como el promotor.

(5) Componente de elemento Potenciador

La transcripción del ADN que codifica un anticuerpo de esta invención por eucariotas mayores es usualmente aumentada insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína, e insulina). Típicamente, sin embargo, se una un potenciador de un virus de célula eucariótica. Ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Ver también Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) que describe elementos potenciadores para la activación de promotores eucarióticos. El potenciador puede ser cortado y empalmado en el vector en una 5' o 3' a la secuencia de codificación del polipéptido de anticuerpo, pero está generalmente localizado en un sitio 5' del promotor.

(6) Componente de terminación de Transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospederas eucarióticas pueden también contener secuencias necesarias para la terminación de transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están disponibles comúnmente en las regiones 5' y, ocasionalmente 3', no traducidas de ADNs o ADNc eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleotido trasncritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de

transcripción útil es la región de poliadenilación de hormona de crecimiento bovino. Ver WO94/11026 y el vector de expresión revelado allí.

P) Selección y transformación de células hospederas

Las células hospederas adecuadas para clonación o expresión de ADN en los presentes vectores incluyen células eucarióticas mayores descritas aquí, incluyendo células hospederas vertebradas. La propagación de células vertebradas en cultivo (cultivo tisular) se ha vuelto un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas celulares hospederas mamíferas son la línea CV1 de rat+on de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embriónico humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al., J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino /-DHFR (CHO, Urlaub *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de bufalo rata (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al., Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5: células FS4 ells; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospederas son transformadas con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpo y son cultivadas en medios de nutriente convencionales modificados según sea

apropiado para inducir promotores, seleccionar transfromantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(8) Cultivo de las células hospederas

Las células hospederas usadas para producir un anticuerpo de esta invención pueden ser cultivadas en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MUM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospederas. Adicionalmente, se puede usar cualquiera de los medios descritos en Ham *et al., Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), Patentes U.S. Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente U.S. Re. 30,985 como medio de cultivo para las células hospederas. Cualquiera de estos medios puede ser complementado según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), amortiguadores (tal como HEPES), nucleotidos (tales como adenosin y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICINA™), elementos trazadores (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presentes a concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Ta puede incluir cualquier otro complemento a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones del cultivo, tales como temperatura, pHI, y similares, son las usadas previamente con la célula hospedera seleccionada para expresión, y serán obvias para aquel de conocimiento común.

(9) Purificación de anticuerpo

Al usar técnicas recombinantes, el anticuerpo puede ser producido intracelularmente, o ser directamente secretado al medio. Si el anticuerpo es producido intracelularmente, como un primer paso, el desecho particulado, ya sea células hospederas o fragmentos lisados, pueden ser removidos, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión pueden ser primero concentrados usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF encualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes extraños.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede ser purificada usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una técnica conveniente. La conveniencia de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La Proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que están basados en cadenas pesadas γ1, γ2, o γ4 humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Methods* 62: 1-13 (1983)). La Proteína G está recomendada para todos los isotipos de ratón y para γ3 humana (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la cual el ligando de afinidad está unido puede ser agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio posoto controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos de los que pueden lograrse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para purificación de proteína, tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con

etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina, cromatografía en SEPHAROSE™ sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a ser recuperado.

Después de cualquier paso preliminar de purificación, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede ser sometida a purificación adicional, por ejemplo, mediante cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo usando un amortiguador de elución a un pH entre aproximadamente 2.5-4.5, realizada preferiblemente a concentraciones de sal bajas (p.e., de aproximadamente 0-0.25M de sal). En general, varias metodologías para preparar anticuerpos para uso en investigación, pruebas y uso clínico están bien establecidas en la técnica, consistentes con las metodologías descritas anteriormente y/o consideradas apropiadas por el experto en la técnica para un anticuerpo de interés particular.

C. Agonistas y Antagonistas

Se proveen agonistas y antagonistas de un AMP de la presente invencións. Tales moduladores de AMP están abarcados en la presente invención y son útiles para el tratamiento de un trastorno microbiano proporcionado aquí.

En una realización, un agonista o antagonista de un AMP de la presente invención es un anticuerpo, p.e., y anticuerpo de IL-22 o un anticuerpo anti-IL-22R. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-IL-22 es un anticuerpo agonístico que promueve la interacción de IL-22 con IL-22R. En otra realización, un anticuerpo anti-IL-22 es un anticuerpo antagonístico que bloquea totalmente o parcialmente la interacción de IL-22 con IL-22R. En

ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-IL-22R se une al dominio de unión del ligando extracelular de un IL-22R. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22R se puede unir al dominio de unión de ligando extracelular de IL-22R humana, que se encuentra en la SEQ ID NO:3 de aproximadamente los amino ácidos 18-228.

En una realización particular, un agonista de IL-22 es un anticuerpo que se une a IL-22BP y bloquea o inhibe la unión de IL-22BP a IL-22, y de esta forma induce o aumenta una actividad de IL-22 (p.e., unión a IL-22R).

En otra realización, un agonista o antagonista de un AMP de la presente invención es un oligopéptido que se une al AMP. En una realización, un oligopéptido se une al dominio de unión de ligando extracelular de IL-22R. Los oligopéptidos pueden ser sintetizados químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptido conocida o se pueden preparar y purificar usando tecnología recombinante. Tales oligopéptidos son usualmente de aproximadamente 5 amino ácidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 , 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 , 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 amino ácidos de longitud. Tales oligopéptidos pueden ser identificados sin experimentación excesiva usando técnicas bien conocidas. En este aspecto, se nota que las técnicas para seleccionar bibliotecas de oligopéptido para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido objetivo, son bien conocidas en la técnica (ver, p.e., Patentes U.S. Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; Publicaciones PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 82: 178-182 (1985); Geysen et al., en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J Immunol, 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H. B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A. S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

En ya otra realización, un agonista o antagoista de un AMP de la presente invención es una molécula orgánica que se une al AMP, diferente de un oligopéptido o anticuerpo descrito aquí. Una molécula orgánica puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña. En una realización, una molécula orgánica se une al dominio extracelular de un IL-22R. Una molécula orgánica que se une a un AMP de la presente invención puede ser identificada y sintetizada químicamente usando metodología conocida (ver, p.e., Publicaciones PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Tales moléculas orgánicas son usualmente de menos de aproximadamente 2000 daltons de tamaño, alternativamente de menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 daltons de tamaño, en donde tales moléculas orgánicas que son capaces de unirse a un AMP de la presente invención, pueden ser identificadas sin experimentación excesiva usando técnicas bien conocidas. En este aspecto, se nota que las técnicas para seleccionar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse a un polipéptido objetivo son bien conocidas en el arte (ver, p.e., Publicaciones PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585).

En una realización particular, un agonista de IL-22 es una molécula orgánica que se une a IL-22BP y bloquea o inhibe la unión de IL-22BP a IL-22, y de esta forma induce o aumenta una actividad de IL-22 (p.e., unión a IL-22R).

En una realización particular, un antagonista de IL-22 es un receptor de IL-22 soluble, p.e., una forma de IL-22R que no está ligada a membrana. Tales formas solubles de IL-22R pueden competir con IL-22R ligado a membrana para la unión a IL-22. En ciertas realizaciones, una forma soluble de IL-22R puede comprender toda o una porción de unión a ligando de un dominio extracelular de IL-22R, p.e., toda o una porción de unión a ligando de un polipéptido que comprende los amino ácidos 18-228 de la SEQ ID NO:3. En ciertas realizaciones, una forma soluble de IL-22R carece de un dominio transmembrana. Por ejemplo, una forma soluble de IL-22R humana puede carecer de toda o una porción sustancial del dominio transmembrana de aproximadamente los amino ácidos 229- 251 de la SEQ ID NO:3.

Se ha reportado un receptor soluble de IL-22 que se encuentra naturalmente. *Ver* Dumoutier L. et al., "Cloning y characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22", J. Immunol. 166:7090-7095 (2001); y Xu W. et al., "A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:9511-9516 (2001). Ese receptor es variadamente designado "IL-22BP" o "IL-22RA2" en la técnica. La secuencia de una IL-22BP humana se muestra en la Figura 4. El término "IL-22BP" o "proteína de unión a IL-22 " como se usa aquí, se refiere a cualquier IL-22BP nativa de cualquier fuente vertebrada, incluyendo mamíferos tales como primates (p.e., humanos y monos) y roedores (p.e., ratones y ratas), a menos que se indique de otra forma.

En ya otra realización, un antagonista de IL-22 es un ácido nucleico en contrasentido que disminuye la expresión de la IL-22 o gen de IL-22R (p.e., que disminuye la transcripción de la IL-22 o gen de IL-22R y/o traducción de IL-22 o ARNm de IL-22R). En ciertas realizaciones, un ácido nucleico en contrasentido se une a un ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica IL-22 o IL-22R. En ciertas

realizaciones, un ácido nucleico en contrasentido es un oligonucleótido de aproximadamente 10-30 nucleotidos de longitud (incluyendo todos los puntos entre aquellos puntos finales). En ciertas realizaciones, un oligonucleótido en contrasentido comprende estructuras de azúcar-fosfodiéster modificadas (u otros enlaces de azúcar, incluyendo enlaces de fosforotioato y enlaces drescritos en WO 91/06629), en donde tales estructuras de azúcar-fosfodiéster odificadas son resistentes a nucleadas endógenas. En una realización, un ácido nucleico en contrasentido es un oligodesoxiribonucleotido, el cual produce la degradación y/o transcripción o traducción reducida del ARNm que codifica IL-22 o IL-22R. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico en contrasentido es un ARN que reduce la expresión de un ácido nucleico objetivo por "interferencia de ARN" ("ARNi"). Para revisión de ARNi, ver, p.e., Novina et al. (2004) Nature 430:161- 164. Tales ARNs son derivados de, por ejemplo, ARNs de interferencia cortos (ARNsi) y microARNs. Los ARNsi, p.e., pueden ser sintetizados como oligoribonucleotidos bicatenarios de aproximadamente 18-26 nucleotidos de longitud. *Id.*

En ya otra realización se proveen agonistas de IL-22. Agonistas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, IL-22 o IL-22R nativos; fragmentos, variantes, o formas modificadas de IL-22 o IL-22R que retienen al menos una actividad del polipéptido nativo; agentes que son capaces de unirse a, y activar IL-22R; y agentes que inducen la sobreexpresión de IL-22 o IL-22R o ácidos nucleicos que codifican IL-22 o IL-22R.

D. Formulaciones Farmacéuticas

La invención provee formulaciones farmacéuticas. En una realización, una formulación farmacéutica comprende 1) un agente activo, p.e., cualquiera de los polipéptidos, anticuerpos, agonistas, o antagonistas descrito anteriormente; y 2) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-63303

54. **TÍTULO** _____ 2/2

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** _____

DOMICILIO _____

74. **APODERADO** _____

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____

(FORMA P-10)

2/2

Organizacion y
Digitalizacion GSA Ltda

PATENTE DE INVENCIÓN

10-63303

2/2 63303.

realización adicional, una formulación farmacéutica comprende adempas al menos un agente terapéutico adicional.

Las formulaciones farmacéuticas son preparadas pata almacenamiento mezclando un agente que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículo, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los recipientes a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; preservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenoll, butil o bencil alcohol; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; amino ácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contrapones formadores de sal tal como sodio; complejantes de metal (p.e., complejantes de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietileno glicol (PEG).

También se pueden usar lipofecciones o liposomas para liberar un agente en una célula. Cuando el agente es un fragmento de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente a la proteína. Por ejemplo, con base en las secuencias de región variable de un anticuerpo, las moléculas de péptido pueden ser designadas para retener la

capacidad de unierse a la secuencia de proteína objetivo. Tales péptidos pueden ser sintetizados químicamente y/o producidos mediante tecnología de ADN recombinante (ver, p.e., Marasco *et al, Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90, 7889-7893 [1993]). Los anticuerpos aquí revelados también pueden ser formulados como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen un anticuerpo son preparados mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al,* Proc. Natl Acad. Sci. USA. 77: 4030 (1980); y Pat. U.S. Nos. 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se revelan en la Patente U.S. No. 5,013,556. Los liposomas particularmente útiles pueden ser generados mediante el método de evaporación de fase reversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas son extruidos a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' de un anticuerpo de la presente invención pueden estar conjugados a liposomas, como se describe en Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterápico (tal como doxorubicina) está opcionalmente contenido dentro del liposoma. Ver Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

Un agente también puede estar atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocapsulás) o en macroemulsiones. Tales técnicas están reveladas en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden hacer preparaciones de liberación sostenida de un agente. Ejemplos adeciados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el agent, cuyas matrices están en la forma de artículos formados, p.e., películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente U.S. No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, etileno-vinila acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y leuprolida acetato), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como etileno-vinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas por más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo por un período largo, estos pueden ser desnaturalizados o agregados como un resultado de la exposición a la humedad a 37°C, produciendo una pérdida de actividad biológica y posibles cambios de inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas.

Una formulación farmacéutica presente puede contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está siendo tratada. Por ejemplo, en una realización, una formulación farmacéutica que contiene más de un compuesto activo comprende 1) al menos un agonista

de IL-22, p.e., un anticuerpo que se une a IL-22 y/o un anticuerpo que se une a IL-22R; y 2) al menos un anticuerpo que se une a IL-6 o IL-23 (en donde se puede seleccionar cualquier número de los anticuerpos listados en 2) en cualquier combinación). En otra realización, una formulación farmacéutica contiene dos o más compuestos activos que tienen actividades complementarias.

E. Métodos de Tratamiento

La presente invención provee además métodos de tratamiento de un trastorno microbiano. En otra realización, la presente invención provee un método de tratamiento de un trastorno microbiano, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de composición farmacéutica que comprende un AMP o modulador del AMP, en donde el AMP se selecciona de un grupo que consiste de: LT, IL-6, IL-18, IL-22, IL-23, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV y secuencia relacionada con Reg (RS). En una realización, el trastorno es diarrea causada por EHEC o EPEC, Enfermedad Inflamatoria del Intestino (IBD) o, más particularmente, Colitis Ulcerativa (UC) y Enfermedad de Crohn (CD).

En una realización, la presente invención provee un método de tratamiento de una infección por un patógeno microbiano (p.e., una bacteria o virus), en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de composición farmacéutica que comprende un AMP o modulador del AMP, en donde el AMP se selecciona de un grupo que consiste de: LT, IL-6, IL-18, IL-22, IL-23, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV y secuencia relacionada con Reg (RS).

En otra realización, la presente invención provee un método para modular la actividad de un AMP en células de un sujeto infectado con un

patógeno microbiano (p.e., una bacteria o virus), que comprende contactar las células con un AMP o modulador del AMP, en donde el AMP se selecciona da un grupo que consiste de: LT, IL-6, IL-18, IL-22, IL-23, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III (p.e., REG IIIβ o REGIIIγ), REG IV, y secuencia relacionada con Reg (RS).

En otra realización, la presente invención provee un método de tratamiento de un trastorno microbiano en un sujeto, que comprende contactar las células del sujeto con una molécula de ácido nucleico (p.e., una molécula de ADN o ARN) que codifica un AMP o modulador del AMP, en donde el AMP se selecciona de un grupo que consiste de: LT, IL-6, IL-18, IL-22, IL-23, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV y secuencia relacionada con Reg (RS). En una realización, el trastorno es diarrea causada por EHEC o EPEC, Enfermedad Inflamatoria del Intestino (IBD) o, más particularmente. Colitis Ulcerativa (UC) o Enfermedad de Crohn (CD).

En otra realización, la presente invención provee un método para modular la actividad de un AMP en células de un sujeto infectado con un patógeno microbiano (p.e., una bacteria o virus), que comprende contactar las células con una molécula de ácido nucleico (p.e., una molécula de ADN o ARN) que codifica un AMP o modulador del AMP, en donde el AMP se selecciona de un grupo que consiste de: LT, IL-6, IL-18, IL-22, IL-23, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III (p.e., REG IIIβ o REGIIIγ), REG IV, y secuencia relacionada con Reg (RS).

Ejemplos de un patógeno microbiano incluyen, pero no se limitan a, una bacteria o virus. En una realización, el patógeno microbiano es una bacteria p.e., una bacteria gram-negativa o gram-positiva. En una realización particular, la bacteria es una bacteria gram-negativa. En otra realización, la bacteria es una bacteria de unión o borradura (A/E) y, más particularmente, una

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) o E. Coli enteropatogénica (EPEC). En una realización, la bacteria es E. coli enteropatogénica (EHEC) es E. coli 0157:H7 o E. coli 055:H7.

Los métodos teraéuticos de la presente invención comprenden una o más composiciones o formulaciones farmacéuticas de la presente invención. Tales métodos incluyen métodos terapéuticos in vitro, ex vivo, e in vivo, a menos que se indique de otra forma.

En varias realizaciones, la presente invención provee métodos para modular una respuesta inmune antimicrobiana estimulando o inhibiendo una ruta de señalización mediada por AMP y/o función de célula Th_{IL-17}. Tales métodos son útiles para el tratamiento de trastornos microbianos. Por ejemplo, en una realización, la presente invención provee un método para mejorar una respuesta inmune anti-microbiana estimulando una ruta de señalización mediada por AMP, p.e., ruta de señalización mediada por IL-22 y/o IL-23. En otra realización, la presente invención provee métodos para modular una respuesta inmune anti-microbiana estimulando o inhibiendo una ruta de señalización mediada por citoquina. Por ejemplo, en una realización, la presente invención provee métodos para mejorar una resuesta inmune antimicrobiana estimulando una ruta de señalización mediada por citoquina, p.e., una ruta de señalización de IL-22 y/o IL-23. Más aún, la presente invención provee métodos para modular una respuesta inmune anti-microbiana estimulando o inhibiendo una función de célula Th_{IL-17}.

En una realización, la presente invención provee un método para estimular una ruta de señalización mediada por AMP en un sistema biológico, el método comprende proveer un agonista de AMP al sistema biológico. Ejemplos de tal sistema biológico incluyen, pero no se limitan a, células mamíferas en un sistema de cultivo celular in vitro o en un organismo in vivo. En otra realización,

la presente invención porvee un método para inhibir una ruta de señalización mediada por AMP en un sistema biológico, el método comprende proveer un antagonista de AMP al sistema biológico.

En una realización particular, la presente invención provee un método para mejorar una respuesta inmune antimicrobiana en un sistema biológico estimulando una ruta de señalización mediada por IL-23 y/o IL-22 en un sistema biológico, el método comprende proveer un agonista de IL-22 o IL-22 al sistema biológico. En una realización, un agonista de IL-22 es IL-22. En otra realización, el agonista de IL-22 es un anticuerpo que se une a IL-22.

En otra realización, se provee un método para inhibir una ruta de señalización mediada por IL-23 en un sistema biológico, el método comprende proveer un antagonista de IL-22 al sistema biológico. En una realización, el antagonista de IL-22 es un anticuerpo, p.e., un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante y/o un anticuerpo anti-IL-22R neutralizante.

En otra realización, la presente invención provee un método para estimular una función de célula Th_{IL-17}, el método comprende exponer una célula Th_{IL-17} a un agonista de un AMP que media la ruta de señalización mediada por IL-23 (p.e., IL-23, IL-6, o IL-22). Tales métodos son útiles para el tratamiento de un trastorno microbiano. En una realización, un agonista de IL-22 es IL-22. En otra realización, el agonista de IL- 22 es un anticuerpo que se une a IL-22.

En otra realización, se provee un método para inhibir una función de célula Th_{IL-17}, el método comprende exponer una célula Th_{IL-17} a un antagonista de un AMP que media la ruta de señalización mediada por IL-23 (p.e., IL-23, IL-6, o IL-22). En una realización, el antagonista es un anticuerpo anti-IL-22 anticuerpo, p.e., un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante.

Funciones de célula Th_{IL-17} ejemplares incluyen, pero no se limitan a, estimulación de inmunidad mediada por célula (hipersensibilidad del tipo retardado); reclutamiento de células inmunes innatas, tales como células mieloides (p.e., monocitos o neutrófilos) a sitios de inflamación; y estimulación de infiltración de célula inflamatoria en los tejidos. En una realización, una función de célula Th^{IL-17} es mediada por IL-23 y/o IL- 22.

Las composiciones de la presente invención son administradas a un mamífero, preferiblemente un humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, mediante rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerobroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación (intranasal, intrapulmonar). Se prefiere la administración intravenosa o inhalada de los polipéptidos y anticuerpos.

Para el tratamiento o reducción de la severidad de un trastorno microbiano, la dosis apropiada de una composición de la invención dependerá del tipo de desorden a ser tratado, definido anteriormente, la severidad y curso del trastorno, si el agente es administrado para propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al compuesto, y la discreción del médico tratante. El compuesto es administrado convenientemente al paciente una vez o durante una serie de tratamientos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y severidad de un trastorno, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (p.e., 0.1-20 mg/kg) de un polipéptido o anticuerpo es una dosis candidata inicial para administración a un paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas por varios días o más,

dependiendo de la condición, el tratamiento es sostenido hasta que ocurra una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros régimenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia es fácilmente monitoreado por técnicas y ensayos convencionales.

F. Métodos de Diagnóstico y Métodos de Detección

En una realización, la presente invención provee un método para detectar la presencia de un AMP en una muesta biológica, que comprende contactar la muestra biológica con un anticuerpo al AMP, bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo al AMP, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y AMP. En una realización, la presente invención provee un método para monitorear el tratamiento de un trastorno microbiano en un sujeto, en donde el método comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un AMP en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas del sujeto en necesidad de tratamiento, y se detecta el nivel de expresión en la muestra de prueba. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. En una realización, la muestra de prueba comprende sangre o suero. En una realización, detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un AMP comprende (a) contactar un anticuerpo anti-AMP con una muestra de prueba obtenida del mamífero, y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y un AMP en la muestra de prueba. El anticuerpo puede estar enlazado a un marcador detectable. La formación del complejo puede ser monitoreada, por ejemplo, mediante microscopia de luz, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en la técnica. La muestra de prueba puede ser obtenida de un individuo que se sospecha que tiene un trastorno microbiano.

En una realización, la detección del nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido AMP comprende detectar el nivel de transcripción de

ARNm del gen. Se pueden detactar los niveles de transcripción de ARNm, ya sea cuantitativamente o cualitativamente, mediante varios métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los niveles de transcripción de ARNm también pueden ser detectados directamente o indirectamente detectando los niveles de ADNc generados del ARNm. Métodos ejemplares para detectar los niveles de transcripción de ARNm incluyen, pero no se limitan a, RT-PCR cuantitativa de tiempo real y ensayos basados en hibridización, incluyendo ensayos basados en microarreglos y ensayos basados en filtros tales como membranas de Northern.

En otra realización, la presente invención provee un método para detectar la presencia de un AMP en una muestra biológica, que comprende contactar la muestra bilógica con un anticuerpo al AMP, bajo condiciones permisivas para la unión de anticuerpo al AMP, y detectando si se forma un complejo entre el anticuerpo y AMP.

En otra realización, la presente invención se relaciona con un kit de diagnóstico que contiene un anti-AMP en empaque adecuado. El kit contiene preferiblemente instrucciones para usar el anticuerpo para detectar un AMP. En una realización, el kit es para diagnosticar un trastorno microbiano. En una realización, el kit de diagnóstico es para diagnosticar una infección microbiana. En otra realización, la presente invención provee un kit que comprende uno o más AMPs de la presente invención y/o moduladores de los mismos. En otra realización, la presente invención provee un kit que comprende una o más composiciones farmacéuticas, cada una comprendiendo un AMP de la presente invención o modulador del mismo.

G. Ensayos

1. Ensayos Basados en Células y Modelos Animales

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

Los modelos animales *in vivo* también son útiles en la práctica de ciertas realizaciones de la invención. En los Ejemplos a continuación también se describen modelos animales ejemplares. La naturaleza *in vivo* de tales modelos los hace predictivos de las respuestas en pacientes humanos. Los modelos animales de enfermedades relacionadas con el sistema inmune incluyen tanto animales no recombinantes y recombinantes (transgénicos). Los modelos animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, modelos roedores, por ejemplo, modelos murinos. Tales modelos pueden generarse mediante la introducción de células dentro de ratones singénicos utilizando técnicas estándar, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en la vena de la cola, implantación en el bazo, implantación intraperitoneal, implantación bajo la cápsula renal, etc.

Los modelos de enfermedad injerto contra hospedero proporcionan medios para calcular la reactividad de células T contra antígenos MHC y antígenos de trasplante menor. La enfermedad de injerto contra hospedero ocurre cuando se trasplantan células inmunocompetentes en pacientes inmunosuprimidos o tolerantes. Las células donantes reconocen y responden a los antígenos del hospedero. La respuesta puede variar desde una inflamación severa peligrosa para la vida hasta casos medios de diarrea y pérdida de peso. Un procedimiento adecuado para el cálculo de enfermedad injerto contra hospedero es descrito en detalle en Current Protocols in Immunology, citado anteriormente, unidad 4.3.

Un modelo animal para rechazo de aloinjerto de piel es un medio de evaluación de la capacidad de las células T para mediar la destrucción de tejido *in vivo* y una medida de su papel en el rechazo de trasplante. Los modelos más comunes y aceptados utilizan injertos murinos de piel de la cola. Los experimentos repetidos han mostrado que el rechazo de aloinjerto de piel es mediado por células T, células T auxiliares y células T asesinas-efectoras, y no por anticuerpos. Auchincloss, H. Jr. y Sachs, D. H., *Fundamental Immunology*, 2nd ed., W. E. Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992. Un procedimiento adecuado es descrito en detalle en Current Protocols in Immunology, anteriormente, unidad 4.4. Otros modelos del rechazo de trasplante que pueden ser utilizados para evaluar los compuestos de la invención son los modelos de trasplante alogénico de corazón descritos por Tanabe, M. *el al*, *Transplantation* (1994) 58:23 y Tinubu, S. A. *et al*, *J. Immunol.* (1994) 4330-4338.

La hipersensibilidad por contacto es un ensayo *in vivo* simple para la función inmune mediada por célula (hipersensibilidad de tipo retardado). En este procedimiento, la exposición cutánea a haptenos exógenos da lugar a una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado que es medida y cuantificada. La sensibilidad por contacto involucra una fase de sensibilización inicial seguida por una fase de provocación. La fase de provocación ocurre cuando los linfocitos T encuentran un antígeno con el cual han tenido contacto previo. Ocurren la hinchazón y la inflamación, haciendo de éste un excelente modelo de dermatitis alérgica humana por contacto. Un procedimiento adecuado es descrito en detalle en *Current Protocols in Immunology*, Eds. J. E. Cologan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unidad 4.2. Ver también Grabbe, S. y Schwarz, T., *Immun. Today* 19 (I): 37-44 (1998).

Adicionalmente, las composiciones de la invención pueden ser evaluadas sobre modelos animales para enfermedades tipo psoriasis. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden evaluarse en el modelo de ratón scid/scid descrito por Schon, M. P. *et al, Nat. Med.* (1997) 3: 183, en el cual los ratones demostraron lesiones histopatológicas de la piel similares a la psoriasis. Otro modelo adecuado es el de piel humana /quimera de ratón scid preparado tal como se describe por Nickoloff, B. J. *et al, Am. J. Path.* (1995) 146:580. Otro modelo adecuado se describe en Boyman et al., *J Exp Med.* (2004) 199(5):731-6, en el cual piel prepsoriática humana es injertada sobre ratones AGR129, conduciendo al desarrollo de lesiones de la piel psoriáticas.

Pueden construirse animales knock out que tengan un gen defectuoso o alterado que codifique un polipéptido aquí identificado, como un resultado de la combinación homóloga entre el gen endógeno que codifica al polipéptido y una molécula de ADN en la que ese gen haya sido alterado. Por ejemplo, puede utilizarse el ADNc que codifica un polipéptido particular para clonar ADN genómico que codifique ese polipéptido de acuerdo con las técnica establecidas. Una porción del ADN genómico que codifica un polipéptido particular puede ser eliminada o reemplazada con otro gen, tal como un gen que codifique un marcador seleccionable que pueda ser utilizado para monitorear la integración. En forma típica, se incluyen varias kilobases de ADN de flanqueo inalterado (tanto en los extremos 5' y 3') en el vector [ver por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de los vectores de recombinación homóloga]. El vector es introducido dentro de una línea celular madre embrionaria (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homólogamente con el ADN endógeno [ver por ejemplo, Li *et al., Cell*, 69:915 (1992)]. Las células seleccionadas son posteriormente inyectadas dentro de un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o rata) para formar quimeras de agregación [ver por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic*

Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Un embrión quimérico puede entonces ser implantado dentro de un animal adoptivo hembra pseudopreñado adecuado y el embrión puede ser llevado a término para crear un animal "knock out". La progenie que alberga el ADN homólogamente recombinado en sus células germinales puede identificarse por medio de técnicas estándar y utilizarse para procrear animales en los que todas las células del animal contienen el ADN homólogamente recombinado. Los animales knock out pueden caracterizarse por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra ciertas condiciones patológicas y por el desarrollo de condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido.

2. Ensayos de selección para Candidatos a Fármaco

Los ensayos de selección para candidatos a fármaco son diseñados para identificar compuestos que se unen a o complejan con un polipéptido aquí identificado o un fragmento biológicamente activo del mismo, o que de cualquier forma interfieren con la interacción de un polipéptido con otras proteínas celulares. Tales ensayos de selección incluirán ensayos favorables a la selección de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para la identificación de candidatos a fármaco de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos, incluyendo péptidos, preferiblemente péptidos solubles, fusiones de (poli)péptido-inmunoglobulina, y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos poli y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de tales anticuerpos o fragmentos, así como también anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo. Los ensayos pueden desarrollarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de enlace proteína-proteína, ensayos de selección bioquímica, inmunoensayos y ensayos basados en células, los

cuales están bien caracterizados en el estado de la técnica. Todos los ensayos tienen en común que requieren poner en contacto un compuesto de prueba con un polipéptido aquí identificado bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir al polipéptido interactuar con el compuesto de prueba.

En los ensayos de enlace, la interacción es enlazando y el complejo formado puede ser aislado o detectado en la mezcla de reacción. En una realización particular, un polipéptido o el compuesto de prueba se inmoviliza sobre una fase sólida, por ejemplo, sobre una placa de microtítulo, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente se logra generalmente mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido o del compuesto de prueba y secado. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico para un polipéptido a ser inmovilizado, puede utilizarse para anclar el polipéptido a una superficie sólida. El ensayo es desarrollado mediante la adición del componente no inmovilizado, el cual puede estar marcado por medio de una marca detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción es completa, se remueven los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados sobre la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado porta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado sobre la superficie indica que ocurrió la complejación. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no porta un marcador, la complejación puede detectarse, por ejemplo, mediante la utilización de un anticuerpo marcado que se enlaza específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto de prueba interactúa con pero no se enlaza a un polipéptido particular aquí identificado, su interacción con esa proteína puede ensayarse por medio de métodos bien conocidos para la detección de

interacciones proteína - proteína. Tales ensayos incluyen aproximaciones tradicionales, tales como, entrecruzamiento, co-inmunoprecipitación, y co-purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Adicionalmente, las interacciones proteína-proteína pueden monitorearse mediante la utilización de un sistema genético basado en levadura descrito por Fields y colaboradores [Fields y Song, *Nature (London)* 340, 245-246 (1989); Chien *et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582 (1991)] tal como es revelado por Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como levadura GAL4, consisten de dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio enlazante de ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones precedentes (referido generalmente como el "sistema de dos híbridos") toma ventaja de esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína objetivo se fusiona al dominio enlazante de ADN de GAL4, y otra, en la que las proteínas que activan al candidato se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen reportero GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interactúan son detectadas con un sustrato cromatográfico para β-galactosidasa. Un equipo completo (MATCHMAKER™) para la identificación de interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos es comercialmente disponible de Clontech. Este sistema también puede extenderse para mapear dominios de proteína involucrados en interacciones de proteína específica así como también para ubicar con exactitud residuos de aminoácido que son cruciales para estas interacciones.

Para identificar los compuestos que interfieren con la interacción de un polipéptido aquí identificado y otro(s) componente(s) intra o extracelulares,

puede prepararse una mezcla de reacción que contiene el polipéptido y el componente bajo condiciones que permitan la interacción del polipéptido con el componente. Para evaluar la capacidad del un compuesto de prueba para inhibir la interacción, se prepara la mezcla de reacción en la ausencia y en la presencia del compuesto de prueba. Si existe una disminución en la interacción del polipéptido con el componente en la presencia del compuesto de prueba, entonces se dice que el compuesto de prueba inhibe la interacción del polipéptido con el componente.

En ciertas realizaciones, los métodos para la identificación de agonistas o antagonistas de un AMP comprenden poner en contacto un AMP con una molécula candidata a agonista o antagonista y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el AMP. Tales actividades incluyen, pero no están limitadas a, aquellas descritas en los Ejemplos a continuación.

En una realización, la presente invención proporciona métodos para la identificación de agonistas de un polipéptido IL- 22 que comprende poner en contacto un polipéptido IL-22 con una molécula candidata a agonista y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido IL-22. Tales actividades incluyen, pero no están limitadas a, aquellas descritas en los Ejemplos a continuación.

3. Ensayos de enlace a Anticuerpo

Los estudios de enlace a anticuerpo pueden llevarse a cabo en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de enlace competitivo, ensayos sándwich directo e indirecto, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147- 158 (CRC Press, Inc., 1987).

Los ensayos de enlace competitivos se basan en la capacidad de un estándar marcado para competir con el analito de la muestra de prueba por enlazarse con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína objetivo en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que resulta enlazado a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de estándar que resulta enlazado, los anticuerpos son insolubilizados preferiblemente antes o después de la competencia, de tal forma que el estándar y el analito que están enlazados a los anticuerpos puedan ser separados convenientemente del estándar y el analito que permanecen no enlazados.

Los ensayos sándwich involucran el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de enlazarse a una porción inmunogénica diferente, o epítope, de la proteína a ser detectada. En un ensayo sándwich, el analito de la muestra de prueba se enlaza mediante un primer anticuerpo el cual está inmovilizado sobre un soporte sólido, y de aquí en adelante un segundo anticuerpo se enlaza al analito, formando así un complejo insoluble de tres partes. Ver por ejemplo, Patente No. US 4,376, 110. El segundo anticuerpo puede en sí mismo estar marcado con una mitad detectable (ensayos sándwich directos) o puede ser medido utilizando un anticuerpo de anti-inmunoglobulina que es marcado con una mitad detectable (ensayo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo sándwich es un ensayo de ELISA, en cuyo caso la mitad detectable es una enzima.

También puede utilizarse la inmunohistoquímica para determinar la ubicación celular de un antígeno al cual se une un anticuerpo. Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser fresca o congelada o puede estar embebida en parafina y fijada con un preservante tal como formalina, por ejemplo. Artículos de Fabricación

En otra realización, la presente invención proporciona un artículo de fabricación que comprende composiciones útiles para el diagnóstico o tratamiento de los desórdenes microbianos aquí descritos. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una instrucción. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, y tubos de ensayo. Los contenedores pueden estar hechos a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor contiene una composición que es efectiva para diagnosticar o tratar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa, o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Usualmente el agente activo en la composición es un polipéptido, un anticuerpo, un agonista, o un antagonista de la invención. Una instrucción o etiqueta sobre, o asociada con, el contenedor indica que la composición se utiliza para el diagnóstico o tratamiento de la condición de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un Segundo contenedor que comprende una solución amortiguadora farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina amortiguada de fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, e insertos de empaque con instrucciones para su uso.

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

(a) una composición de materia que comprende un AMP o modulador del mismo (por ejemplo, un agonista IL-22);

(b) un contenedor que contiene dicha composición; y

(c) una etiqueta puesta a dicho contenedor, o un inserto de empaque incluido en dicho contenedor, que hace referencia al uso de dicho agonista en el tratamiento de un desorden microbiano. La composición puede comprender una cantidad efectiva del agonista.

EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención, y se proporcionan aquí para propósitos ilustrativos, y no se consideran como una limitación al alcance de la presente invención. Se entiende que varias otras realizaciones pueden practicarse, dada la descripción general aquí proporcionada.

Los reactivos comercialmente disponibles referidos en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos de que se indique de otra forma. La fuente de aquellas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la descripción, mediante los números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection (Colección de Cultivos Tipo Americana), Manassas, VA.

Los datos aquí presentados demuestran por primera vez que la IL-22 es una de las citoquinas clave que comunica la respuesta inmune adaptativa y la defensa epitelial innata durante la infección temprana de un patógeno bacteriano A/E. Tal como se muestra aquí, la inducción de RegIIIβ y RegIIIγ también indica que la IL-22 puede tener funciones más amplias en el control de varias infecciones bacterianas. Los datos sustentan además el papel de las células Th17 y sus citoquinas efectoras en enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes. Finalmente, los presentes estudios indican que la IL-22 y sus productos de cascada, tales como RegIIIβ y RegIIIγ, pueden ser benéficos para el tratamiento de ciertas enfermedades infecciosas.

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

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

Ambos pares de receptores de IL-22, las cadenas de IL-22R y IL-10Rβ, son expresados en el tracto GI de ratones C57Bl/6 de tipo nativo (Fig. 1A). Sus expresiones en el duodeno, el yeyuno, el íleo, y el colon son mayores que cuando están en la piel, un tejido en donde se ha mostrado que IL-22 induce hiperplasia. Consistentemente se ha reportado que tanto las células epiteliales colónicas y los miofibroblastos subepiteliales responden a IL-22. Durante la infección con *C. rodentium*, se indujo IL-22 en el colon de ratones de tipo nativo (Fig. 1B), ya que fueron las citoquinas que promueven la diferenciación de célula Th 17, incluyendo la subunidad p19 y p40 de IL-23 (Fig. 1C-D), e IL-6 (Fig. 1E). Todas estas citoquinas fueron rápidamente inducidas, con un pico de expresión alrededor del día 4 después de la inoculación. En contraste, la inducción de IL-17 tuvo cinética más lenta y alcanzó su máximo nivel en el día 12 después de la inoculación (Fig. 1F).

Dado que bien sea la IL-23 o la IL-6 promueve la producción de IL-22 a partir de células T *in vitro*, los presentes inventores buscaron primero definir su papel en la regulación de la producción de IL-22 durante la infección con *C. rodentium*. Cuando se compara la tasa de supervivencia de ratones de tipo nativo, $p19^{-/-}$, $p40^{-/-}$, e $IL\text{-}6^{-/-}$ después de infección con *C. rodentium*, encontramos consistentemente que todos los ratones bien sea del grupo $p40^{-/-}$ (Fig. 1G) o del grupo $p19^{-/-}$ (datos no mostrados) murieron 10 días después de la inoculación. De manera interesante, también se observó el 60% de mortalidad en el grupo $IL\text{-}6^{-/-}$ alrededor del día 12 (Fig. 1G), indicando que se requiere IL-6, hasta un cierto grado, para un control total de la infección con *C.*

rodentium. Seguidamente examinamos la expresión de IL-22 e IL-17 en ratones $p19^{-/-}$ e $IL\text{-}6^{-/-}$ (Fig. 1H). Mientras que, la expresión de IL-17 no se alteró en los ratones $p19^{-/-}$ (*15*), la inducción de IL-22 disminuyó en los ratones $p19^{-/-}$ comparados con los ratones de tipo nativo. En los ratones $IL\text{-}6^{-/-}$, sin embargo, mientras que el nivel pico de IL-22 era comparable con el de los ratones de tipo nativo, su inducción se retardó significativamente (Fig 1H). Adicionalmente, en los ratones $1L\text{-}6^{-/-}$, la inducción de IL-17 se redujo significativamente, consistente con un papel esencial de IL-6 para la producción de IL-17.

La medición directa de las proteínas IL-22/IL-17 mediante ELISA en cultivos de los colon *ex vivo* a partir de ratones infectados confirmó la cinética de producción de IL-22/IL-17 y la ausencia de inducción de IL-22 a partir de ratones $p19^{-/-}$ durante la infección con *C. rodentium* (Fig. 1L). Estos datos demuestran por primera vez que la IL-23 es esencial para la regulación de IL-22 durante un proceso de enfermedad infecciosa.

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

Ejemplo 2: la IL-22 es una citoquina efectora de cascada clave que contribuye a la biología de IL-23 en el control de infección microbiana.

La regulación alterada de IL-22 en los ratones IL-23 deficientes e $IL\text{-}6^{-/-}$ indicó que la IL-22 puede jugar un papel crítico en la defensa del hospedero contra la infección con *C. rodentium*. Para examinar adicionalmente el papel de la IL-22, se inocularon ratones $IL\text{-}22^{-/-}$ con *C. rodentium*. Mientras que las camadas de tipo nativo perdieron peso transitoriamente pero fueron capaces de recuperarlo completamente después del día 6, los ratones $IL\text{-}22^{-/-}$ continuaron perdiendo peso después de la infección con *C. rodentium* (Fig. 2A). Aproximadamente el 80% de los ratones $IL\text{-}22^{-/-}$ se tornaron moribundos o

murieron 12 días después de la inoculación de *C. rodentium* (Fig. 2A). El análisis histológico de los colon de ratones IL-22$^{-/-}$ infectados a partir del día 8 demostró un espesor mucosal incrementado cuando se compara con el de los ratones TN (Fig. 2B). En forma coincidente, también hubo una inflamación submucosal incrementada (Flecha, Fig. 2B). Adicionalmente, mientras que en los ratones de control, la infección con *C. rodentium* fue predominantemente superficial, grandes números de bacterias penetraron profundamente dentro de las criptas colónicas en los ratones IL-22$^{-/-}$ (Flechas, Fig. 2C). El análisis FACS con un anticuerpo anti-IL-22R (Fig. 12) reveló que la IL-22R fue expresada mediante células epiteliales colónicas murinas primarias positivas de E-cadherina, pero no mediante linfocitos intra epiteliales (IEL) CD45^{+} o células mononucleares de lámina propria (LPMCs) (Fig. 12A). Similarmente, las células epiteliales colónicas humanas primarias también expresaron IL-22R (Fig. 12B). Estos datos sugieren que las células epiteliales colónicas fueron apuntadas directamente por IL-22.

Estos datos soportan la importancia de IL-22 en la defensa del hospedero contra la infección con *C. rodentium*, e indican que la IL-22 puede ser una de las citoquinas efectoras de cascada clave que contribuyen a la biología de IL-23 en el control de infecciones microbianas.

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

El debilitamiento parcial de la defensa del hospedero en ratones IL-6$^{-/-}$ contra *C. rodentium* también puede ser explicada mediante la inducción retardada de IL-22 en estos ratones (Fig. 1H, panel izquierdo). Sin embargo, también es posible que la mortalidad en ratones IL-6$^{-/-}$ infectados con *C. rodentium* pueda haberse debido a su incapacidad para sobrerregular IL-17 (Fig. 1H, panel derecho). La ruta de IL-17 es crucial para el control de muchas

infecciones bacterianas extracelulares, tales como *Klebsiella pneumoniae*. La IL-17 señala a través de IL-17R e IL-17RC (D. Toy *et al., J Immunol* 177, 36 (Julio 1 , 2006)), e induce respuestas proinflamatorias a partir de muchos tipos de célula, incluyendo las células epiteliales (J. Witowski, K. Ksiazek, A. Jorres, *Cell Mol Life Sci* 61 , 567 (Mar, 2004)). Para analizar el papel de la ruta de IL-17 durante la infección con C. rodentium, se generaron ratones IL-17RC$^{-/-}$ (Fig. 5). Comparados con las camadas del tipo nativo, no hubo un defecto obvio en los ratones IL-17RC$^{-/-}$ en términos de desarrollo o composición de las células T, células B y otras células inmunes (datos no mostrados). Sin embargo, los fibroblastos generados a partir de la punta de la cola (Fig. 5C) o el tejido pulmonar (datos no mostrados) de ratones IL-17RC$^{-/-}$ fueron completamente incapaces de producir IL-6 cuando se estimularon bien sea con IL-17A o IL-17F, indicando que la IL-17RC es un receptor esencial para las funciones mediadas por IL-17A y 1L-17F. Después de la inoculación con *C. rodentium*, tanto los ratones IL-17RC$^{-/-}$ y las camadas del tipo nativo sobrevivieron al curso de la infección sin ninguna pérdida significativa de peso (Fig. 2D) o diferencias histológicas en el colon (datos no mostrados).

Estos resultados indican que las rutas de IL-17A e IL-17F no fueron requeridas para la defensa del hospedero contra la infección con *C. rodentium*, excluyendo directamente la posibilidad de que la producción defectuosa de IL-17 es la mayor causa de la mortalidad observada en ratones IL-6$^{-/-}$. Por lo tanto, la inducción retardada de IL-22 observada en ratones IL-6$^{-/-}$ puede ser la razón de que estos ratones fueran incapaces de sobrevivir a la infección. Otros factores de la cascada de IL-6, sin embargo, también pueden ser importantes. Los resultados a partir de los ratones IL-6$^{-/-}$ implican que la inducción temprana de IL-22 puede ser crítica para que el hospedero monte una respuesta suficiente contra la infección con *C. rodentium* con el fin de prevenir la mortalidad.

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

Para determinar si la inducción temprana de IL-22 es crítica para que el hospedero monte una respuesta suficiente contra la infección con *C. rodentium* con el fin de prevenir la mortalidad, se administró anticuerpo anti-IL-22 de neutralización cada día siguiente partiendo bien sea al día 0 o al día 8 después de la inoculación de *C. rodentium*. Tal como se esperaba, los ratones que recibieron mAb anti-IL-22 al mismo tiempo que la inoculación bacteriana continuaron con la pérdida de peso, y todos se tornaron moribundos o murieron 12 días después de la inoculación. En contraste, todos los animales tratados con anticuerpo de control isotipo sobrevivieron (Fig. 2E). Los ratones que recibieron mAb anti-IL- 22 partiendo a los 8 días después de la inoculación tuvieron un resultado similar al que tuvieron los ratones tratados con mAb isotipo, con recuperación total de la infección.

Por lo tanto, estos datos indican que la IL-22 juega un papel crítico en la etapa temprana de la infección con *C. rodentium*, pero no juega ningún papel durante la fase posterior de defensa del hospedero cuando las bacterias están siendo erradicadas.

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

Otras citoquinas de la familia IL-10, IL- 19, IL-20, e IL-24, inducen funciones biológicas similares a aquellas inducidas por la IL-22 en queratinocitos epidérmicos humanos (S. M. Sa *et al, J Immunol* 178, 2229 (Febrero 15, 2007).). Las IL-19, IL-20, e IL-24 fueron sobrerreguladas en colon de ratón de tipo nativo durante la infección con *C. rodentium* (Fig. 6). Pueden, por lo tanto, jugar un papel similar al que juega la IL-22 durante la infección

con *C. rodentium*. La IL-19 señaliza a través de las cadenas de IL-20Rα e IL-20Rβ. La IL-20 y la IL-24 pueden señalizar a través de dos pares diferentes de receptores, IL-20Rα/IL-20Rβ e IL-22R/IL-20Rβ (J.-C. Renauld, *Nature Reviews Immunology* 3, 667 (2003)). Por lo tanto, la IL-20Rβ es la cadena receptora común para estas tres citoquinas. En el tracto GI, la expresión de las cadenas de IL-20Rα e IL-20Rβ fue significativamente inferior que la expresión de estas cadenas en la piel (Fig. 7).

Para direccionar críticamente el papel de estas tres citoquinas durante la infección con *C. rodentium*, se generaron ratones IL-20Rβ$^{-/-}$ (Fig. 8). Estos ratones exhibieron desarrollo normal con composición y desarrollo similar de linfocito en todos los órganos linfoides importantes cuando se compararon con los ratones de tipo nativo (datos no mostrados). La piel del oído de estos ratones falló en la sobrerregulación de las proteínas de la familia S100 cuando se trataron con IL-20 recombinante, indicando un defecto en la señalización *in vivo* de IL-20 (Fig. 8C).

Los ratones IL-20Rβ$^{-/-}$ sobrevivieron a la infección con *C. rodentium* así como también lo hicieron los ratones de tipo nativo (Fig. 2F), demostrando que las IL-19, IL-20, e IL-24 son prescindibles para la defensa del hospedero contra *C. rodentium*.

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

Los presentes inventores examinaron los mecanismos en cascada de IL-22 durante la infección con *C. rodentium*. Tanto los ratones IL-22$^{-/-}$ y los ratones de tipo nativo tratados con mAb anti-IL-22 en el día 0 desarrollaron diarrea sangrienta más severa y una incidencia incrementada de prolapso rectal comparados con los ratones de control 8 días después de la inoculación de *C.*

rodentium (datos no mostrados). Los colon de los ratones IL-22$^{-/-}$ (datos no mostrados) o de los ratones tratados con mAb anti-IL-22 en el día 0 se engrosaron y acortaron 10 días después de la inoculación (Fig. 3A), así como también tienen un intestino ciego más pequeño, comparados con los ratones de control. El análisis histológico adicional reveló inflamación aumentada en los colon que carecen de la señalización de IL-22 (Fig. 3B). También se presentaron una marcada ulceración mucosa multifocal y múltiples focos de inflamación transmural en tanto los ratones IL-22$^{-/-}$ y los ratones tratados con mAb anti-IL-22 (Fig. 3 C, y Fig. 9). Adicionalmente, las cargas bacterianas en el nodo linfático mesentérico, el bazo, y el hígado de los ratones IL-22$^{-/-}$ se incrementaron significativamente comparadas con aquellas de los ratones de tipo nativo. De manera interesante, la diferencia en las cargas bacterianas en los colon de los ratones de tipo nativo y los ratones IL-22$^{-/-}$ fue despreciable (Fig. 3D). Consistente con estos resultados, también hubo evidencia de esparcimiento bacteriano sistémico, particularmente en los hígados de los ratones IL-22$^{-/-}$, en donde la necrosis hepatocelular multifocal con microabceso embólico fue evidente (Fig. 3E).

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

Ejemplo 6: la deficiencia de IL-22 conduce a la reducción en los títulos de IgG anti-bacterianos

Los estudios previos establecieron que el papel esencial de los anticuerpos anti-*C. rodentium* en la remoción de las bacterias. La transferencia de suero de los ratones de tipo nativo pos-infección rescató completamente los ratones CD4$^{-/-}$ de la muerte después del reto con *C. rodentium* (10). En nuestros estudios, los ratones deficientes en IL-22 se tornaron moribundos o

murieron partiendo alrededor del día 8, cuando las respuestas de anticuerpo no se desarrollaron totalmente en ratones de tipo nativo (Fig. 3F). En el día 8, los títulos de anticuerpo de anti-*C. rodentium* fueron 50 veces menos que aquellos en el día 16 en los ratones de tipo nativo. Sin embargo, cuando comparamos los títulos de anticuerpos anti-*C. rodentium* en el día 8 a parir de los ratones de tipo nativo e IL-22$^{-/-}$, hubo una reducción significativa inesperada en el título de IgG de anti-*C. rodentium* en los ratones IL-22$^{-/-}$ comparado con el de los ratones de tipo nativo (Fig. 3G). En contraste, no hubo disminución en los títulos totales de IgG, IgM, IgA o IgM e IgA anti-*C. rodentium* en los ratones IL-22$^{-/-}$ (Fig. 10A y datos no mostrados). El análisis adicional del subtipo IgG reveló que mientras no hubo IgGI anti-*C. rodentium* en los ratones tanto de tipo nativo o IL-22$^{-/-}$ 8 días después de la inoculación, otros subtipos de IgG anti-*C. rodentium*, incluyendo IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3, se redujeron significativamente en los ratones IL-22$^{-/-}$ (Fig. 10B). No era probable que las diferencias en IgG anti-bacteriano específico contribuyeran a la remoción de *C. rodentium* del colon en este punto de tiempo, especialmente dado que no se apuntó a IgG en el lumen de la mucosa colónica, y las cargas bacterianas colónicas en tanto los ratones de tipo nativo y de IL-22$^{-/-}$ eran similares (Fig. 3D). Es posible, sin embargo que ese IgG anti-*C. rodentium* circulante pueda ser importante en el control de la penetración de *C. rodentium* a través de la barrera epitelial intestinal, y prevenga el esparcimiento sistémico, dado que un estudio reciente demostró que se requería de IgG circulante, pero no de IgA o IgM de secreción, para la remoción sistémica de *C. rodentium* (C. Maaser *et al., Infect. Immun.* 72, 3315 (Junio 1, 2004)). No es claro cómo la deficiencia de IL-22 conduce a la reducción en los títulos de IgG anti-bacteriano. No es probable que la IL-22 actúe directamente sobre las células B, dado que la expresión de IL-22R no es detectable en las células B (S. Lecart *et al., Int. Immunol.* 14, 1351 (Noviembre 1, 2002)). No obstante, el IgG anti-*C. rodentium* reducido puede ser uno de los factores que contribuyen a la respuestas de defensa del hospedero defectuosa en ratones IL-22$^{-/-}$ durante la infección con *C rodenlium.*

Ejemplo 7: la IL-22 fue indispensable para la inducción de lectinas anti-microbianas, tales como RegIIIβ y RegIIIγ, a partir de células epiteliales de colon durante infección bacteriana.

El tratamiento con IL-22 de tejidos del colon a partir de ratones de tipo nativo no infectados sobrerreguló *ex vivo* muchas proteínas anti-microbianas, incluyendo S100A8, S100A9, RegIIIβ, RegIIIγ, haptoglobina, SAA3, y lactotransferrina por medio de análisis de microarreglo (Figs 4A, 19, y 20). La inducción de estas proteínas se confirmó mediante RT-PCR en tiempo real (Fig. 4B y datos no mostrados). Durante la infección con *C. rodentium*, sin embargo, únicamente S100A8, S100A9, RegIIIβ y RegIIIγ se expresaron diferenciadamente en ratones IL-22$^{-/-}$ comparados con los ratones de tipo nativo (Fig. 4C). Todos los otros genes fueron bien sea no inducidos o no diferenciados en los colon de los ratones de tipo nativo vs. IL-22$^{-/-}$ (datos no mostrados). La expresión de tanto S100A8 y S 100A9 fue ligeramente mayor en los colon de los ratones IL-22$^{-/-}$ de lo que fue en el colon de tipo nativo en el día 4 y el día 6, sugiriendo que la expresión diferencial de estas proteínas era más probablemente no responsable por la mortalidad aumentada observada en los ratones IL-22 durante la infección con *C rodentium*. No se encontraron diferencias en la expresión de las defensinas, proteínas que son importantes en la defensa del hospedero del epitelio infectado (T. Ganz, *Science* 286, 420 (Octubre 15, 1999)), entre los ratones de tipo nativo e IL-22$^{-/-}$ (datos no mostrados). De manera interesante, la sobrerregulación observada de RegIIIβ y RegIIIγ en los ratones de tipo nativo fue completamente suprimida en los ratones IL-22$^{-/-}$ después de la inoculación de *C. rodentium* (Fig. 4C), indicando que estas dos proteínas tienen funciones potenciales en el control de la infección con *C. rodentium*. Tanto RegIIIβ y RegIIIγ pertenecen a una familia de proteínas de lectinas tipo C secretadas (H. L. Cash, C. V. Whitham, L. V. Hooper, *Protein Expression and Purification* 48, 151 (2006)). Los niveles de expresión de RegIIIβ y RegIIIγ se incrementaron dramáticamente en respuesta

a la colonización bacteriana así como también después de otros estímulos inflamatorios en ratones (S. A. Keilbaugh *et al., Gut* 54, 623 (Mayo 1, 2005) H. Ogawa *et al., Inflammatory Bowel Diseases* 9, 162 (2003) H. Ogawa, K. Fukushima, I. Sasaki, S. Matsuno, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G492 (Sep, 2000)).

La RegIIIβ o RegIIIγ puede prevenir la invasión profunda de *C. rodentium* dentro de las criptas colónicas, ya que no vimos diferencias en las cargas bacterianas a partir de los colon de ratones IL-22$^{-/-}$ vs. ratones de tipo nativo (Fig. 3D). Alternativamente, las proteínas RegIIIβ o RegIIIγ pueden actuar como factores de crecimiento autocrino que juegan un papel en la reparación y/o protección epitelial en la evaluación de la inflamación intestinal (H. Ogawa *et al, Inflammatory Bowel Diseases* 9, 162 (2003); S. L. Pull, J. M. Doherty, J. C. Mills, J. I. Gordon, T. S. Stappenbeck, *PNAS* 102, 99 (Enero 4, 2005); V. Moucadel *et al., Eur J Cell Biol* 80, 156 (Feb, 2001)).

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

Los datos anteriores sugirieron papeles de la IL-22 tanto en la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Por lo tanto, utilizamos ratones deficientes en el gen 2 activador de recombinación (Rag2$^{-/-}$) para examinar críticamente la función de IL-22 en la inmunidad innata vs. adaptativa durante la infección con *C. rodentium*. Los ratones Rag2$^{-/-}$ perdieron peso gradualmente y eventualmente se tornaron moribundos o murieron alrededor del día 30, debido a su carencia de células B y T, y su consecuente incapacidad para montar respuestas de anticuerpo anti-*C. rodentium* (Fig. 13A). Contrario a los ratones p19$^{-/-}$ o IL-22$^{-/-}$, ninguno de los ratones Rag2$^{-/-}$ perdió más del 10% de su peso corporal o murió durante las primeras dos semanas de infección.

Adicionalmente, los ratones $Rag2^{-/-}$ tratados con mAb anti-IL-22 perdieron peso muy rápidamente (Fig, 13A), en forma similar a los ratones TN tratados con mAb anti-IL-22 (Fig. 2E). Todos los ratones $Rag2^{-/-}$ tratados con mAb anti-IL-22 se tornaron moribundos o murieron alrededor del día 10 (Fig. 13). Estos datos sugieren que la ruta de IL-22 sigue siendo activa en los ratones $Rag2^{-/-}$, y que la IL-22 es esencial para proteger a los ratones de la muerte durante la fase temprana de infección con *C. rodentium* en la ausencia de inmunidad adaptativa. Estos datos también indican que la reducción en los títulos de IgG anti-*C. rodentium* fue causa insuficiente para la morbilidad y mortalidad observadas en los ratones $IL\text{-}22^{-/-}$ después de la infección con *C. rodentium*, ya que la sola falta de producción de anticuerpo en los ratones $Rag2^{-/-}$ no ocasionó la pérdida rápida de peso y la muerte temprana después de la infección.

La producción de IL-22 en los ratones $Rag2^{-/-}$ fue comparable con la de los ratones TN después de la infección con *C. rodentium* (Fig. 13B). Por el contrario, la inducción de IL-17A se redujo significativamente en los ratones $Rag2^{-/-}$ (Fig. 13B y C). Por lo tanto, las células T y B no fueron las fuentes de IL-22 en este modelo. La tinción inmunohistoquímica con un mAb anti-IL-22 (Fig. 15) detectó células positivas de IL-22 en el colon de los ratones TN infectados con *C. rodentium*, pero no en colon no infectado o colon infectado de ratones $IL\text{-}22^{-/-}$. Las células positivas de IL-22 se co-localizaron principalmente con racimos de células $CD11c^{+}$ en el colon de ratones $Rag2^{-/-}$ (Fig. 13D), pero no con células positivas F4/80, Gr-1, o DX5 (datos no mostrados). Adicionalmente, la IL-23 indujo la producción de IL-22 directamente a partir de $CD11c^{+}$ DCs *in vitro* (Fig. 13E). Tomados en forma conjunta, nuestros datos demuestran que las DCs son una de las mayores fuentes de producción de IL-22 durante la infección con *C. rodentium*, y que la IL-23 puede promover directamente la producción de IL-22 a partir de DCs.

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

De manera interesante, la sobrerregulación de RegIIIβ y RegIIIγ observada en los ratones de tipo nativo fue completamente suprimida en los ratones IL-22$^{-/-}$ (Fig. 4C), así como también en los ratones p19$^{-/-}$, (Fig. 16) después de la inoculación de *C. rodentium*. Las RegIIIβ y RegIIIγ pertenecen a una familia de proteínas lectinas de tipo C secretadas. Encontramos que otros miembros de la familia, incluyendo RegI, RegII, RegIIIα, y RegIIIδ (Fig. 17), pero no RegIV (datos no mostrados), también fueron sobrerregulados en los colon infectados con *C. rodentium*, y que su inducción fue completamente suprimida en los ratones IL-22$^{-/-}$. La proteína de fusión exógena RegIIIγ de ratón (rmRegIIIγ) protegió significativamente los ratones IL-22$^{-/-}$ de la pérdida de peso inducida por la infección con *C. rodentium*, y aproximadamente el 50% de los animales tratados con proteína de fusión rmRegIIIγ sobrevivieron a la infección, mientras que el 100% de los ratones de control tratados IL-22$^{-/-}$ se tornaron moribundos o murieron (Fig. 14A). Estos datos sustentan la hipótesis de que las proteínas de la familia Reg, tales como RegIIIγ, median funciones esenciales en el control de la cascada de IL-22 en infección con *C. rodentium*.

Finalmente, también fue validada la presencia del eje IL-23/IL-22/Reg en un sistema humano. La IL-23 humana induce la producción de hIL-22 a partir de DCs humanas (Fig. 14B). Las células epiteliales colónicas humanas primarias (Fig. 12B) y las líneas celulares epiteliales colónicas humanas, HT29 y HCTI 5, expresan IL- 22R (Fig. 14C). *In vitro*, las células epiteliales colónicas humanas primarias crecieron lentamente, y perdieron gradualmente su expresión de IL-22R durante la expansión (datos no mostrados). Por lo tanto, utilizamos líneas celulares epiteliales colónicas para evaluar su respuesta para IL-22 humana. La activación de STAT3 inducida por IL-22 en estas líneas

celulares epiteliales colónicas (Fig. 14D), y de ambas RegIIIβ y RegIIIγ fueron significativamente inducidas por IL-22 (Fig. 14E). De manera importante, la proteína de fusión RegIIIγ (rhRegIIIγ), como la proteína de fusión rmRegIIIγ, también redujo la mortalidad de los ratones IL-22$^{-/-}$, hasta un 40% después de la infección con *C. rodentium*, versus el 100% de mortalidad en los ratones de control IL-22$^{-/-}$ tratados (Fig. 18). En conclusión, nuestros datos implican que la ruta de IL-22 puede jugar un papel esencial en el control de infecciones bacterianas, particularmente infecciones bacterianas A/E, en el tracto GI humano.

Resumen

Los presentes inventores demuestran aquí que la IL-22 juega un papel indispensable en la defensa temprana del hospedero contra los patógenos bacterianos de unión y borradura (A/E).

Los presentes datos indican que IL-22 protege la integridad de la barrera epitelial intestinal y evita la invasión bacteriana con propagación sistémica mediante dos mecanismos. Primero, IL-22 está involucrada en la producción de las respuestas IgG anti-bacterianas tempranas. Segundo, la IL-22 es indispensable para la inducción de lectinas anti-microbianas, tales como RegIIIβ y RegIIIγ, de células epiteliales colónicas durante la infección bacteriana. La falta de cualquiera o ambos de estos mecanismos puede contribuir con la respuesta de defensa del hospedero comprometida con propagación sistémica aumentada y mortalidad en ratones IL-22$^{-/-}$ durante la infección por *C. rodentium*.

Aunque las respuestas inmunes adaptivas son esenciales para la depuración de estos patógenos (L. Bry, M. B. Brenner, *J Immunol* 172, 433 (Enero 1, 2004)), las citoquinas, tales como IL-22 que son producidas por las

células inmunes durante las etapas tempranas de la infección, también son necesarias para que las células epiteliales intestinales produzcan una respuesta anti-microbiana total y respuesta de curación de heridas con el fin de evitar la invasión sistémica de bacterias patogénicas en el hospedero. Como se muestra aquí, la inducción de RegIIIβ y RegIIIγ también indica que IL-22 puede tener funciones más amplias para controlar varias infecciones patógenas. Los datos sustentas además el papel de las células Th 17 y sus citoquinas efectoras en enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes. Finalmente, los estudios presentes indican que IL-22 y sus productos descendentes, tales como RegIIIβ y RegIIIγ, pueden ser benéficos para el tratamiento de ciertas enfermedades infecciosas.

Materiales y Métodos

Ratones

Ratones C57B1/6, 1L-12p40$^{-/-}$, e IL-6$^{-/-}$ fueron comprados en Jackson Laboratory. Los ratones IL-22$^{-/-}$ e IL-12p19$^{-/-}$ fueron generados como se describió anteriormente (*11, Fig.*5). Los ratones IL-17RC$^{-/-}$ e IL-20Rβ$^{-/-}$ fueron generados por Lexicon Pharmaceuticals (The Woodlands, TX) usando estrategias descritas (Fig.5 y Fig.8). Brevemente, los ratones knockout se hicieron por recombinación homóloga estándar usando los vectores objetivo descritos. Los vectores objetivo son electroporados en células ES cepa 129 y se identifican los clones marcados. Los clones marcados son microinyectados en blastocitos hospederos para producir quimeras. Las quimeras son criadas en animales C57B1/6 para producir heterocigotos F1. Los heterocigotos son entrecruzados para producir cohortes F2 tipo salvaje, heterocigotos y homocigotos. Los ratones usados en estos estudios fueron genotipados mediante ADN de cola mediante PCR usando un conjunto de los tres cebadores. Los cebadores usados para la amplificación del alelo tipo salvaje de

ratones IL-20Rβ$^{-/-}$ fueron 5'-GTG GAA GCT ACT TGA TGA GTA GGG-3' (p1) y 5'-AGA TGC GAA AAT GGA GAT TAA AAG-3' (p2), los cuales produjeron un producto de 595 bp. Los cebadores usados para la amplificación del alelo mutante de ratones IL-20Rβ$^{-/-}$ fueron 5'-CTA CCC GTG ATA TTG CTG AAG AG-3' (p3) y p2, que produjeron un producto de 351 bp. Los cebadores usados para la amplificación del alelo de ratones IL-17RC$^{-/-}$ fueron 5'-GAG CCT GAA GAA GCT GGA AA- 3' (P3) y 5'-CAA GTG TTG GCA GAG ATG GA-3' (P2), que produjeron un producto de 534 bp. Los cebadores usados para la amplificación del alelo mutante de ratones IL-17RC$^{-/-}$ fueron 5'-TCG CCT TCT TGA CGA GTF CT-3 (P´1) y P2, que produjeron un producto de 404 bp.

Cepa de Bacterias e infección de ratones

Ratones de 6-8 semanas fueron sometidos a ayuno de 8h antes de la inoculación oral con 2x10^9 *C. rodentium* cepa DBS100 (ATCC 51459; American Type Culture Collection) en un volumen total de 200 µl por ratón. Mientras el ayuno, los animales tenían acceso a agua. La inoculación y todas las manipulaciones posteriores fueron conducidas en gabinetes de bioseguridad BL-2. Se dejó que los animales tuvieran acceso a alimento después de la inoculación. Las bacterias se prepararon mediante incubación con agitación a 37°C durante la noche en caldo LB. La concentración relativa de bacterias se evaluó midiendo la absorbancia a OD600 y cada cultivo de inoculación se diluyó serialmente y se colocó en placa para confirmar las CFU administradas.

Recolección de Tejido, histología y conteos de CFU

Los ratones de control oinfectados fueron inoculados como se describe. Las muestras de sangre entera, bazo, hígado, glándula linfática mesentérica, y colon fueron removidas bajo condiciones asépticas. El colon fue disecado al canal anal, y la pieza terminal de 0.5-cm se usó para el análisis de CFU. Los

segmentos próximos fueron fijados en formalina amortiguada neutra al 10%. Las secciones fueron teñodas con H&E para evaluar la patología del tejido. El bazo, hígado, glándula linfática mesentérica y colon fueron pesados y homogenizados. Los homogenados fueron diluidos serialmente y colocados en placas por triplicado a agar MacConkey (Remel). Se identificaron las colonias de *C. rodentium* como colonias rosadas. Las colonias fueron contadas después de 24 h de incubación a 37°C para determinar el $\log_{10}$ CFU por gramo de tejidos.

Aislamiento del ARN y RT-PCR en tiempo real

El ARN de células y tejido fue aislado mediante el Mini Kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La RT-PCR en tiempo real se condujo en un sistema de PCT en Tiempo Real ABI 7500 (Applied Biosystems) con cebadores y sondas usando reactivos de mezcla maestra de RT-PCR de un paso TaqMan (Applied Biosystems). Las secuencias para cebadores y sondas fueron las siguientes: mIL-22, delantero, 5'- TCC GAG GAG TCA GTG CTA AA-3', reverso, 5"-AGA ACG TCT TCC AGG GTG AA-3', y sonda, 5'-TGA GCA CCT GCT TCA TCA GGT AGC A-3" (FAM, TAMRA); mIL-17A, delantero, 5'-GCT CCA GAA GGC CCT CAG A-3", reverso, 5'-CTT TCC CTC CGC ATT GAC A-3', y sonda, 5"- ACC TCA ACC GTT CCA CGT CAC-3" (FAM, TAMRA); gen constitutivo ribosómico de ratón RPL-19, delantero, 5'-GCA TCC TCA TGG AGC ACA T-3', reverso, 5'-CTG GTC AGC CAG GAG CTT-3 ', y sonda, 5'-CTT GCG GGC CTT GTC TGC CTT-3' (FAM, TAMRA); mIL-19, delantero, 5'-AGC CTG GAT TGA CAG GAA TC-3', reverso, 5'-GAT AAT CAG ACG AGG CGT TTC-3', y sonda, 5'-TCT GGA AAC TCC TGC AGC CTG ACA C-3' (FAM, TAMRA); mIL-20, delantero, 5'-TTT GGG AGA ACT AGG CAT TCT T-3', reverso, 5"-TCT TGG ACA GGA GTG TTC TCA-3', y sonda, 5'-CAG CCT CTC CAC TTT CAT CTA TAG CAT CTC C-3 ' (FAM, TAMRA); mIL-24, delantero, 5'-GCT CTC CAT GCC ATT TCA A-3', reverso, 5"-TGG CCA

AGG GTC TGA AGT-3', y sonda, 5"-TGT ACA TCC CTG CTG TCC TCA AGG C-3' (FAM, TAMRA); mIL-6, delantero, 5'-TCC AAT GCT CTC CTA ACA GAT AAG-3', reverso. 5'-CAA GAT GAA T TG GAT GGT CIT G-3' y sonda, 5'-TCC TTA GCC ACT CCT TCT GTG ACT CCA-3' (FAM, TAMRA); mS100A8, delantero, 5'-TGT CCT CAG TTT GTG CAG AAT ATA AA-3', reverso, 5'-TCA CCA TCG CAA GGA ACT CC-3', y sonda 5'-CGA AAA CTT GTT CAG AGA ATT GGA CAT CAA TAG TGA-3' (FAM, TAMRA); mS100A9, delantero, 5'-GGT GGA AGC ACA GTT GGC A-3 ', reverso, 5'-GTG TCC AGG TCC TCC ATG ATG-3', y sonda, 5'-TGA AGA AAG AGA AGA GAA ATG AAG CCC TCA TAA ATG-3" (FAM, TAMRA); mReglllγ, delantero, 5'-ATG GCT CCT ATT GCT ATG CC-3', reverso, 5'-GAT GTC CTG AGG GCC TCT T-3', y sonda, 5'-TGG CAG GCC ATA TCT GCA TCA TAC C-3' (FAM, TAMRA); mPAP/HIP/RegIIIβ, delantero, 5'- ATG GCT CCT ACT GCT ATG CC-3', reverso, 5'- GTG TCC TCC AGG CCT CTT T-3', y sonda, 5'-TGA TGC AGA ACT GGC CTG CCA-3' (FAM, TAMRA); mIL-12p40, delantero, 5'-ACA TCT ACC GAA GTC CAA TGC A-3', reverso, 5'- GGA ATT GTA ATA GCG ATC CTG AGC-3', y sonda, 5'-TGC ACG CAG ACA TTC CCG CCT-3' (FAM, FAMRA); mIL-23p19, delantero, 5'-GGT GGC TCA GGG AAA TGT-3', reverso, 5'- GAC AGA GCA GGC AGG TAC AG-3', y sonda, 5'-CAG ATG CAC AGT ACT CCA GAC AGC AGC-3 ' (FAM, TAMRA); mIL-20Rβ, delantero, 5"-CAG GTG CTT CCA GTC CGT CT-3', reverso, 5'-CTC TCC TGG AAT CCC CAA AGT-3', y sonda, 5'-CAG CAC AGA TGC CAA CGG CCT CAT-3" (FAM, TAMRA); mIL-20Rα, delantero, 5'-CTG GCC GCT TCG GGA CGC-3', reverso, 5'-AAC CAC AGA AGA CAC AAG GAA CTG-3', y sonda, 5'-TCT GCT GCT GGC CGC TTC GG-3' (FAM, TAMRA); mIL-22R, delantero, 5'-GCT GGA CTC CCT TGT GTG T-3', reverso, 5'-CAC ATG GCC TCA GTC TCA A-3', y sonda, 5"-CGC GGG ACC CTC ATC CTT TG-3 ' (FAM, TAMRA); mIL-10Rβ, delantero, 5'-TCC ACA GCA CCT GAA GGA GTT-3', reverso, 5'-GGA GGG AAG GAG AAC AGC AGA-3', y sonda, 5'-TGG GCC ACC CCC ATC ACA GC-3' (FAM, TAMRA). Las reacciones fueron corridas en duplicado y las muestras fueron normalizadas para el gen constitutivo de

control RPL-19 y reportadas de acuerdo con el método ΔΔCt: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{referencia}$

ELISA de Ig

Los análisis se realizaron en suero de sangre entera recolectada como se describió anteriormente (*10*). Brevemente, las placas de ELISA (Nunc) fueron recubiertas con Ab de captura de *C.rodentium* eliminado al calor o con Ig anti-ratón de cabra diluido 1/1000 en PBS (SouthernBiotech). Las placas recubiertas fueron lavadas en PBS más 0.05% de Tween 20, bloqueadas por 1 h con 300 µl de amortiguador de bloqueo (PBS + 0.5 % de BSA + 10 PPM de Proclina), y se lavaron antes de la adición de estándares diluidos serialmente (IgA, IgG, IgG3, e IgM monoclonales de ratón, de SouthernBiotech; los isotipos IgG1, IgG2a, e IgG2b de Sigma-Aldrich; IgG2c de ratón obtenido de Bethil Laboratories) o desconocidos. Las muestras fueron incubadas por 4 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas cinco veces y los isotipos Ig fueron detectados con IgA, IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, e IgG3 anti-ratón de cabra (SouthernBiotech) conjugado a peroxidada de rábano picante (HRP), diluida 1/4,000 en diluyente de prueba (PBS + 0.5 % de BSA + 0.05 % de Tween 20 + 10 PPM de Proclina, pH 7.4), y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se agregó el sustrato de peroxidasa TMB peroxidase a cada pozo y se dejó desarrollar por 15 minutos, luego se adicionó solución de parada (ácido fosfórico 1M) a cada pozo. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placa de Molecular Devices (Sunnyvale, CA) a OD_{450}.

Cultivo de colon In vitro

Se removieron los cólones de ratones C57B1/6. Después de limpueza con PBS frío, los cólones fueron cortados longitudinalmente. Los cólones

fueron colocados en un disco de Petri de 100mm con 10 ml de amortiguador de HBSS (Mediatech) que contiene 2.5 µg/ml de Fungizona-Anfotericina B, 10 µg/ml de Gentamicina, 100 U/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomicina (todos de GIBCO, Invitrogen). Los cólones fueron cuidadosamente raspados para remover la mucosidad en el borde del disco de Petri y fueron transferidos a un nuevo disco de Petri con amortiguador HBSS fresco. Los cólones fueron cortados en piezas de 1-2 mm y transferidos a una plaza de 24 pozos con 50mg de cólones/1 ml/pozo en amortiguador RPMI que contiene 10% de FCS inactivado al calor (HiClone), se agregaron 2.5 µg/ml de Fungizona-Anfotericina B, 10 µg/ml de Gentamicina, L-Glutamina 2 mM, 100 U/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomicina. Se agregaron 10 µg/ml de IL-22 (R & D systems) al cultivo y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Análisis de microarreglos

La cantidad y calidad de las muestras de ARN totales se determinó usando un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop Technologies) y Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), respectivamente. El método para la preparación del ARNc marcado con colotante Cy y la hibridación del arreglo fue proporcionada por Agilent Technologies. Brevemente, la muestra de ARN total se conviertió en un ADNc bicatenario y luego en ARNc marcado colorante Cy usando el Kit de Amplificación Lineal Fluorescente de Entrada de ARN bajo de Agilent. El ARNc marcado fue purificado usando el mini kit RNeasy (Qiagen). El rendimiento de ARNc y la incorporación del colorante Cy se determinó usando el espectrofotómetro ND-1000. 750 ng del ARNc marcado fueron fragmentados e hibridados en el arreglo de Genoma Completo de Ratón de Agilent según lo describe el kit plus de Hibridación In situ del fabricante. Todas las muestras fueron marcadas con Cy5 e hibridadas contra la referencia de

ratón universal marcada con Cy3 (Stratagene). Después de la hibridación, los arreglos fueron lavados, secados y escaneados con el escáner de microarreglo de ADN de Agilent. Se usó el software Feature Extraction 8.5 de Agilent para analizar las imágenes del arreglo adquiridas. Para el agrupamiento de los datos de microarreglo (Fig. 20), los datos de expresión se procesaron a datos de relación log de Agilent mediante métodos estándar. Los genes seleccionados fueron agrupados por aglomeración iterativa de vectores más altamente ligados por el coeficiente de correlación de Pearson, con datos de vectores aglomerados resumidos por enlace promedio.

Cultivo de fibroblasto de punta de la cola de ratón in vitro y estimulación

Para establecer los fibroblastos de punta de la cola (TTFs), se pelaron las colas de ratones adultos IL-17RC$^{-/-}$ y sus compañeros de camada tipo salvaje, tajadas en piezas de 1 cm, colocadas en discos de cultivo, e incubadas con DMEM alto en glucosa (que contiene 10% de FCS, glutamina 2 nm, 100 U/ml de Penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) por 5 días. Las células que migraron fuera de las piezas injertadas fueron transferidas a nuevas placas (pasada 2) y mantenidas en el mismo medio. Se usaron TTFs en la pasada 3 para los experimentos de estimulación. Los TTFs fueron sembrados en placa de 24 pozos a una densidad de $1.2x10^5$ por pozo. Veinticuatro horas después de la miembra, se agregaron IL-17A e IL-17F murino recombinante (R&D Systems) al medio de cultivo a varias concentraciones. El sobrenadante del cultivo celular fue cosechado 24 horas después de la adición de citoquinas y se midieron los niveles de IL-6 murina mediante el ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) mediante el conjunto de ELISA de IL-6 de ratón (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Bloqueo de la IL-22 murina in vivo

El mAb de bloqueo de IL-22 anti-ratón (Clon 8E11, isotipo IgG1 de ratón) (*11*) se inyectó intraperitonealmente antes (Día 0) u 8 días después (Día 8) de la infección con *C. rodentium* a una dosis de 150 µg/ratón día de por medio. Cierto grupo de control también recibió el mAb isotipo IgG1 de control.

Estadísticas

La significancia de las estadísticas se calculó mediante una *ANOVA* de una via o de dos vias usando el software Prism (GraphPad). Todos los valores $p < 0.05$ se consideran significativos y están indicados en el texto. A menos que se especifique de otra forma, todos los estudios para los cuales se representan los datos, son representativos de al menos dos experimentos independientes.

Aunque la invención anterior has sido descrita en algún detalle a manera de iustración y ejemplo para propósitos de claridad de entendimiento, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Las revelaciones de todas las patentes y literatura científica citada aquí está expresamente incorporada en su totalidad mediante referencia.

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

Para ayudar a determinar si la IL-22 es importante para la mortalidad causada por el boqueo de LT, realizamos un experimento de rescate en el cual expresamos IL-22 en el ratón al mismo tiempo del tratamiento de LTbR-Fc. The método que usamos para la expresión de IL-22 fue liberación en vena de cola hidrodinámica del plásmido de ADN que codifica la IL-22 de ratón. La LTbR-Ig humana se construyó de la siguiente forma: LTbR humana que abarca el dominio extracelular (posición 1 a posición 224; SEQ ID NO:57) fue clonada en

un vector de expresión pRK5 modificado que codifica la región Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO:58) aguas debajo de la secuencia de LTbR. Las proteínas fueron sobreexpresadas en células CHO y purificadas mediante cromatografía de afinidad de proteína A. La LTbR.Ig murina se construyó así: LTbR murina que abarca el dominio extracelular (posición 1 a posición 222; SEQ ID NO:59) fue clonada en un vector de expresión pRK5 modificado que codifica la región Fc de IgG2a murino (SEQ ID NO:60) aguas debajo de la secuencia de LTbR.

En la Figura 21 encontramos que LTbR-Fc produce una curva de pérdida de peso similar (Figura 21 panel derecho) y curva de muerte (Figura 21 panel izquierdo) al bloqueo de IL-22 que nos condujo a examinar la relación entre LT e IL-22. La infección por *C. rodetium* conduce a la expresión temprana de IL-22 en el colon.

La Fig. 21 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones inoculados con *Citrobacter rodentium*. Ratones Balb/c de 6-8 week fueron sometidos a ayuno por 8h antes de la inoculación oral con $2x10^9$ de cepa DBS100 de *C. rodentium* (ATCC 51459; American Type Culture Collection) en un volumen total de 200 µl por ratón. Durante el ayuno los animales tuvieron acceso a agua. La inoculación y posteriores manipulaciones se condujeron en gabinetes de bioseguridad BL-2. Se dejó acceso a alimento a los animales después de la inoculación. Las bacterias fueron preparadas mediante incubación con agitación a 37°C durante la noche en caldo LB. La concentración relativa de bacterias se evaluó midiendo la absorbancia a OD600 y cada cultivo de inoculación fue diluido serialmente y colocado en placa para confirmas las CFU administradas. En el día de la inoculación, los ratones fueron también inyectados con 150ug de mAb anti-gp120, mAb anti-IL-22 8E11, o LTbR-Fc 3 veces por semana.

La ruta de LT regula múltiples aspectos aguas arriba que son importantes para la producción de IL-22.

La Figura 22 provee datos sobre la ruta de LT después de la infección con C. *rodentium*. A, C, E. Los cólones fueron cosechados en diferentes puntos de tiempo despues de la infección con *C. rodentium*. Los ratones fueron inyectados con 150ug de anti-gp120 o LTbR-Fc día de por medio. El ARN se extrajo usando un kit RNeasy Qiagen. Se realizó el análisis Taqman para derterminar la expresión de IL-22, Regllg, p19, o p40 con relación al punto de tiempo del día 0. B. En el día 4 después de la infección los cólones fueron recolectados. Después de limpieza con PBS frío, los cólones fueron cortados longitudinalmente. Los cólones fueron colocados en un disco de Petri de 100 mm con 10 ml de amortiguador HBSS (Mediatech) que contiene 2.5 µg/ml de Fungizona-Anfotericina B, 10 µg/ml de Gentamicina, 100 U/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomicina (todos de GIBCO, Invitrogen). Los cólones fueron raspados cuidadosamente para remover la mucosidad en el borde del disco de Petri y fueron transferidos a un nuevo disco de Petri con amortiguador HBSS fresco. Los cólones fueron cortados en piezas de 1 -2 mm y transferidos a una placa de 24 pozos con 50 mg de cólones/1 ml/pozo en amortiguador RPMI que contiene 10% de FCS inactivado al calor (HiClone), 2.5 µg/ml de Fungizona-Anfotericina B, 10 µg/ml de Gentamicina, L-Glutamina 2 mM, 100 U/ml de Penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Se agregaron 10 ng/ml de mIL-22 (R & D systems) al cultivo y se incubó a 37 °C por 24 horas. Los sobrenadantes fueron recolectados para un ELISA de IL-22. D. Células de lámina propria de colon en el día 6. DC se determinó mediante CD11c+ y MFIC II+. Los cólones fueron cosechados y lavados con HBSS sin calcio y magnesio (Invitrogen) con 2% de FBS y HEPES 10mM. Los cólones fueron cortados longitudinalmente, y luego seccionados en piezas de 2-4 cm, y las piezas fueron transferidas a un disco de 10 cm con HBSS sin calcio y magnesio, 2% de FBS, EDTA 1mM, HEPES 10mM, y DTT 1mM (Sigma-Aldrich). Las fracciones IEL fueron

recolectadas y descartadas después de incubación de 45 minutos a 37°C con agitación a 200 rpm. Para el aislamiento de LPMCs, la capa epitelial remanente fue pelada y las piezas de colon fueron cortadas en cubos y colocadas en RPMI que contiene 10% de PCS, HEPES 20mM, y 0.5 mg/ml de colagenasa/dispasa (Roche Diagnostics). Las piezas de colon fueron incubadas por una hora a 37°C con agitación. Las células epiteliales fueron lavadas y usadas para análisis FACS.

En la Figura 22, encontramos que LTbR-Fc bloqueó la inducción de IL-22 así como RegIIIg, el cual ha mostrado ser inducido por IL-22 (Figura 22A-C). Se ha mostrado previamente que las células dendríticas producen IL-22 y encontramos una ligera reducción de los números de DC en la lámina propria del cólon 6 días después de la infección (Figura 22D). El descenso de IL-22 causado por LTbR-Fc se debe más probablemente a la pérdida de IL-23, porque tanto la expresión de p19 como p40 es inhibida después del tratamiento de LTbR-Fc durante la infección (Figura 22H).

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

En el día 1, los animales fueron pesados y agrupados, los ratones extra fueron eutanizados. Después de pesarlos, todos los animales fueron sometidos a ayuno por 14 h. A la mañana siguiente (día 0), todos los ratones fueron inoculados oralmente con 2-4 X 10e9 CFU de *C. rodentium* en 200 ml de PBS. Se inyectaron i.p. 150ug de mAb de control o proteína de fusión a Fc en 200ul de PBS tres veces por semana, durante dos semanas, partiendo el mismo día que la inoculación de bacterias. El alimento fue de nuevo reemplazado por los

investigadores después de la inoculación. Seis horas más tarse se inyectó el plásmido de ADN por la vena de la cola. Experimentos de inyección en vena de cola: 1) el constructo de ADN (vector pRK o pRK-mIL-22) se diluyó en Ringer hasta una concentración para producir una dosis final de 10 microgramos/ratón/inyección. 2) Cada ratón fue inyectado intravenosamente en la vena de la cola con aproximadamente 1.6ml de la solución que contiene el ADN en Ringer. 3) Las dosis fueron administradas como inyección intravenosa de bolo (vena de la cola) durante un período de 4-5 segundos (máximo 8 segundos) para la máxima captación de ADN. Los ratones fueron controlados sin anestesia en un restrainer (jaula) acrílico cónico con un elemento de calentamiento para aumentar la temperatura corporal y dilatar las vasos sanguíneos. 4) Se usarn jeringas estériles desechables para cada animal. Los animales fueron monitoreados continuamente hasta que son clínicamente normales. 5) Se observaron los animales para cualquier señal clínica adversa por al menos 20 minutos después de la dosis. Si los animales no eran clínicamente normales durante 1 hora post dosis, estos eran eutanizados o eran monitoreados hasta que fueran clínicamente normales. Los animales moribundos fueron eutanizados. Todas las manipulaciones se realizaron en gabinetes de bioseguridad BL-2. Durante la infección, los animales moribundos o los que mostraban distrés no aliviado o prolapso rectal fueron eutanizados.

Los ratones fueron monitoreados por 4 semanas todos los días. Entre el día 5 al día 17, cuando los ratones tratados con LTbR-Fc podrían estar moribundos, los ratones fueron monitoreados dos veces por día incluyendo fines de semana. Los sedimentos fecales fueron recolectados cada semana para medir las CFU de *C. rodentium*. Los ratones fueron pesados una vez a la semana durante el estudio. Si los ratones exhibían una pérdida de peso de 15% o más, eran pesados diariamente. Si la pérdida de peso excedía 20%, los ratones eran eutanziados. Al final del estudio, todos los ratones eran

eutanizados y el bazo y colon fueron recolectados para histología, ARN o análisis de FACS.

Como se muestra en la Figura 23 A, podemos detectar expresión de IL-22 en el suero de ratón comenzando a 2 horas post-inyección, con expresión en declive a las 72 horas. También podemos detectar expresión de RegIIIg en el colon, sugiriendo que la IL-22 activa puede actuar en el colon cuando se espresa de esta manera. La IL-22 podría rescatar parcialmente la mortalidad y la pérdida de peso inducida por el tratamiento de LTb-Fc durante la infección (Figura 23B).

Tratamiento de ratones con mAb IL-22 (8E11). La Figura 24 muestra datos que demuestran que el tratamiento con mAb IL-22 8E11 conduce a folículos de colon reducidos, organización de célula B/T comprometida, y números de DC, célula T, y célula B reducidos en el colon. A. Seis días después de la infección, los cólones fueron cosechados y cortados longitudinalmente. Después de incubación por 30 minutos en HBSS sin calcio y magnesio, 2% de FBS, EDTA 1mM, HEPES 10mM, y DTT 1mM, los cólones fueron raspados cuidadosamente para remover células epiteliales. Los folículos fueron identificados como masas blancas redondas. Habían cinco ratones por grupo y y cada colon fue contado y graficado como folículos totales encontrados o folículos tltales mayores de 1 mm encontrados. B. Seis días después de la infeccion, los sólones fueron lavados con PBS frío y congelados rápidamente en OCT. SE cortaron secciones de seis micras, se secaron, luego se fijaron en acetona. Las secciones fueron bloqueadas con suero al 10%, incubadas con FITC anti-CD5 y APC anti-B220 a 10ug/ml cada uno. Las imágenes fueron capturadas en un microscopio NIKON BX61. C. Seis días después de la infección, las células de lámina propria de colon fueron aisladas como se describió anteriormente. El análisis FAC se realizó para determinar el

número de células dendríticas, células T CD3, y células B después del tratamiento con 8E11.

Como se muestra en la Figura 24, tratamos ratones con anticuerpo de bloqueo IL-22 o LTbR-Fc y contamos os folículos linfoides en el colon después de DESI días post infección con el fin de determinar si la IL-22 podría tener un papel en la formación de estructuras linfoides del colon. Encontramos una disminución en folículos mayores de 1mm, sugiriendo que IL-22 y LT podrían ser importantes para el aumento del tamaño del folículo después de la infección (Figura 24A). El análisis histológico muestra que el bloqueo de IL-22 alteró las zonas de célula T y B del folículo aunque el bloqueo de LT tenía un efecto similar (Figura 24B). Luego determinamos si el bloqueo de IL-22 conduce a un cambio de los números de células en la lámina propria del colon. Encontramos que el bloqueo de IL-22 condujo a disminuciones en los números de DC, célula T, célula B durante la infección. En conclusión, la IL- 22 parece ser importante para la formación de folículo linfoide y puede ser un componente importante aguas debajo de la ruta de linfotoxina en el colon.

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un método para el tratamiento de una infección por un patógeno microbiano en un sujeto, mediante la modulación de una respuesta inmune anti-microbiana en dicho sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un polipéptido anti-microbiano (AMP), en donde dicho AMP es IL-22.

2. Un método para el tratamiento de una infección por un patógeno microbiano en un sujeto, mediante la modulación de una respuesta inmune anti-microbiana en dicho sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un polipéptido anti-microbiano (AMP) o modulador del mismo, en donde dicho AMP se selecciona de un grupo que consiste de: IL-6, IL-18, IL-23, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV, secuencia relacionada con Reg (RS) y LT.

3. Un método para modular la actividad de un polipéptido anti-microbiano (AMP) en células de un sujeto infectado con un patógeno microbiano, que comprende contactar dichas células con un AMP aislado, en donde dicho AMP es IL-22.

4. Un método para modular la actividad de un polipéptido anti-microbiano (AMP) en céllas de un sujeto infectado con un patógeno microbiano, que comprende contactar dichas células con un AMP aislado, en donde dicho AMP se selecciona de un grupo que consiste de: IL-6, IL-18, IL-23, REG Ia, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV, secuencia relacionada con Reg (RS) y LT.

5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha infección es un trastorno microbiano.

6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho trastorno microbiano es Enfermedad Inflamatoria del Intestino (IBD).

7. El método de la reivindicación 5, en donde dicho trastorno microbiano es Crohn o Colitis Ulcerativa (UC).

8. El método de la reivindicación 1, en donde dicho patógeno microbiano es una bacteria.

9. El método de la reivindicación 8, en donde dicha bacteria es gram negativa.

10. El método de la reivindicación 8, en donde dicha bacteria es gram positiva.

11. El método de la reivindicación 8, en donde dicha bacteria es una bacteria de unión o borradura (A/E).

12. El método de la reivindicación 11, en donde dicha bacteria de unión o borradura (A/E) es una Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) y E. Coli enteropatogénicca (EPEC).

13. El método de la reivindicación 12, en donde dicha E. coli enteropatogénica (EHeC) es E. coli 0157:H7 o E. coli 055:H7.

14. El método de la reivindicación 2, en donde dicho polipéptido anti-microbiano (AMP) es RegIIIβ y RegIIIγ.

15. El método de la reivindicación 1, en donde dicho patógeno microbiano es un virus.

16. Un método para el tratamiento de una infección por un patógeno microbiano enun sujero, mediante la modulación de una una respuesta inmune anti-microbiana en dicho sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un modulador de polipéptido anti-microbiano (AMP), en donde dicho modulador de AMP es un agonista de IL-22.

17. El método de la reivindicación 16, en donde dicho agonista aumenta la expresión y/o actividad de dicho IL-22.

18. El método de la reivindicación 16, en donde dicho agonista se un polipéptido o molécula de ácido nucleico.

19. El método de la reivindicación 16, en donde dicho agonista es un polipéptido de fusión.

20. El método de la reivindicación 16, en donde dicho agonista es un polipéptido de fusión a Fc.

21. El método de la reivindicación 16, en donde dicho agonista es un anticuerpo o un fragmento biológicamente activo del mismo.

22. El método de la reivindicación 16, en donde dicho agonista es un anticuerpo monoclonal.

23. El método de la reivindicación 16, en donde dicho agonista es un anticuerpo humanizado.

24. El método de la reivindicación 1 o 3, en donde la secuencia de amino ácido de dicha IL-22 comprende la secuencia mostrada como SEQ ID NO:8.

25. El método de la reivindicación 2 o 4, en donde la secuencia de amino ácido de dicho AMP comprende una secuencia seleccionada de un grupo de secuencias de amino ácido que consiste de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 50, y SEQ ID NO: 52.

26. El método de la reivindicación 1 o 3, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha IL-22 es una secuencia mostrada como SEQ ID NO:7.

27. El método de la reivindicación 1 o 3, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica dicho AMP comprende una secuencia seleccionada de un grupo de secuencias de ácidos nucleicos que consisten de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 49, y SEQ ID NO: 51.

28. Un kit que comprende una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno microbiano, en donde dicha composición farmacéutica comprende un polipéptido anti-microbiano (AMP), en donde dicho AMP es IL-22.

29. Un kit que comprende una o más composiciones farmacéuticas para el tratamiento de un trastorno microbiano, en donde dichas composiciones comprenden cada una un polipéptido anti-microbiano (AMP) diferente o modulador del mismo, y en donde dicho AMP se selecciona de un grupo que consiste de: IL-6, IL-18, IL-23, REG Iα, REG Iβ, HIP/PAP, REG III, REG IV, secuencia relacionada con Reg (RS), y LT.

Hoja de Posicionamiento en SCORE para contenido IFW

Solicitud Número: PCT/US08/82890 Fecha de documento: 11/07/2008

La presencia de este formulario en el registro IFW indica que el siguiente tipo de documento fue recibido en formato electrónico en la fecha indicada anteriormente. Este contenido está almacenado en la base de datos SCORE.

- Dibujo de Diseño

Como esta fue una presentación electrónica, no existe carpeta física de artefacto, no está registrada carpeta de artefacto en PALM, y no existen medios físicos o documentos en papel. Las imágenes TIFF en el registro IFW fueron creados de los documentos originales que están almacenados en SCORE.

Para acceder a los documentos en la base de datos SCORE, referirse a las instrucciones desarrolladas por SIRA.

Al momento de la entrada del documento (anotado anteriormente):

- Los examinadores pueden acceder al contenido de SCORE mediante la intarfax eDAN.
- Otros empleados USPTO pueden marcar la URL SCORE actual (http://es/ScoreAccessWeb/).
- Los clientes externos pueden acceder a SCORE mediante las interfaces Públicas y Privadas PAIR.

Fecha de Revisión del formulario: Febrero 8 de 2006

Fig.1

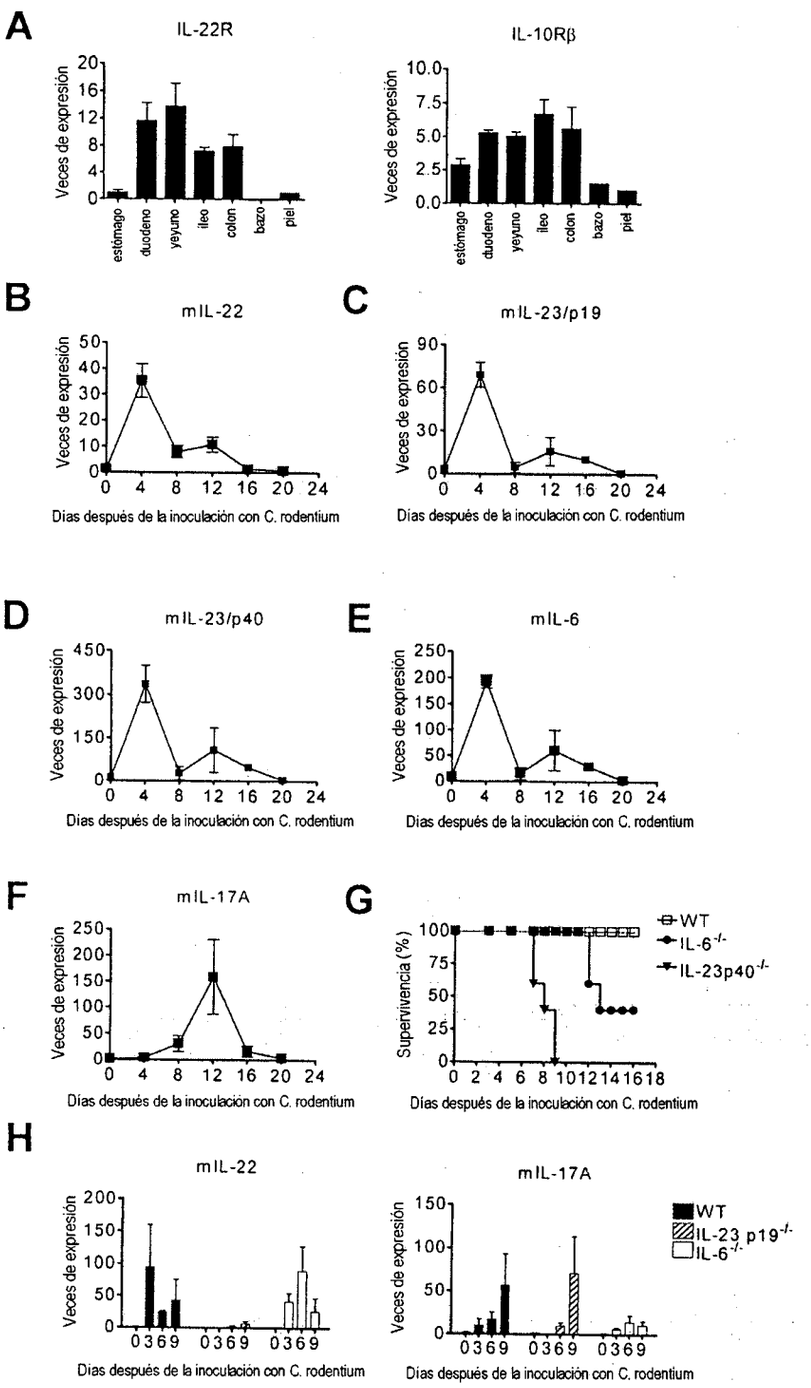

A
IL-22R
Veces de expresión
20
16
12
8
4
0
estómago
duodeno
yeyuno
íleo
colon
bazo
piel
IL-10Rβ
Veces de expresión
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
estómago
duodeno
yeyuno
íleo
colon
bazo
piel
B
mIL-22
Veces de expresión
50
40
30
20
10
0
0 4 8 12 16 20 24
Días después de la inoculación con C. rodentium
C
mIL-23/p19
Veces de expresión
90
60
30
0
0 4 8 12 16 20 24
Días después de la inoculación con C. rodentium
D
mIL-23/p40
Veces de expresión
450
300
150
0
0 4 8 12 16 20 24
Días después de la inoculación con C. rodentium
E
mIL-6
Veces de expresión
250
200
150
100
50
0
0 4 8 12 16 20 24
Días después de la inoculación con C. rodentium
F
mIL-17A
Veces de expresión
250
200
150
100
50
0
0 4 8 12 16 20 24
Días después de la inoculación con C. rodentium
G
Supervivencia (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Días después de la inoculación con C. rodentium
WT
IL-6-/-
IL-23p40-/-
H
mIL-22
Veces de expresión
200
150
100
50
0
0 3 6 9 0 3 6 9 0 3 6 9
Días después de la inoculación con C. rodentium
mIL-17A
Veces de expresión
150
100
50
0
0 3 6 9 0 3 6 9 0 3 6 9
Días después de la inoculación con C. rodentium
WT
IL-23 p19-/-
IL-6-/-

Fig.2

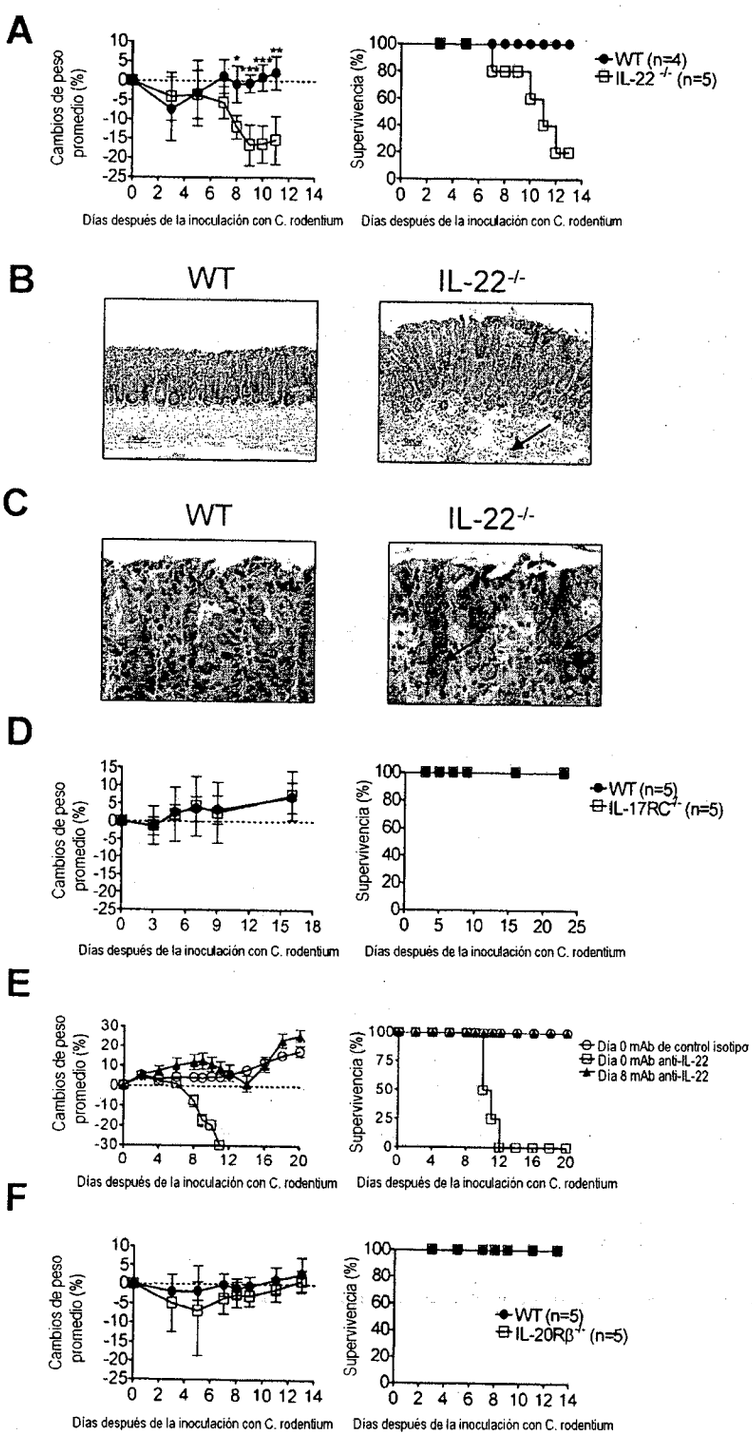

A
Cambios de peso promedio (%)
Días después de la inoculación con C. rodentium
Supervivencia (%)
WT (n=4)
IL-22 -/- (n=5)
B
WT
IL-22-/-
C
WT
IL-22-/-
D
Cambios de peso promedio (%)
Días después de la inoculación con C. rodentium
Supervivencia (%)
WT (n=5)
IL-17RC-/- (n=5)
E
Cambios de peso promedio (%)
Días después de la inoculación con C. rodentium
Supervivencia (%)
Día 0 mAb de control isotipo
Día 0 mAb anti-IL-22
Día 8 mAb anti-IL-22
F
Cambios de peso promedio (%)
Días después de la inoculación con C. rodentium
Supervivencia (%)
WT (n=5)
IL-20Rβ-/- (n=5)

Fig.3

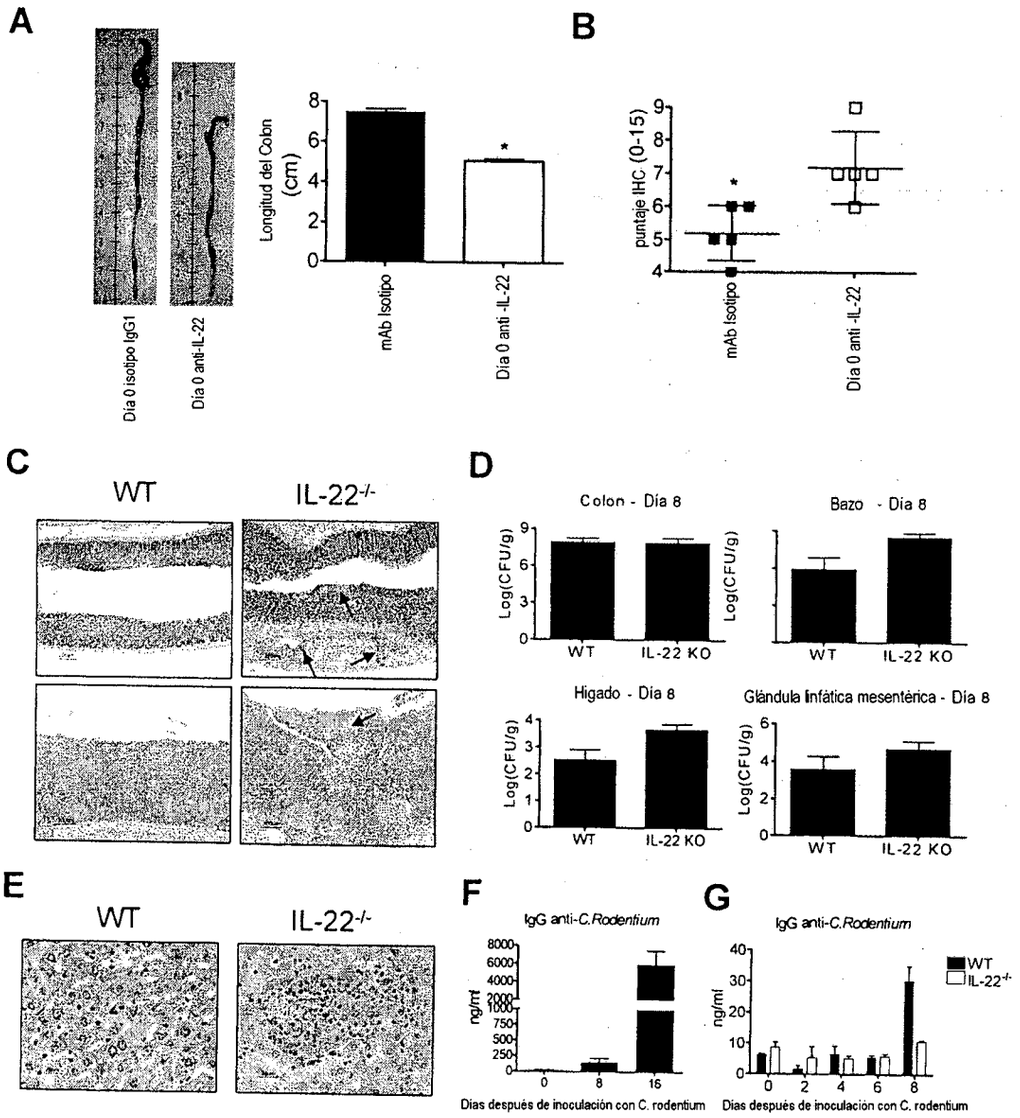

A
Día 0 isotipo IgG1
Día 0 anti-IL-22
Longitud del Colon (cm)
mAb Isotipo
Día 0 anti -IL-22
B
puntaje IHC (0-15)
mAb Isotipo
Día 0 anti -IL-22
C
WT
IL-22-/-
D
Colon - Día 8
Bazo - Día 8
Higado - Día 8
Glándula linfática mesentérica - Día 8
Log(CFU/g)
WT
IL-22 KO
E
WT
IL-22-/-
F
IgG anti-C.Rodentium
ng/ml
Días después de inoculación con C. rodentium
G
IgG anti-C.Rodentium
WT
IL-22-/-
ng/ml
Dias después de inoculación con C. rodentium

Fig.4

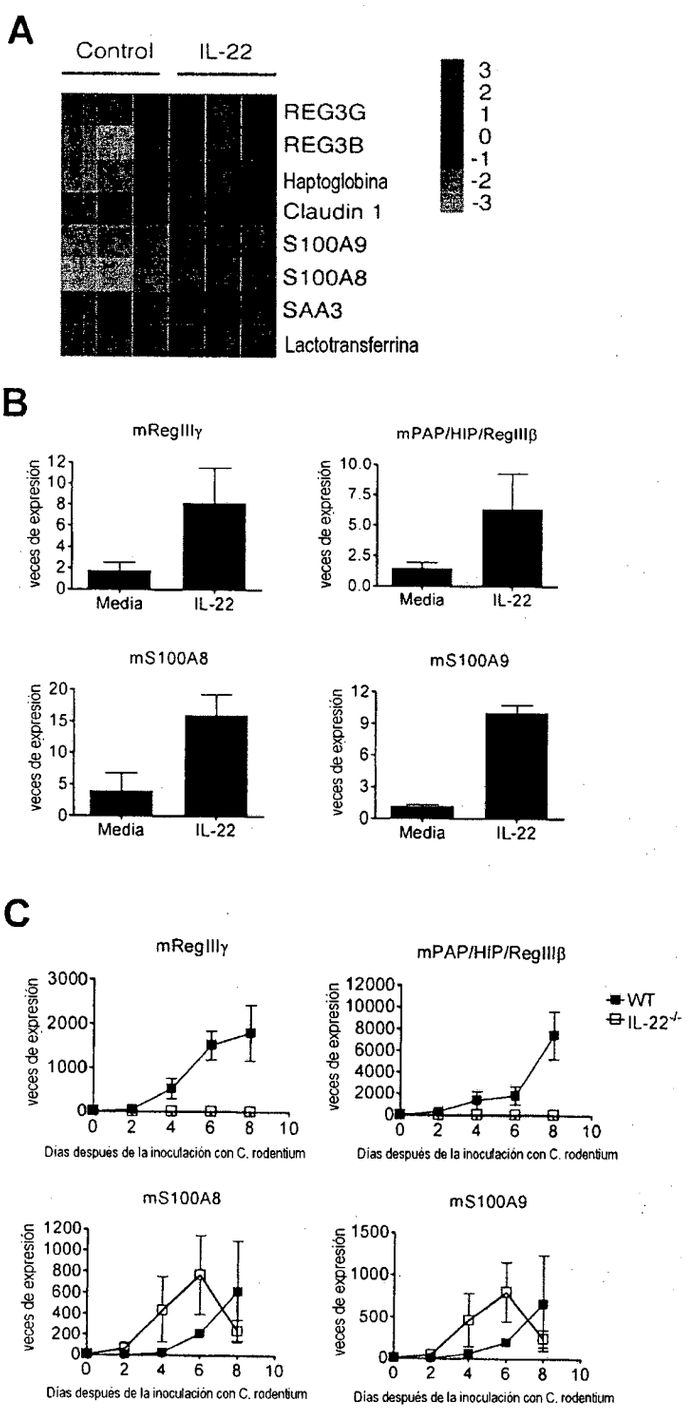

A
Control
IL-22
REG3G
REG3B
Haptoglobina
Claudin 1
S100A9
S100A8
SAA3
Lactotransferrina
3
2
1
0
-1
-2
-3
B
mRegIIIγ
mPAP/HIP/RegIIIβ
mS100A8
mS100A9
veces de expresión
Media
IL-22
C
mRegIIIγ
mPAP/HIP/RegIIIβ
mS100A8
mS100A9
WT
IL-22-/-
Días después de la inoculación con C. rodentium

Fig. 5

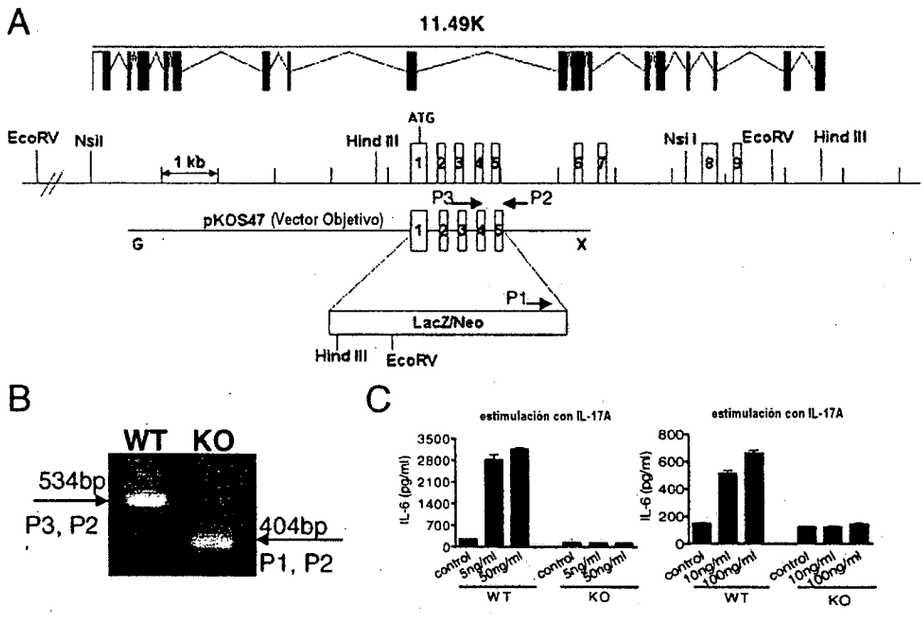

A
11.49K
ATG
EcoRV
NsiI
Hind III
1 kb
Nsi I
EcoRV
Hind III
P3
P2
pKOS47 (Vector Objetivo)
G
X
P1
LacZ/Neo
Hind III
EcoRV
B
WT
KO
534bp
P3, P2
404bp
P1, P2
C
estimulación con IL-17A
IL-6 (pg/ml)
3500
2800
2100
1400
700
0
control
5ng/ml
50ng/ml
WT
KO
estimulación con IL-17A
IL-6 (pg/ml)
800
600
400
200
0
control
10ng/ml
100ng/ml
WT
KO

Fig. 6

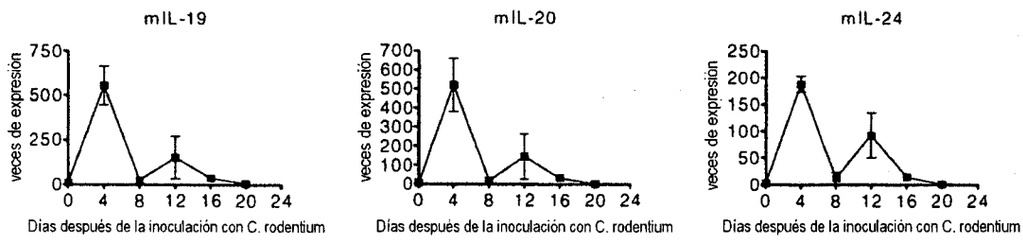

mIL-19
veces de expresión
750
500
250
0
0 4 8 12 16 20 24
Días después de la inoculación con C. rodentium
mIL-20
veces de expresión
700
600
500
400
300
200
100
0
0 4 8 12 16 20 24
Días después de la inoculación con C. rodentium
mIL-24
veces de expresión
250
200
150
100
50
0
0 4 8 12 16 20 24
Días después de la inoculación con C. rodentium

Fig. 7

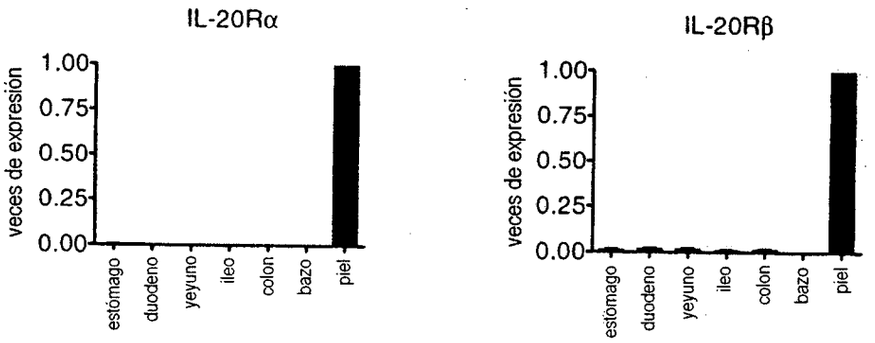

IL-20Rα
veces de expresión
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
estómago
duodeno
yeyuno
ileo
colon
bazo
piel
IL-20Rβ
veces de expresión
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
estómago
duodeno
yeyuno
ileo
colon
bazo
piel

Fig. 8

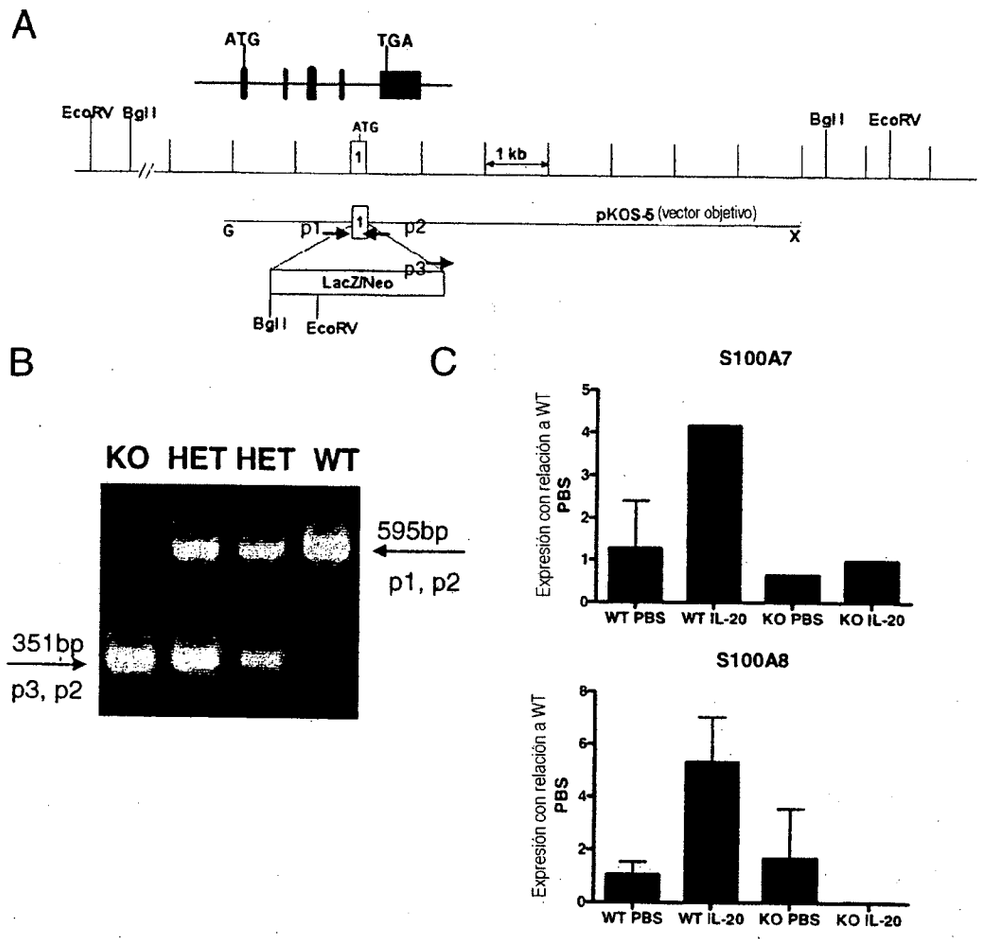

A
ATG
TGA
EcoRV BglI
ATG
1
1 kb
BglI EcoRV
G
p1
1
p2
pKOS-5 (vector objetivo)
X
p3
LacZ/Neo
BglI EcoRV
B
KO HET HET WT
595bp
p1, p2
351bp
p3, p2
C
S100A7
Expresión con relación a WT PBS
WT PBS
WT IL-20
KO PBS
KO IL-20
S100A8
Expresión con relación a WT PBS
WT PBS
WT IL-20
KO PBS
KO IL-20

Fig. 9

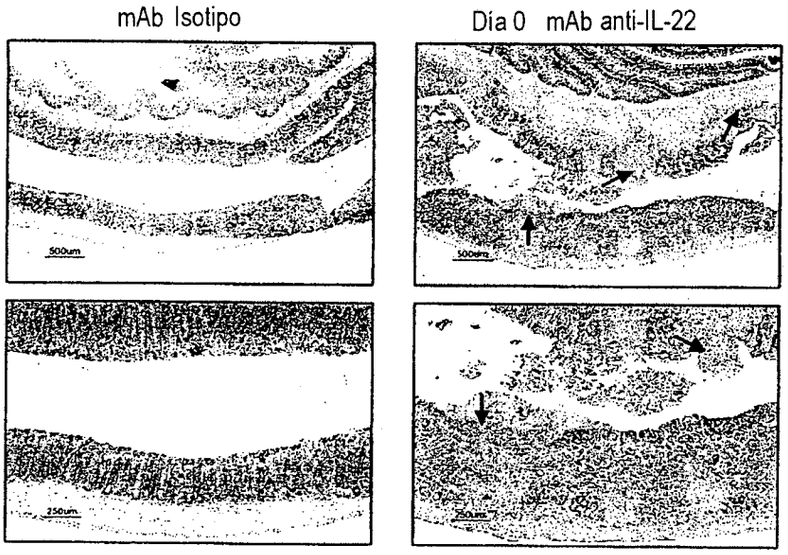


Fig. 10

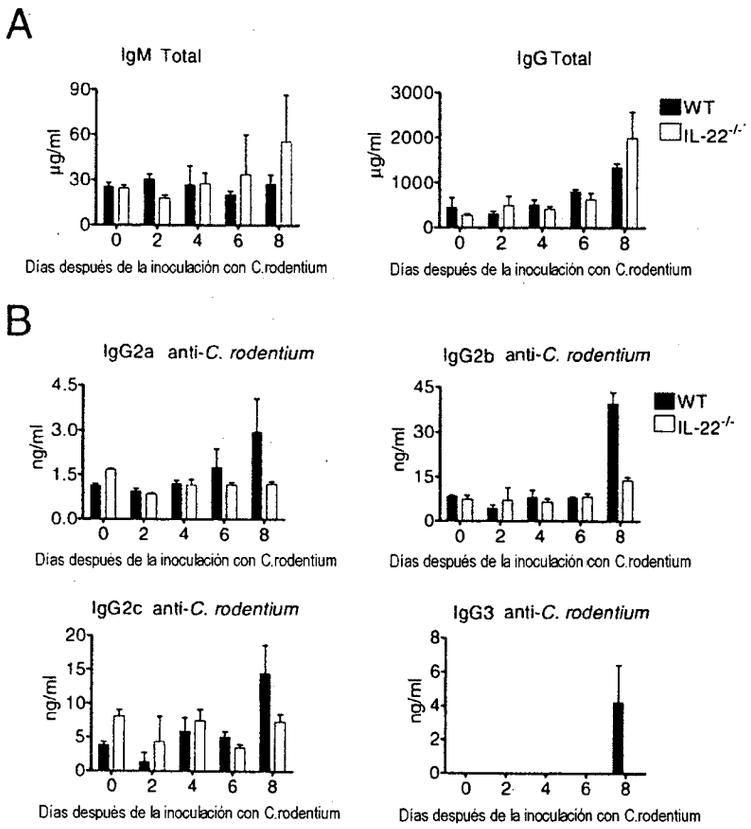

A
IgM Total
µg/ml
90
60
30
0
0 2 4 6 8
Días después de la inoculación con C.rodentium
IgG Total
µg/ml
3000
2000
1000
0
0 2 4 6 8
Días después de la inoculación con C.rodentium
WT
IL-22-/-
B
IgG2a anti-C. rodentium
ng/ml
4.5
3.0
1.5
0.0
0 2 4 6 8
Días después de la inoculación con C.rodentium
IgG2b anti-C. rodentium
ng/ml
45
30
15
0
0 2 4 6 8
Días después de la inoculación con C.rodentium
WT
IL-22-/-
IgG2c anti-C. rodentium
ng/ml
20
15
10
5
0
0 2 4 6 8
Días después de la inoculación con C.rodentium
IgG3 anti-C. rodentium
ng/ml
8
6
4
2
0
0 2 4 6 8
Días después de la inoculación con C.rodentium

Fig. 11

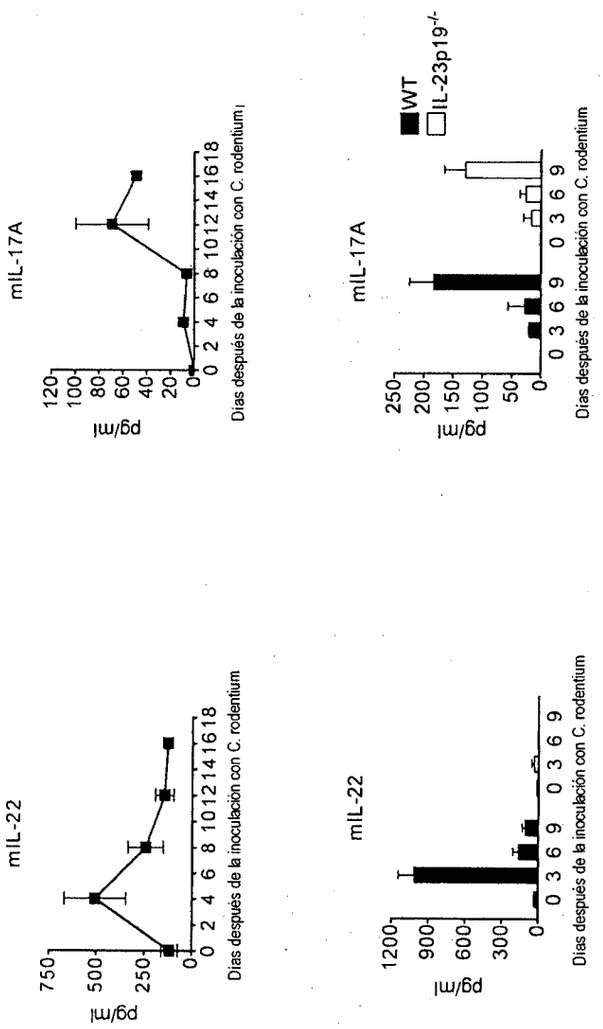

mIL-17A
pg/ml
Días después de la inoculación con C. rodentium
mIL-17A
WT
IL-23p19-/-
pg/ml
Días después de la inoculación con C. rodentium
mIL-22
pg/ml
Días después de la inoculación con C. rodentium
mIL-22
pg/ml
Días después de la inoculación con C. rodentium

Fig. 12

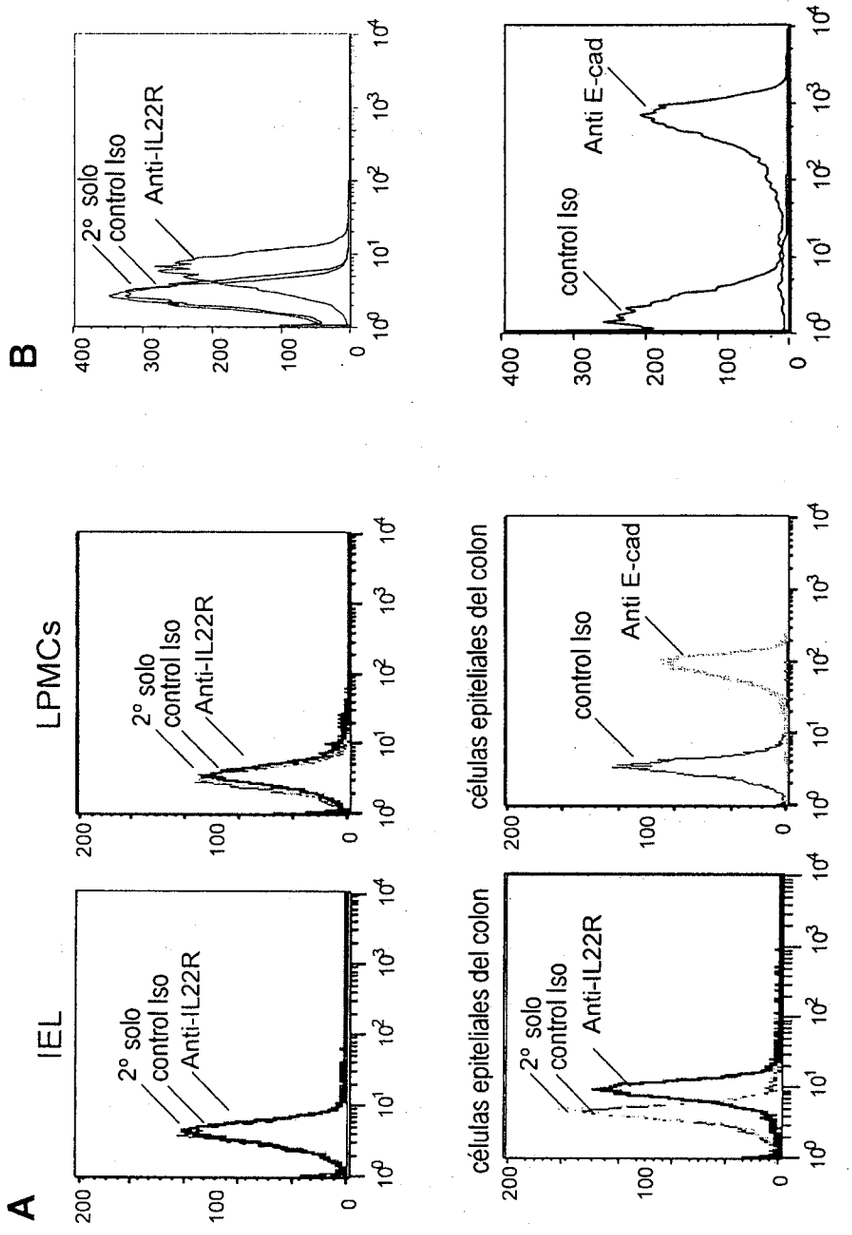
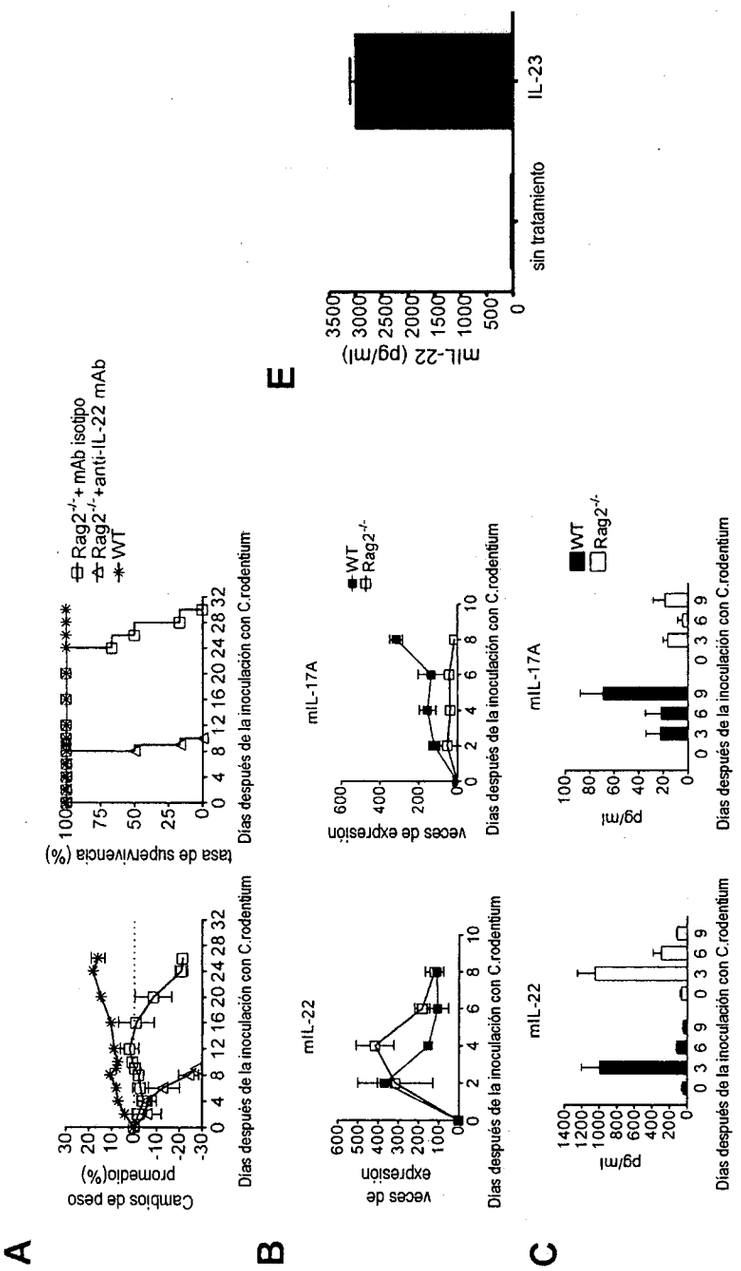

A
IEL
LPMCs
células epiteliales del colon
células epiteliales del colon
2° solo
control Iso
Anti-IL22R
B
2° solo
control Iso
Anti-IL22R
control Iso
Anti E-cad
control Iso
Anti E-cad
0
100
200
300
400
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

Fig. 13


A
Cambios de peso promedio(%)
Días después de la inoculación con C.rodentium
tasa de supervivencia (%)
Rag2-/- + mAb isotipo
Rag2-/- +anti-IL-22 mAb
WT
B
mIL-22
veces de expresión
Días después de la inoculación con C.rodentium
mIL-17A
WT
Rag2-/-
C
mIL-22
pg/ml
mIL-17A
WT
Rag2-/-
E
mIL-22 (pg/ml)
sin tratamiento
IL-23

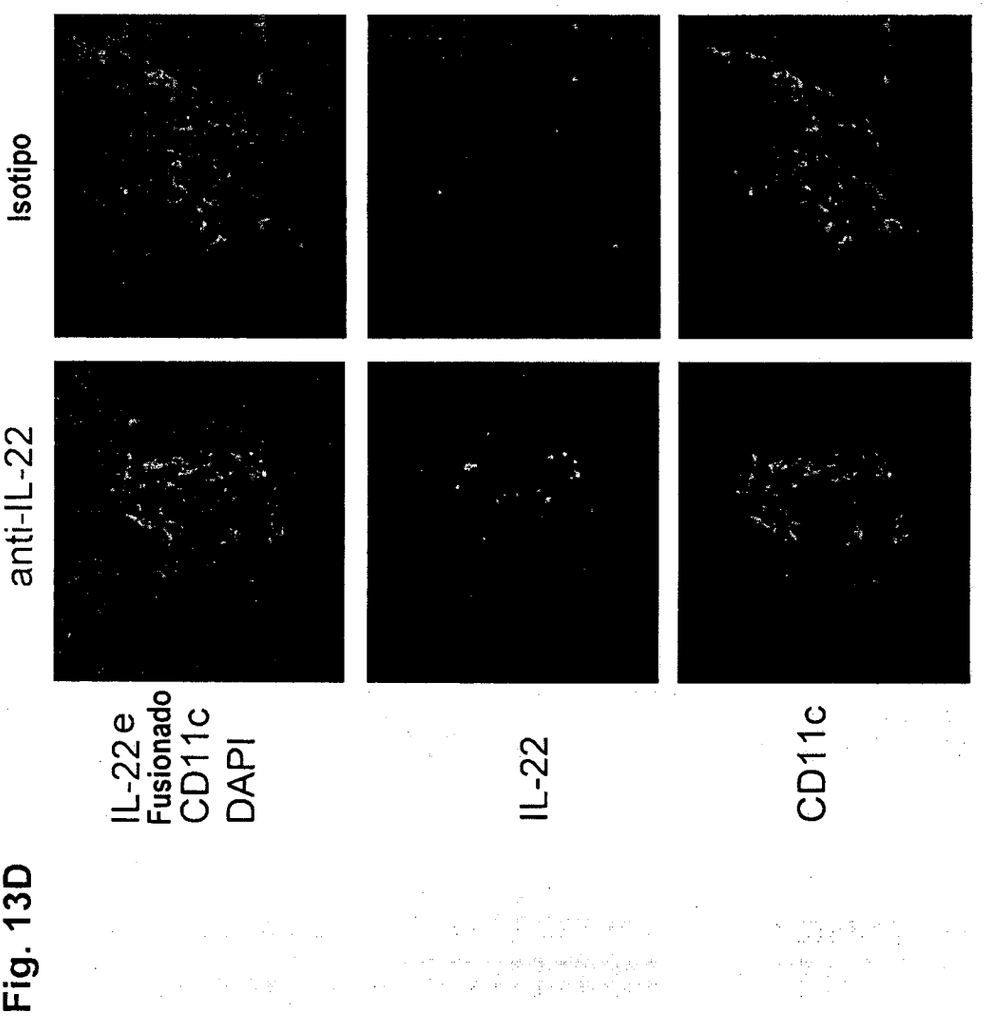
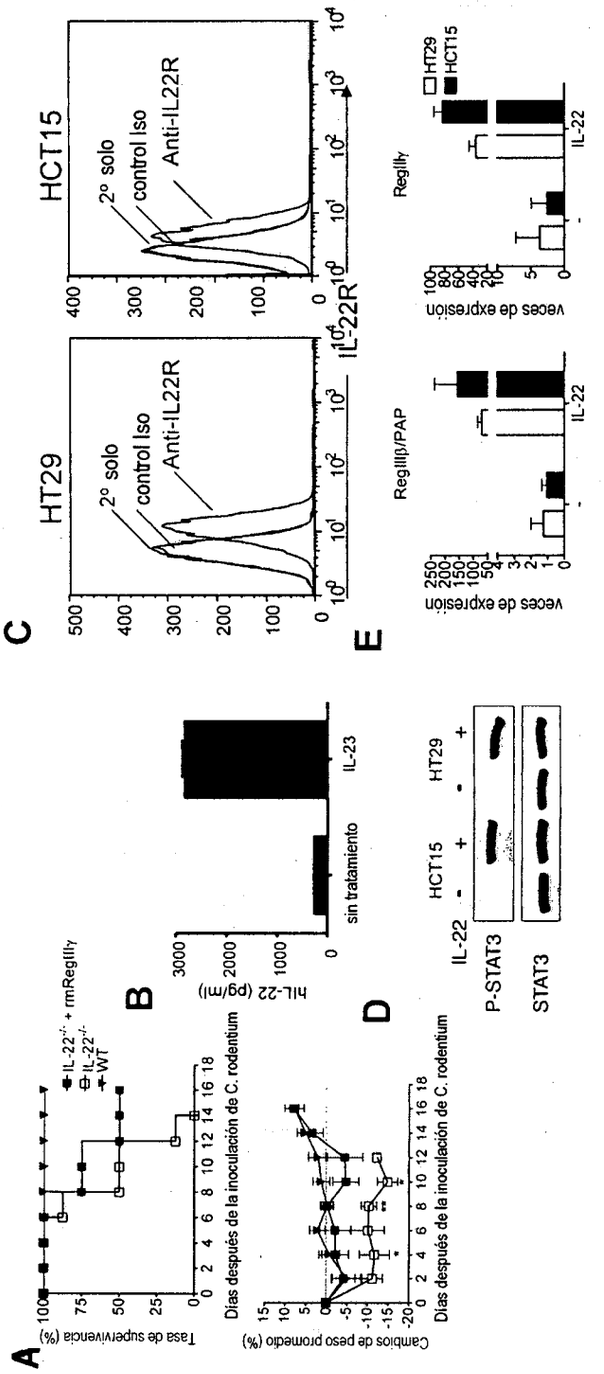


Fig. 13D

Fig. 14


A
Tasa de supervivencia (%)
Días después de la inoculación de C. rodentium
IL-22-/- + rmRegIIIγ
IL-22-/-
WT
B
hIL-22 (pg/ml)
sin tratamiento
IL-23
C
HCT15
HT29
2° solo
control Iso
Anti-IL22R
IL-22R
D
Cambios de peso promedio (%)
Días después de la inoculación de C. rodentium
E
RegIIIβ/PAP
RegIIIγ
veces de expresión
IL-22
HT29
HCT15
IL-22
HCT15
HT29
P-STAT3
STAT3

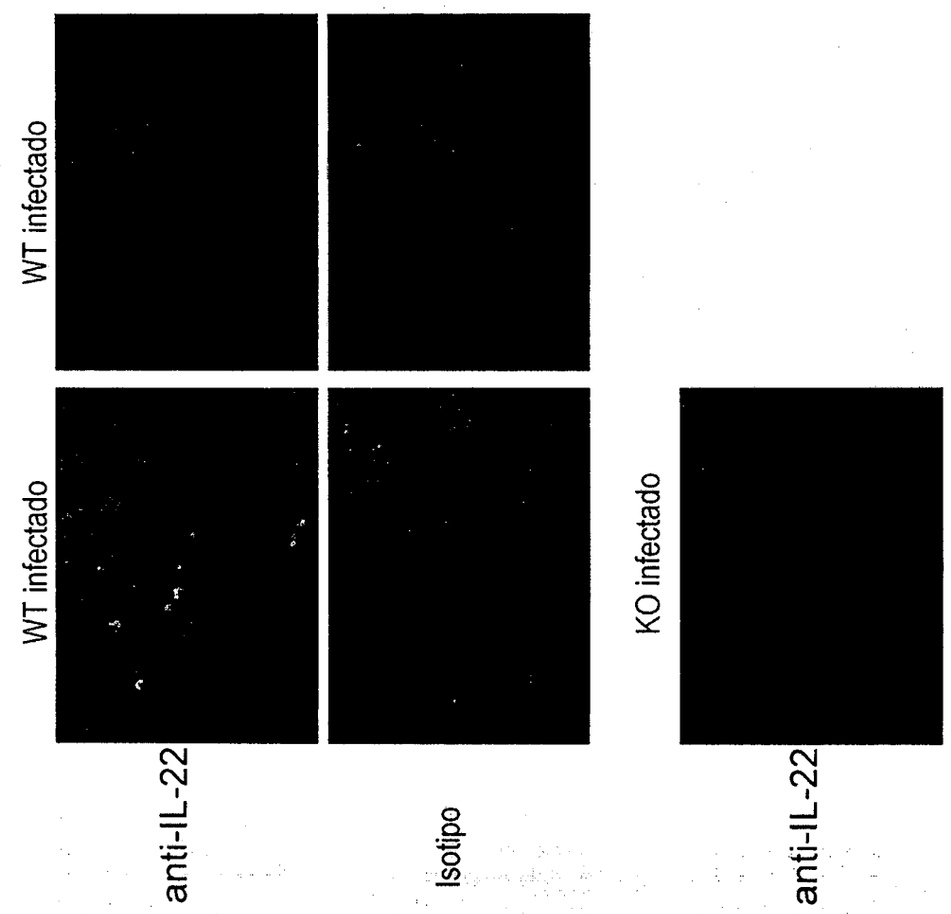

WT infectado
WT infectado
anti-IL-22
Isotipo
KO infectado
anti-IL-22

Fig. 15A

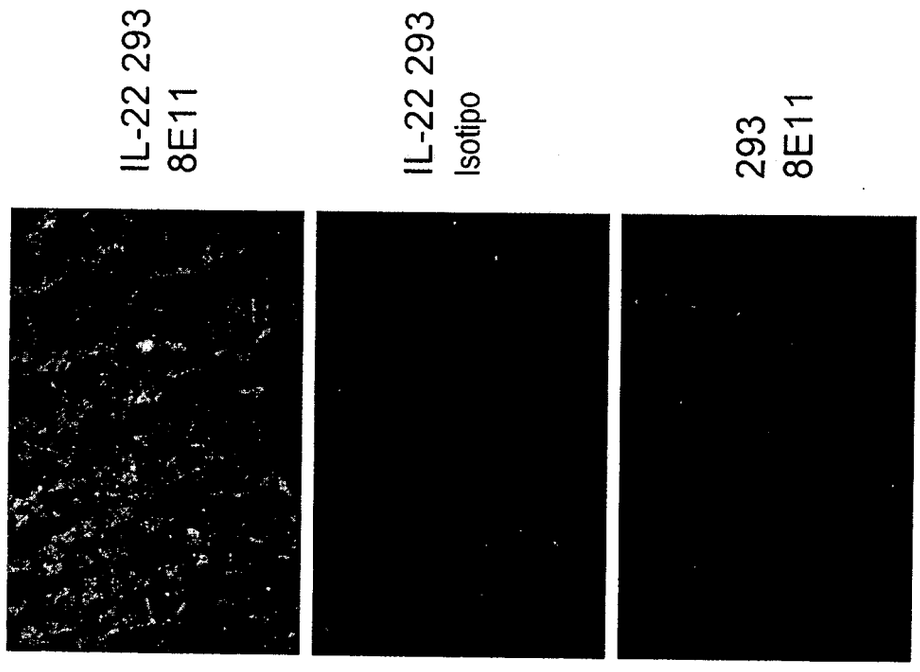


Fig. 15B

Fig. 16

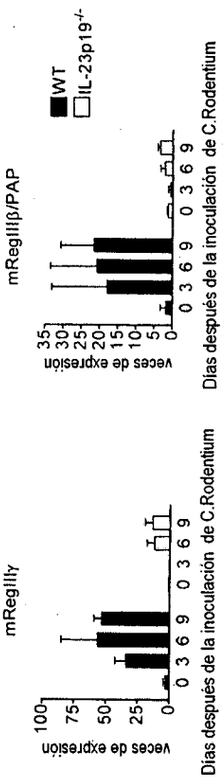

mRegIIIγ
100
75
50
25
0
veces de expresión
0 3 6 9 0 3 6 9
Días después de la inoculación de C.Rodentium
mRegIIIβ/PAP
35
30
25
20
15
10
5
0
veces de expresión
0 3 6 9 0 3 6 9
Días después de la inoculación de C.Rodentium
WT
IL-23p19-/-

Fig. 17

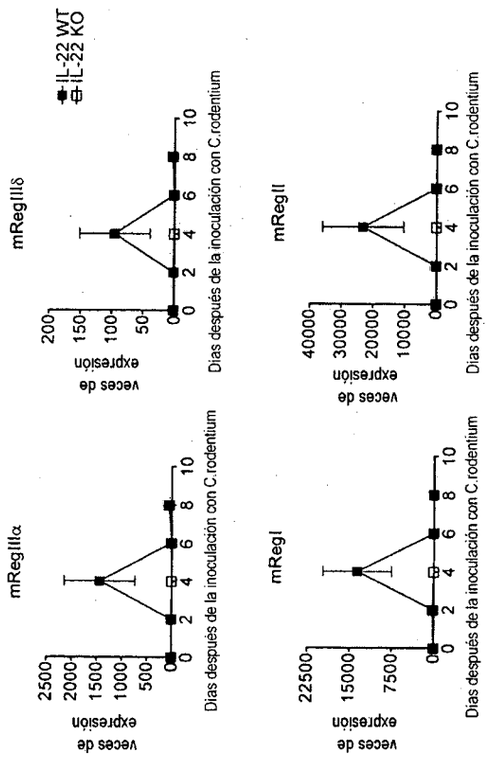

IL-22 WT
IL-22 KO
mRegIIIδ
mRegIIIα
mRegII
mRegI
veces de expresión
Días después de la inoculación con C.rodentium

Fig. 18

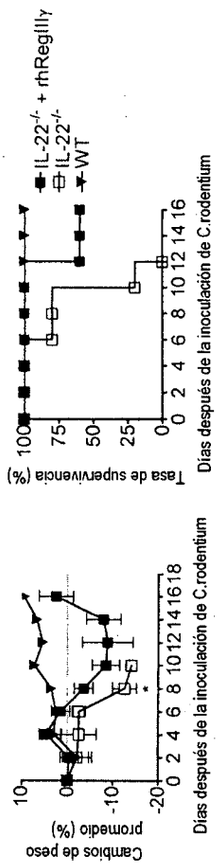

IL-22-/- + rhRegIIIγ
IL-22-/-
WT
Tasa de supervivencia (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
Días después de la inoculación de C.rodentium
Cambios de peso promedio (%)
10
0
-10
-20
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Días después de la inoculación de C.rodentium

Fig. 19A

Conjunto de sonda	valor - P	Log2 FC	ID	Símbolo
A_51_P256827	0	5.674	NM_013650	S100a8
A_52_P700056	0.001	3.722	BC089618	
A_51_P402943	0.001	3.637	NM_009114	S100a9
A_51_P235945	0.007	2.668	NM_017370	Hp
A_51_P169671	0.042	2.523	NM_011036	Pap
A_52_P472324	0.012	2.351	NM_011414	Slpi
A_52_P329207	0.006	2.262	NM_007969	Expi
A_52_P295432	0.015	2.111	NM_009141	Cxcl5
A_52_P321831	0.007	2.062	XM_894811	Krtap3-1
A_51_P279437	0.013	2.032	NM_029662	Mfsd2
A_51_P246166	0.01	1.983	NM_007969	Expi
A_52_P230938	0.008	1.966	NM_010741	Ly6c
A_51_P384894	0.019	1.837	NM_001001332	Stfa1
A_51_P156955	0.045	1.837	NM_013459	Cfd
A_51_P303160	0.03	1.821	NM_007482	Arg1
A_51_P461703	0.034	1.804	NM_031188	Mup1
A_51_P374476	0.019	1.742	NM_008220	Hbb-b1
A_51_P481958	0.012	1.735	NM_016674	Cldn1
A_51_P464703	0.019	1.727	NM_021443	Ccl8
A_51_P132185	0.031	1.724	NM_001001332	Stfa1
A_51_P496795	0.019	1.669	NM_145555	A330049M08Rik
A_51_P296109	0.01	1.63	NM_028618	Dmkn
A_51_P228768	0.043	1.591	NM_011409	Slfn3
A_51_P466535	0.014	1.571	AK172918	Ttc9
A_51_P387239	0.04	1.569	NM_021792	Iigp1
A_51_P337308	0.03	1.547	NM_011315	Saa3
A_51_P346938	0.031	1.541	NM_029796	Lrg1
A_51_P504546	0.047	1.536	NM_027406	Aldh1l1
A_51_P386870	0.026	1.53	NM_011472	Sprr2f
A_51_P216456	0.024	1.522	NM_009311	Tac1
A_51_P212491	0.025	1.517	NM_133232	Pfkfb3
A_52_P48681	0.018	1.514	NM_016674	Cldn1
A_52_P424959	0.038	1.498	NM_153457	Rtn1
A_52_P232813	0.047	1.484	NM_203320	Gm1960
A_51_P181891	0.011	1.458	NM_028113	2600011E07Rik
A_51_P249989	0.014	1.455	NM_145133	T2bp
A_52_P487686	0.042	1.405	NM_001001332	Stfa1
A_52_P168962	0.023	1.387	NM_007646	Cd38
A_51_P485312	0.026	1.372	NM_013653	Ccl5
A_52_P99353	0.019	1.37	AK009488	
A_52_P252931	0.037	1.358	NM_013505	Dsc2
A_52_P278538	0.039	1.349	NM_008218	Hba-a1
A_52_P85132	0.034	1.331	NM_172440	Stxbp5l
A_52_P407198	0.023	1.322	NM_183153	A430060F13Rik
A_52_P638459	0.03	1.317	BC033508	Ccl5
A_51_P335559	0.019	1.311	AK034993	
A_51_P240801	0.018	1.308	BC046640	2610307O08Rik
A_52_P627816	0.032	1.292	NM_019984	Tgm1
A_52_P656860	0.01	1.273	NM_026232	Slc25a30
A_51_P180314	0.045	1.258	AK011413	Mup1
A_51_P328870	0.011	1.249	D86599	Oxtr
A_51_P482908	0.041	1.237	NM_025549	Arrdc4
A_51_P257951	0.041	1.235	NM_020509	Retnla
A_51_P441426	0.029	1.234	NM_019932	Cxcl4

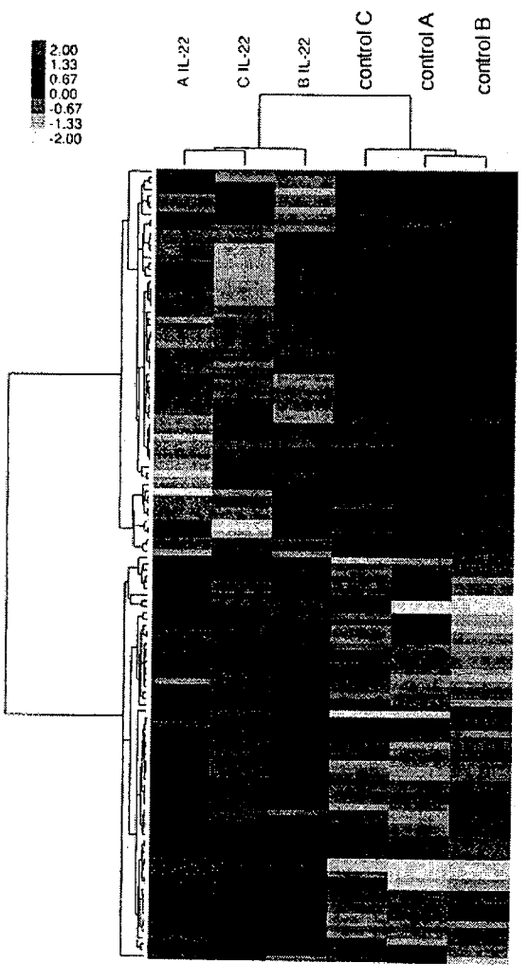
Fig. 19B

Conjunto de sonda	valor - P	Log2 FC	ID	Símbolo
A_51_P128463	0.049	1.232	XM_485455	Grrp1
A_51_P239750	0.008	1.196	NM_008380	Inhba
A_51_P413866	0.044	1.188	NM_008198	Cfb
A_51_P462192	0.037	1.18	NM_138648	Olr1
A_51_P291417	0.026	1.172	NM_009378	Thbd
A_51_P459176	0.013	1.162	XM_899837	1700095J03Rik
A_51_P122321	0.012	1.161	NM_133775	9230117N10Rik
A_51_P110301	0.023	1.158	NM_009778	C3
A_51_P294807	0.039	1.154	NM_013515	Stom
A_51_P504991	0.027	1.151	NM_181542	Slfn10
A_51_P440743	0.041	1.148	NM_009886	Celsr1
A_51_P141012	0.019	1.137	AK173296	Slitrk1
A_51_P445726	0.043	1.128	NM_011095	Lilrb3
A_51_P397968	0.03	1.087	AK087113	
A_51_P464408	0.034	1.078	NM_177314	5330439B14Rik
A_52_P597634	0.041	1.077	NM_021457	Fzd1
A_51_P149714	0.038	1.066	NM_026835	Ms4a6d
A_52_P409833	0.027	1.04	NM_008872	Plat
A_51_P172853	0.03	1.04	NM_009841	Cd14
A_52_P26161	0.026	1.039	NM_008987	Ptx3
A_52_P164821	0.034	1.038	XM_905096	LOC631323
A_52_P987411	0.036	1.038	AK032717	
A_51_P370552	0.037	1.037	NM_030061	9230117E20Rik
A_52_P616392	0.017	1.032	NM_183426	Stno
A_51_P181899	0.027	1.021	NM_028113	2600011E07Rik
A_52_P104075	0.037	1.021	AK052629	Frem1
A_52_P621991	0.048	1.019	NM_009684	Apaf1
A_52_P616949	0.036	1.014	NM_027893	Pvrl4
A_51_P504988	0.022	1.01	NM_172796	Slfn9
A_52_P87713	0.031	1.008	NM_011593	Timp1
A_52_P1012710	0.034	1.005	AK075639	
A_52_P491718	0.049	-1.002	AK047841	Mbtps2
A_51_P191331	0.015	-1.003	NM_011379	Sipa1
A_52_P680941	0.028	-1.003	NM_010284	Ghr
A_52_P1027837	0.038	-1.003	AK034309	9330175M20Rik
A_52_P787453	0.021	-1.019	AK045835	
A_52_P484194	0.025	-1.023	NM_001025602	Il1rl1
A_52_P524426	0.03	-1.023	NM_001003815	Epb4.1l1
A_52_P828218	0.027	-1.027	NM_001030294	Olfm4
A_52_P674087	0.011	-1.028	AK036172	Prtg
A_52_P826055	0.032	-1.028	AK134458	2310020J12Rik
A_52_P563505	0.022	-1.033	AK007074	1700095A21Rik
A_52_P44454	0.015	-1.034	P052591-1	
A_51_P398037	0.018	-1.039	AK048407	Scn3a
A_52_P1132297	0.017	-1.058	AK052006	
A_52_P35598	0.034	-1.064	AK051891	D230015P20Rik
A_51_P151983	0.009	-1.066	NM_019744	Ncoa4
A_51_P130719	0.014	-1.066	NM_023047	Dpysl5
A_52_P218833	0.018	-1.066	ENSMUST000000	
A_52_P1084199	0.022	-1.078	AK036139	9630039A02Rik
A_51_P138496	0.021	-1.08	AK046037	
A_52_P1124261	0.046	-1.086	AK081465	
A_52_P158438	0.023	-1.094	AK006669	1700041C23Rik
A_52_P187046	0.022	-1.098	NM_022724	Suv39h2

Fig. 19C

Conjunto de sonda	valor - P	Log2 FC	ID	Símbolo
A_52_P344098	0.027	-1.098	AK040876	Pde7b
A_51_P314669	0.034	-1.1	NM_011128	Pnliprp2
A_52_P475356	0.02	-1.107	NM_011445	Sox6
A_52_P177454	0.043	-1.114	AK045474	Rab34
A_52_P972196	0.015	-1.12	AK084612	
A_52_P1140731	0.024	-1.122	AK089673	
A_51_P249302	0.017	-1.125	NM_011994	Abcd2
A_52_P866925	0.031	-1.133	AK006067	1700017I07Rik
A_52_P956057	0.026	-1.17	AK081935	
A_52_P939063	0.012	-1.171	AK032576	
A_51_P243750	0.037	-1.175	NM_012025	Racgap1
A_52_P205710	0.047	-1.189	NM_021611	Mylc2pl
A_52_P1188576	0.017	-1.197	AK082439	
A_51_P282523	0.032	-1.201	NM_054044	Gpr124
A_52_P642801	0.009	-1.202	XM_618738	Lats1
A_51_P312615	0.038	-1.207	NM_010377	Hist1h1t
A_52_P214828	0.022	-1.209	NM_011253	Rbmy1a1
A_52_P158660	0.024	-1.231	XM_001002308	4833417A11Rik
A_51_P104255	0.012	-1.237	NM_001039226	LOC625026
A_52_P811599	0.035	-1.244	AK084144	
A_52_P668855	0.016	-1.246	AK042778	9330154J02Rik
A_51_P399974	0.035	-1.246	NM_146997	Olfr178
A_52_P355709	0.007	-1.247	XM_973329	LOC664837
A_52_P207356	0.048	-1.249	AK052515	Aspm
A_52_P1188835	0.034	-1.256	NM_001002780	F830005K03Rik
A_51_P407915	0.013	-1.263	AK040806	A530026G17
A_51_P352743	0.045	-1.285	NM_001013616	Trim6
A_51_P191139	0.012	-1.293	AK050699	D030005H02Rik
A_52_P1139473	0.007	-1.294	AK018751	0610037L18Rik
A_52_P69506	0.042	-1.294	NM_177566	Arhgef15
A_52_P134003	0.042	-1.327	NM_001033289	Slc9a2
A_52_P519943	0.004	-1.337	BC044804	Fads6
A_51_P366413	0.009	-1.394	AK033346	8030498J20Rik
A_52_P988314	0.029	-1.401	AK083509	
A_52_P778486	0.029	-1.404	AK016521	4932412D23Rik
A_52_P162486	0.009	-1.409	NM_007542	Bgn
A_51_P242952	0.032	-1.411	AK079868	
A_52_P267243	0.039	-1.413	NM_010200	Fgf13
A_52_P328714	0.018	-1.422	AK133758	Fbxw2
A_51_P238040	0.018	-1.424	AK030263	
A_51_P327166	0.006	-1.426	AK015801	
A_51_P201035	0.027	-1.443	NM_145924	Cenpi
A_52_P169595	0.034	-1.455	NM_177669	A630098G03Rik
A_52_P507877	0.04	-1.463	NM_007729	Col11a1
A_52_P224818	0.012	-1.468	NM_172483	Zfp180
A_51_P270050	0.041	-1.485	AK078370	6530421E24Rik
A_51_P309099	0.02	-1.489	AK050657	
A_51_P103261	0.034	-1.533	NM_009198	Slc17a1
A_52_P535430	0.021	-1.561	NM_207130	Abca16
A_52_P1083387	0.015	-1.585	AK005856	1700011B04Rik
A_51_P152873	0.014	-1.71	NM_207670	Gripap1
A_52_P569873	0.012	-1.778	XM_127913	4930455B06Rik
A_51_P396119	0.008	-2.489	AK047973	Ttll5

Fig.20


2.00
1.33
0.67
0.00
-0.67
-1.33
-2.00
A IL-22
C IL-22
B IL-22
control C
control A
control B

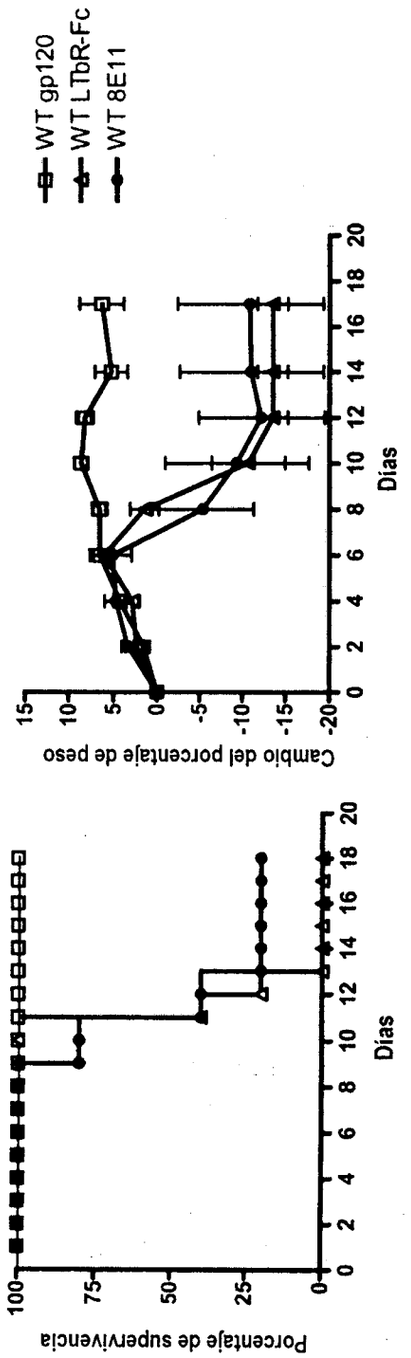
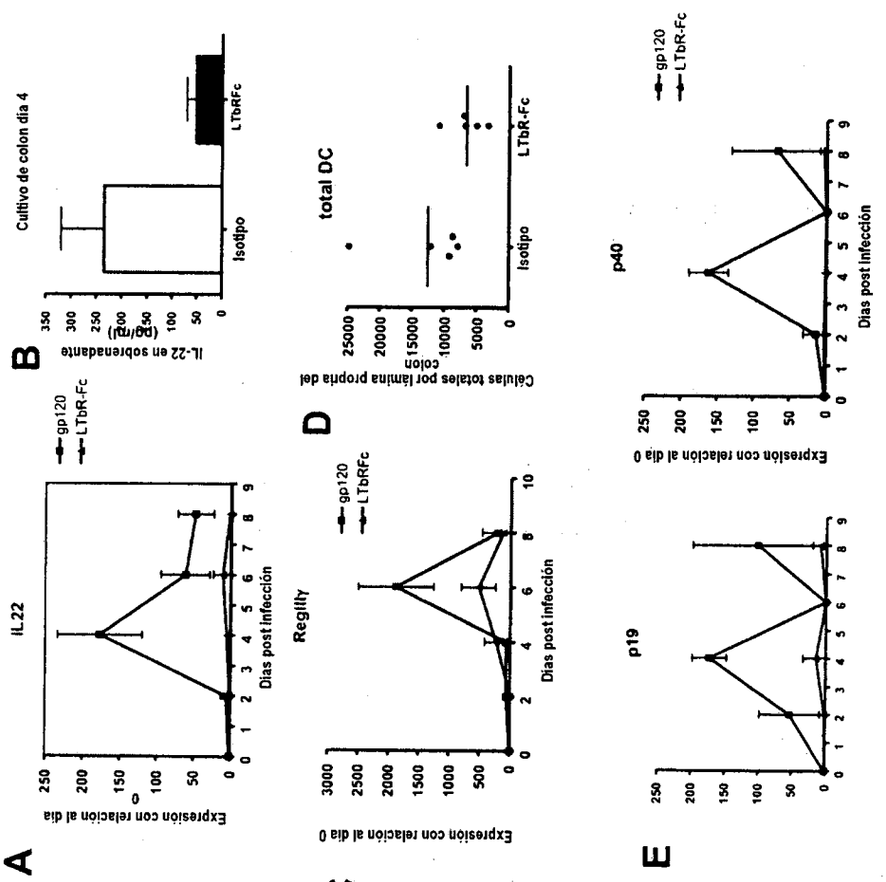

WT gp120
WT LTbR-Fc
WT 8E11
Cambio del porcentaje de peso
Dias
Porcentaje de supervivencia
Dias

Fig. 21

Fig. 22


A
IL22
gp120
LTbR-Fc
Expresion con relacion al dia 0
Dias post infección
B
Cultivo de colon dia 4
IL-22 en sobrenadante
(pg/ml)
Isotipo
LTbRFc
C
Regilly
gp120
LTbRFc
Expresion con relacion al dia 0
Dias post infección
D
total DC
Células totales por lámina propria del colon
Isotipo
LTbR-Fc
E
p19
p40
gp120
LTbR-Fc
Expresion con relacion al dia 0
Dias post infección

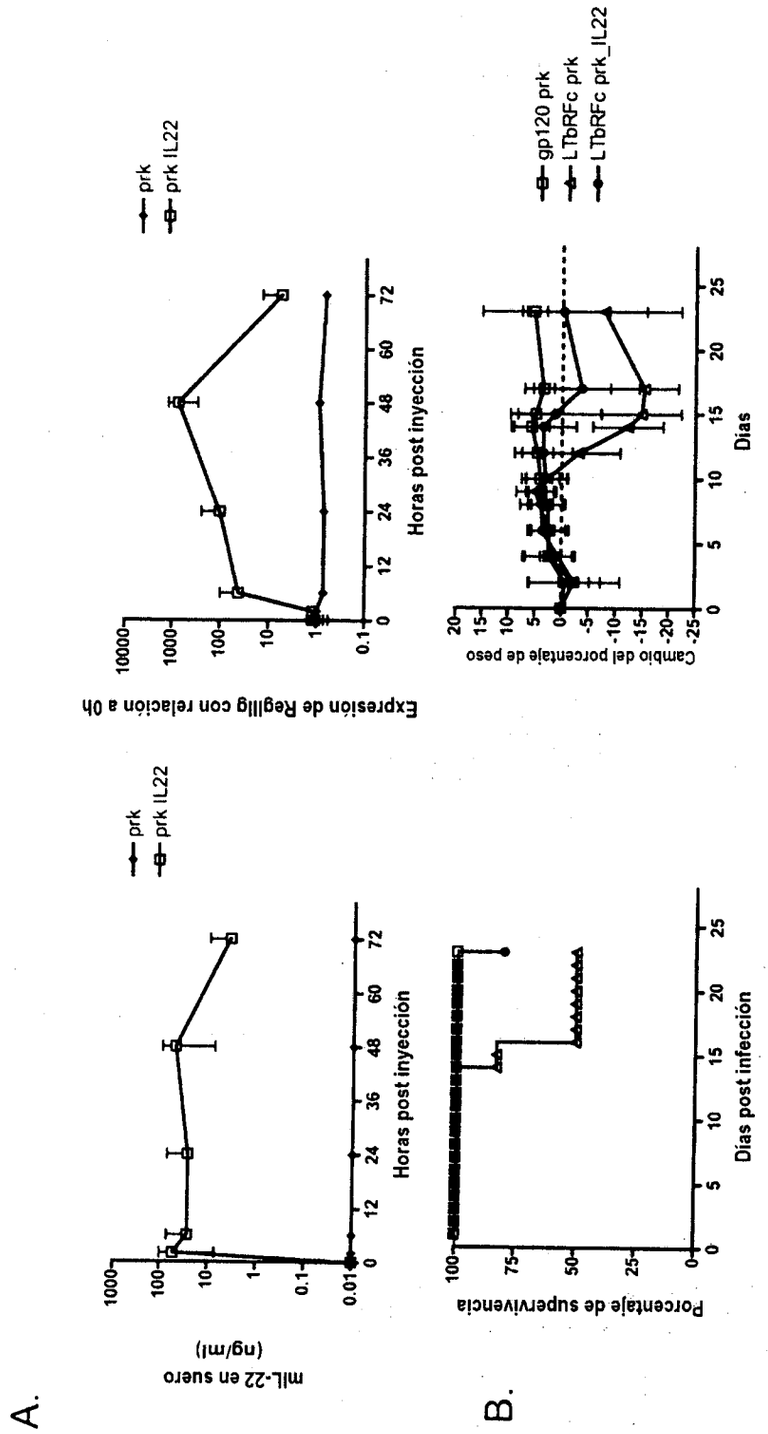
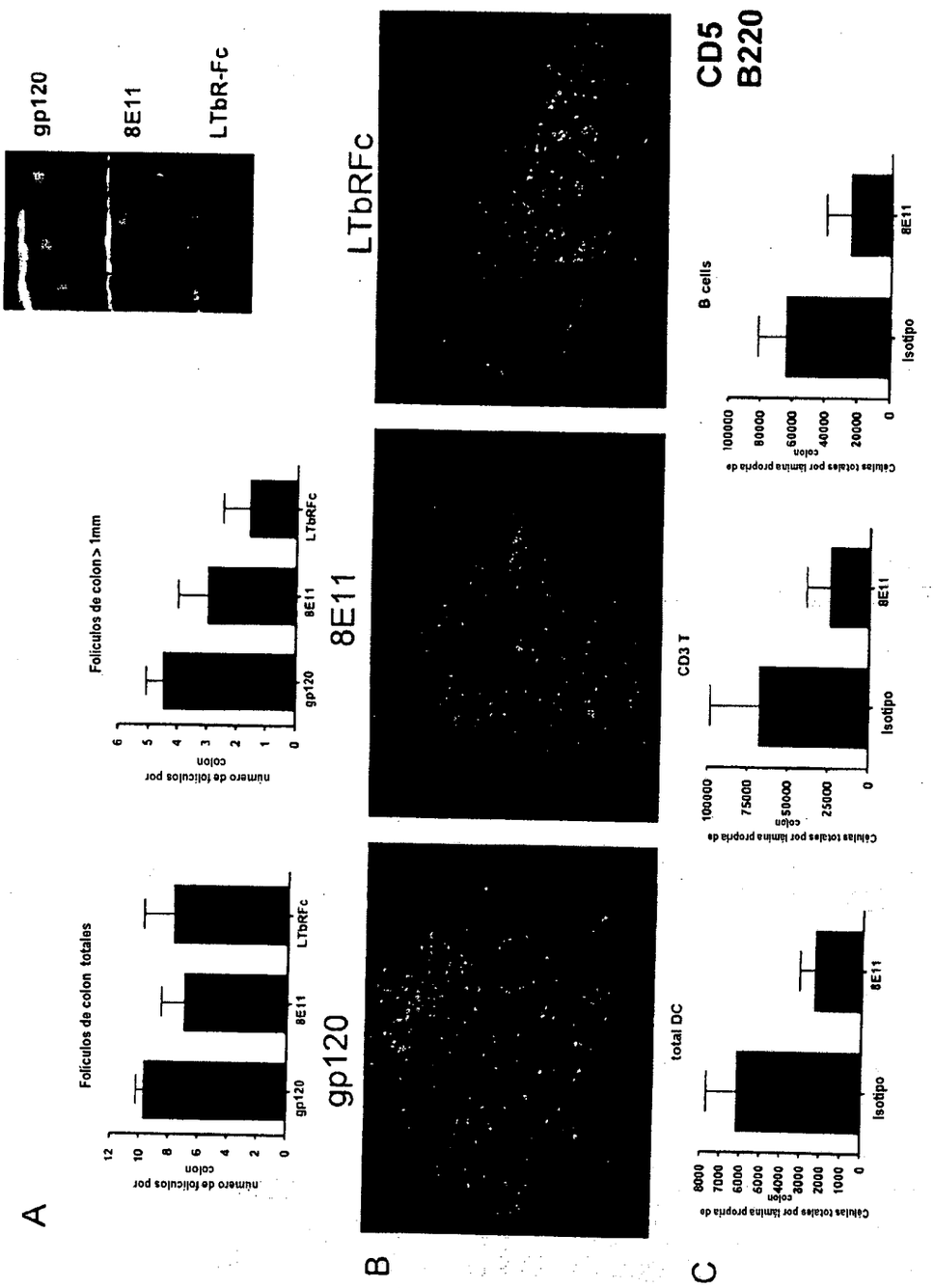

A.
mIL-22 en suero (ng/ml)
prk
prk IL22
Horas post inyección
B.
Porcentaje de supervivencia
Días post infección
Expresión de Reglllg con relación a 0h
Cambio del porcentaje de peso
gp120 prk
LTbRFc prk
LTbRFc prk_IL22
Días

Fig. 23

Fig. 24


A
gp120
8E11
LTbR-Fc
Folículos de colon totales
número de folículos por colon
gp120
8E11
LTbRFc
Folículos de colon > 1mm
número de folículos por colon
gp120
8E11
LTbRFc
B
gp120
8E11
LTbRFc
C
total DC
Células totales por lámina propria de colon
Isotipo
8E11
CD3 T
Células totales por lámina propria de colon
Isotipo
8E11
CD5
B220
B cells
Células totales por lámina propria de colon
Isotipo
8E11

<110> Genentech, Inc.
Abbas, Alexander R.
Danilenko, Dimitry M.
de Sauvage, Frederic J.
Ghilardi, Nico P.
Modrusan, Zora
Ouyang, Wenjun
Valdez, Patricia A.
Zheng, Yan

<120> Composiciones y Métodos para el Tratamiento de Trastornos Microbianos

<130> GNE-0303PCT

<140> Aún sin Asignar
<141> Adjunto

<150> 60/986,170
<151> 2007-11-07

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

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

<160> 61

<210> 1
<211> 1131
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
cattctgccc tcgagcccac cgggaacgaa agagaagctc tatctcccct 50

ccaggagccc agctatgaac tccttctcca caagcgcctt cggtccagtt 100

gccttctccc tggggctgct cctggtgttg cctgctgcct tccctgcccc 150

agtaccccca ggagaagatt ccaaagatgt agccgcccca cacagacagc 200

cactcacctc ttcagaacga attgacaaac aaattcggta catcctcgac 250

ggcatctcag ccctgagaaa ggagacatgt aacaagagta acatgtgtga 300

aagcagcaaa gaggcactgg cagaaaacaa cctgaacctt ccaaagatgg 350

ctgaaaaaga tggatgcttc caatctggat tcaatgagga gacttgcctg 400

gtgaaaatca tcactggtct tttggagttt gaggtatacc tagagtacct 450

ccagaacaga tttgagagta gtgaggaaca agccagagct gtgcagatga 500

gtacaaaagt cctgatccag ttcctgcaga aaaaggcaaa gaatctagat 550

gcaataacca cccctgaccc aaccacaaat gccagcctgc tgacgaagct 600

gcaggcacag aaccagtggc tgcaggacat gacaactcat ctcattctgc 650

gcagctttaa ggagttcctg cagtccagcc tgagggctct tcggcaaatg 700

tagcatgggc acctcagatt gttgttgtta atgggcattc cttcttctgg 750

tcagaaacct gtccactggg cacagaactt atgttgttct ctatggagaa 800

ctaaaagtat gagcgttagg acactatttt aattattttt aatttattaa 850

tatttaaata tgtgaagctg agttaattta tgtaagtcat atttatattt 900

ttaagaagta ccacttgaaa cattttatgt attagttttg aaataataat 950

ggaaagtggc tatgcagttt gaatatcctt tgtttcagag ccagatcatt 1000

tcttggaaag tgtaggctta cctcaaataa atggctaact tatacatatt 1050

tttaaagaaa tatttatatt gtatttatat aatgtataaa tggtttttat 1100

accaataaat ggcattttaa aaaattcagc a 1131

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

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu

185 190 195

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

Gln Met

<210> 3
<211> 2347
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
ctgtttcagg gccattggac tctccgtcct gcccagagca agatgtgtca 50

ccagcagttg gtcatctctt ggttttccct ggtttttctg gcatctcccc 100

tcgtggccat atgggaactg aagaaagatg tttatgtcgt agaattggat 150

tggtatccgg atgcccctgg agaaatggtg gtcctcacct gtgacacccc 200

tgaagaagat ggtatcacct ggaccttgga ccagagcagt gaggtcttag 250

gctctggcaa aaccctgacc atccaagtca aagagtttgg agatgctggc 300

cagtacacct gtcacaaagg aggcgaggtt ctaagccatt cgctcctgct 350

gcttcacaaa aaggaagatg gaatttggtc cactgatatt ttaaaggacc 400

agaaagaacc caaaaataag acctttctaa gatgcgaggc caagaattat 450

tctggacgtt tcacctgctg gtggctgacg acaatcagta ctgatttgac 500

attcagtgtc aaaagcagca gaggctcttc tgacccccaa ggggtgacgt 550

gcggagctgc tacactctct gcagagagag tcagagggga caacaaggag 600

tatgagtact cagtggagtg ccaggaggac agtgcctgcc cagctgctga 650

ggagagtctg cccattgagg tcatggtgga tgccgttcac aagctcaagt 700

atgaaaacta caccagcagc ttcttcatca gggacatcat caaacctgac 750

ccacccaaga acttgcagct gaagccatta aagaattctc ggcaggtgga 800

ggtcagctgg gagtaccctg acacctggag tactccacat tcctacttct 850

ccctgacatt ctgcgttcag gtccagggca agagcaagag agaaaagaaa 900

gatagagtct tcacggacaa gacctcagcc acggtcatct gccgcaaaaa 950

tgccagcatt agcgtgcggg cccaggaccg ctactatagc tcatcttgga 1000

gcgaatgggc atctgtgccc tgcagttagg ttctgatcca ggatgaaaat 1050

ttggaggaaa agtggaagat attaagcaaa atgtttaaag acacaacgga 1100

atagacccaa aaagataatt tctatctgat ttgctttaaa acgttttttt 1150

aggatcacaa tgatatcttt gctgtatttg tatagttaga tgctaaatgc 1200

tcattgaaac aatcagctaa tttatgtata gattttccag ctctcaagtt 1250

gccatgggcc ttcatgctat ttaaatattt aagtaattta tgtatttatt 1300

agtatattac tgttatttaa cgtttgtctg ccaggatgta tggaatgttt 1350

catactctta tgacctgatc catcaggatc agtccctatt atgcaaaatg 1400

tgaatttaat tttatttgta ctgacaactt ttcaagcaag gctgcaagta 1450

catcagtttt atgacaatca ggaagaatgc agtgttctga taccagtgcc 1500

atcatacact tgtgatggat gggaacgcaa gagatactta catggaaacc 1550

tgacaatgca aacctgttga gaagatccag gagaacaaga tgctagttcc 1600

catgtctgtg aagacttcct ggagatggtg ttgataaagc aatttagggc 1650

cacttacact tctaagcaag tttaatcttt ggatgcctga attttaaaag 1700

ggctagaaaa aaatgattga ccagcctggg aaacataaca agaccccgtc 1750

tctacaaaaa aaatttaaaa ttagccaggc gtggtggctc atgcttgtgg 1800

tcccagctgt tcaggaggat gaggcaggag gatctcttga gcccaggagg 1850

tcaaggctat ggtgagccgt gattgtgcca ctgcatacca gcctaggtga 1900

cagaatgaga ccctgtctca aaaaaaaaaa tgattgaaat taaaattcag 1950

ctttagcttc catggcagtc ctcaccccca cctctctaaa agacacagga 2000

ggatgacaca gaaacaccgt aagtgtctgg aaggcaaaaa gatcttaaga 2050

ttcaagagag aggacaagta gttatggcta aggacatgaa attgtcagaa 2100

tggcaggtgg cttcttaaca gccctgtgag aagcagacag atgcaaagaa 2150

aatctggaat ccctttctca ttagcatgaa tgaacctgat acacaattat 2200

gaccagaaaa tatggctcca tgaaggtgct acttttaagt aatgtatgtg 2250

cgctctgtaa agtgattaca tttgtttcct gtttgtttat ttatttattt 2300

atttttgcat tctgaggctg aactaataaa aactcttctt tgtaatc 2347

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

<400> 4

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

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

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

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

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

Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys
80 85 90

His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His
95 100 105

Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln
110 115 120

Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn
125 130 135

Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr
140 145 150

Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro
155 160 165

Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val
170 175 180

Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu
185 190 195

Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val
200 205 210

Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser
215 220 225

Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
230 235 240

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
320 325

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

<400> 5
attctctccc cagcttgctg agccctttgc tcccctggcg actgcctgga 50

cagtcagcaa ggaattgtct cccagtgcat tttgccctcc tggctgccaa 100

ctctggctgc taaagcggct gccacctgct gcagtctaca cagcttcggg 150

aagaggaaag gaacctcaga ccttccagat cgcttcctct cgcaacaaac 200

tatttgtcgc aggaataaag atggctgctg aaccagtaga agacaattgc 250

atcaactttg tggcaatgaa atttattgac aatacgcttt actttatagc 300

tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggcaag cttgaatcta 350

aattatcagt cataagaaat ttgaatgacc aagttctctt cattgaccaa 400

ggaaatcggc ctctatttga agatatgact gattctgact gtagagataa 450

tgcaccccgg accatattta ttataagtat gtataaagat agccagccta 500

gaggtatggc tgtaactatc tctgtgaagt gtgagaaaat ttcaactctc 550

tcctgtgaga acaaaattat ttcctttaag gaaatgaatc ctcctgataa 600

catcaaggat acaaaaagtg acatcatatt ctttcagaga agtgtcccag 650

gacatgataa taagatgcaa tttgaatctt catcatacga aggatacttt 700

ctagcttgtg aaaaagagag agacctttt aaactcattt tgaaaaaaga 750

ggatgaattg ggggatagat ctataatgtt cactgttcaa aacgaagact 800

agctattaaa atttcatgcc gggcgcagtg gctcacgcct gtaatcccag 850

ccctttggga ggctgaggcg ggcagatcac cagaggtcag gtgttcaaga 900

ccagcctgac caacatggtg aaacctcatc tctactaaaa atacaaaaaa 950

ttagctgagt gtagtgacgc atgccctcaa tcccagctac tcaagaggct 1000

gaggcaggag aatcacttgc actccggagg tagaggttgt ggtgagccga 1050

gattgcacca ttgcgctcta gcctgggcaa caacagcaaa actccatctc 1100

aaaaaataaa ataaataaat aaacaaataa aaaattcata atgtg 1145

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

<400> 6

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

Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp
80 85 90

Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu
95 100 105

Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys
110 115 120

Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile
125 130 135

Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln
140 145 150

Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys
155 160 165

Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
170 175 180

Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
185 190

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

<400> 7
cgaccaggtt ctccttcccc agtcaccagt tgctcgagtt agaattgtct 50

gcaatggccg ccctgcagaa atctgtgagc tctttcctta tggggaccct 100

ggccaccagc tgcctccttc tcttggccct cttggtacag ggaggagcag 150

ctgcgcccat cagctcccac tgcaggcttg acaagtccaa cttccagcag 200

ccctatatca ccaaccgcac cttcatgctg gctaaggagg ctagcttggc 250

tgataacaac acagacgttc gtctcattgg ggagaaactg ttccacggag 300

tcagtatgag tgagcgctgc tatctgatga agcaggtgct gaacttcacc 350

cttgaagaag tgctgttccc tcaatctgat aggttccagc cttatatgca 400

ggaggtggtg cccttcctgg ccaggctcag caacaggcta agcacatgtc 450

atattgaagg tgatgacctg catatccaga ggaatgtgca aaagctgaag 500

gacacagtga aaaagcttgg agagagtgga gagatcaaag caattggaga 550

actggatttg ctgtttatgt ctctgagaaa tgcctgcatt tgaccagagc 600

aaagctgaaa aatgaataac taacccccct tccctgctag aaataacaat 650

tagatgcccc aaagcgattt tttttaacca aaaggaagat gggaagccaa 700

actccatcat gatgggtgga ttccaaatga acccctgcgt tagttacaaa 750

ggaaaccaat gccacttttg tttataagac cagaaggtag actttctaag 800

catagatatt tattgataac atttcattgt aactggtgtt ctatacacag 850

aaaacaattt atttttaaa taattgtctt tttccataaa aaagattact 900

ttccattcct ttaggggaaa aaacccctaa atagcttcat gtttccataa 950

tcagtacttt atatttataa atgtatttat tattattata agactgcatt 1000

ttatttatat cattttatta atatggattt atttatagaa acatcattcg 1050

atattgctac ttgagtgtaa ggctaatatt gatatttatg acaataatta 1100

tagagctata acatgtttat ttgacctcaa taaacacttg gatatcc 1147

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

<400> 8

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

<210> 9
<211> 1049
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
aaaacaacag gaagcagctt acaaactcgg tgaacaactg agggaaccaa 50

accagagacg cgctgaacag agagaatcag gctcaaagca agtggaagtg 100

ggcagagatt ccaccaggac tggtgcaagg cgcagagcca gccagatttg 150

agaagaaggc aaaaagatgc tggggagcag agctgtaatg ctgctgttgc 200

tgctgccctg gacagctcag ggcagagctg tgcctggggg cagcagccct 250

gcctggactc agtgccagca gctttcacag aagctctgca cactggcctg 300

gagtgcacat ccactagtgg gacacatgga tctaagagaa gagggagatg 350

aagagactac aaatgatgtt ccccatatcc agtgtggaga tggctgtgac 400

ccccaaggac tcagggacaa cagtcagttc tgcttgcaaa ggatccacca 450

gggtctgatt ttttatgaga agctgctagg atcggatatt ttcacagggg 500

agccttctct gctccctgat agccctgtgg gccagcttca tgcctcccta 550

ctgggcctca gccaactcct gcagcctgag ggtcaccact gggagactca 600

gcagattcca agcctcagtc ccagccagcc atggcagcgt ctccttctcc 650

gcttcaaaat ccttcgcagc ctccaggcct ttgtggctgt agccgcccgg 700

gtctttgccc atggagcagc aaccctgagt ccctaaaggc agcagctcaa 750

ggatggcact cagatctcca tggcccagca aggccaagat aaatctacca 800

ccccaggcac ctgtgagcca acaggttaat tagtccatta attttagtgg 850

gacctgcata tgttgaaaat taccaatact gactgacatg tgatgctgac 900

ctatgataag gttgagtatt tattagatgg gaagggaaat ttggggatta 950

tttatcctcc tggggacagt ttggggagga ttatttattg tatttatatt 1000

gaattatgta ctttttttcaa taaagtctta tttttgtggc taaaaaaaa 1049

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

<400> 10

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

Thr Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp
20 25 30

Thr Gln Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp
35 40 45

Ser Ala His Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly
50 55 60

Asp Glu Glu Thr Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp
65 70 75

Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu

80 85 90

Gln Arg Ile His Gln Gly Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly
95 100 105

Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro
110 115 120

Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu
125 130 135

Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr Gln Gln Ile Pro Ser Leu
140 145 150

Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu Leu Arg Phe Lys Ile
155 160 165

Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala Ala Arg Val Phe
170 175 180

Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
185

<210> 11
<211> 808
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
gatataaagc tcctacagct acctggcctg agaagccaac tcagactcag 50

ccaacagaga ttgttgattt gcctcttaag caagagattc attgcagctc 100

agcatggctc agaccagctc atacttcatg ctgatctcct gcctgatgtt 150

tctgtctcag agccaaggcc aagaggccca gacagagttg ccccaggccc 200

ggatcagctg cccagaaggc accaatgcct atcgctccta ctgctactac 250

tttaatgaag accgtgagac ctgggttgat gcagatctct attgccagaa 300

catgaattcg ggcaacctgg tgtctgtgct cacccaggcc gagggtgcct 350

ttgtggcctc actgattaag gagagtggca ctgatgactt caatgtctgg 400

attggcctcc atgaccccaa aaagaaccgc cgctggcact ggagcagtgg 450

gtccctggtc tcctacaagt cctggggcat tggagcccca agcagtgtta 500

atcctggcta ctgtgtgagc ctgacctcaa gcacaggatt ccagaaatgg 550

aaggatgtgc cttgtgaaga caagttctcc tttgtctgca agttcaaaaa 600

ctagaggcaa ctggaaaata catgtctaga actgatccag caattacaac 650

ggagtcaaaa attaaaccgg accatctctc caactcaact caacctggac 700

actctcttct ctgctgagtt tgccttgtta atcttcaata gttttaccta 750

ccccagtctt tggaacccta aataataaaa ataaacatgt ttccactatt 800

gtgctgtc 808

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

<400> 12
Met Ala Gln Thr Ser Ser Tyr Phe Met Leu Ile Ser Cys Leu Met
1 5 10 15

Phe Leu Ser Gln Ser Gln Gly Gln Glu Ala Gln Thr Glu Leu Pro
20 25 30

Gln Ala Arg Ile Ser Cys Pro Glu Gly Thr Asn Ala Tyr Arg Ser
35 40 45

Tyr Cys Tyr Tyr Phe Asn Glu Asp Arg Glu Thr Trp Val Asp Ala
50 55 60

Asp Leu Tyr Cys Gln Asn Met Asn Ser Gly Asn Leu Val Ser Val
65 70 75

Leu Thr Gln Ala Glu Gly Ala Phe Val Ala Ser Leu Ile Lys Glu
80 85 90

Ser Gly Thr Asp Asp Phe Asn Val Trp Ile Gly Leu His Asp Pro
95 100 105

Lys Lys Asn Arg Arg Trp His Trp Ser Ser Gly Ser Leu Val Ser
110 115 120

Tyr Lys Ser Trp Gly Ile Gly Ala Pro Ser Ser Val Asn Pro Gly
125 130 135

Tyr Cys Val Ser Leu Thr Ser Ser Thr Gly Phe Gln Lys Trp Lys
140 145 150

Asp Val Pro Cys Glu Asp Lys Phe Ser Phe Val Cys Lys Phe Lys
155 160 165

Asn

<210> 13
<211> 773
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
aagccacctc aagtggacaa ggcacttacc aacagagatt gctgatttgc 50

tccttaagca agagattcac tgccgctaag catggctcag accaactcgt 100

tcttcatgct gatctcctcc ctgatgttcc tgtctctgag ccaaggccag 150

gagtcccaga cagagctgcc taatccccga atcagctgcc cagaaggcac 200

caatgcctat cgctcctact gctactactt taatgaagac cctgagacct 250

gggttgatgc agatctctat tgccagaaca tgaattcagg caacctggtg 300

tctgtgctca cccaggcgga gggtgccttc gtggcctcac tgattaagga 350

gagtagcact gatgacagca atgtctggat tggcctccat gacccaaaaa 400

agaaccgccg ctggcactgg agtagtgggt ccctggtctc ctacaagtcc 450

tgggacactg gatccccgag cagtgctaat gctggctact gtgcaagcct 500

gacttcatgc tcaggattca agaaatggaa ggatgaatct tgtgagaaga 550

agttctcctt tgtttgcaag ttcaaaaact agaggaagct gaaaaatgga 600

tgtctagaac tggtcctgca attactatga agtcaaaaat taaactagac 650

tatgtctcca actcagttca gaccatctcc tccctaatga gtttgcatcg 700

ctgatcttca gtaccttcac ctgtctcagt ctctagagcc ctgaaaaata 750

aaaacaaact tatttttatc cag 773

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

<400> 14

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

Asn

<210> 15
<211> 807
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
aaaccatacc atatcccacc agagagtgac tcctgattgc ctcctcaagt 50

cgcagacact atgctgcctc ccatggccct gcccagtgta tcttggatgc 100

tgctttcctg cctcatgctg ctgtctcagg ttcaaggtga agaaccccag 150

agggaactgc cctctgcacg gatccgctgt cccaaaggct ccaaggccta 200

tggctcccac tgctatgcct tgtttttgtc accaaaatcc tggacagatg 250

cagatctggc ctgccagaag cggccctctg gaaacctggt gtctgtgctc 300

agtggggctg agggatcctt cgtgtcctcc ctggtgaaga gcattggtaa 350

cagctactca tacgtctgga ttgggctcca tgaccccaca cagggcaccg 400

agcccaatgg agaaggttgg gagtggagta gcagtgatgt gatgaattac 450

tttgcatggg agagaaatcc ctccaccatc tcaagccccg gccactgtgc 500

gagcctgtcg agaagcacag catttctgag gtggaaagat tataactgta 550

atgtgaggtt accctatgtc tgcaagttca ctgactagtg caggagggaa 600

gtcagcagcc tgtgtttggt gtgcaactca tcatgggcat gagaccagtg 650

tgaggactca ccctggaaga gaatattcgc ttaattcccc caacctgacc 700

acctcattct tatctttctt ctgtttcttc ctccccgctg tcatttcagt 750

ctcttcattt tgtcatacgg cctaaggctt taaagagcaa taaaattttt 800

agtctgc 807

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

<400> 16
Met Leu Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu
1 5 10 15

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

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

Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser
50 55 60

Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Asn
65 70 75

Leu Val Ser Val Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser
80 85 90

Leu Val Lys Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly
95 100 105

Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly Trp
110 115 120

Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Arg
125 130 135

Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His Cys Ala Ser Leu Ser
140 145 150

Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val
155 160 165

Arg Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Thr Asp
170 175

<210> 17
<211> 784
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
aaaccatacc atatcccacc agagagtcgc agacactatg ctgcctccca 50

tggccctgcc cagtgtatct tggatgctgc tttcctgcct catgctgctg 100

tctcaggttc aaggtgaaga accccagagg gaactgccct ctgcacggat 150

ccgctgtccc aaaggctcca aggcctatgg ctcccactgc tatgccttgt 200

ttttgtcacc aaaatcctgg acagatgcag atctggcctg ccagaagcgg 250

ccctctggaa acctggtgtc tgtgctcagt ggggctgagg gatccttcgt 300

gtcctccctg gtgaagagca ttggtaacag ctactcatac gtctggattg 350

ggctccatga ccccacacag ggcaccgagc ccaatggaga aggttgggag 400

tggagtagca gtgatgtgat gaattacttt gcatgggaga gaaatccctc 450

caccatctca agccccggcc actgtgcgag cctgtcgaga agcacagcat 500

ttctgaggtg gaaagattat aactgtaatg tgaggttacc ctatgtctgc 550

aagttcactg actagtgcag gagggaagtc agcagcctgt gtttggtgtg 600

caactcatca tgggcatgag accagtgtga ggactcaccc tggaagagaa 650

tattcgctta attcccccaa cctgaccacc tcattcttat ctttcttctg 700

tttcttcctc cccgctgtca tttcagtctc ttcattttgt catacggcct 750

aaggctttaa agagcaataa aatttttagt ctgc 784

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

<400> 18
Met Leu Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu
1 5 10 15

Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln Val Gln Gly Glu Glu Pro Gln

20 25 30

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

Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser
50 55 60

Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Asn
65 70 75

Leu Val Ser Val Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser
80 85 90

Leu Val Lys Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly
95 100 105

Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly Trp
110 115 120

Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Arg
125 130 135

Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His Cys Ala Ser Leu Ser
140 145 150

Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val
155 160 165

Arg Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Thr Asp
170 175

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

<400> 19
gggagggtcc cttcctcagg gagcacagga actctgagac tcagcaaggg 50

tgtcctggga gggctcgggg atgggagagt acacagattc acaactcatt 100

cagaactgta gaagatgatg gatgtgacca agatcacttt agtcctaggg 150

gactagagaa ggaaaatgac atgaggcagt ggggtatctg tgtgttctcc 200

cactgaccac gctttcttta gtgactcctg attgcctcct caagtcgcag 250

acactatgct gcctcccatg gccctgccca gtgtatcttg gatgctgctt 300

tcctgcctca tgctgctgtc tcaggttcaa ggtgaagaac cccagaggga 350

actgccctct gcacggatcc gctgtcccaa aggctccaag gcctatggct 400

cccactgcta tgccttgttt ttgtcaccaa aatcctggac agatgcagat 450

ctggcctgcc agaagcggcc ctctggaaac ctggtgtctg tgctcagtgg 500

ggctgaggga tccttcgtgt cctccctggt gaagagcatt ggtaacagct 550

actcatacgt ctggattggg ctccatgacc ccacacaggg caccgagccc 600

aatggagaag gttgggagtg gagtagcagt gatgtgatga attactttgc 650

atgggagaga aatccctcca ccatctcaag ccccggccac tgtgcgagcc 700

tgtcgagaag cacagcattt ctgaggtgga aagattataa ctgtaatgtg 750

aggttaccct atgtctgcaa gttcactgac tagtgcagga gggaagtcag 800

cagcctgtgt ttggtgtgca actcatcatg ggcatgagac cagtgtgagg 850

actcaccctg gaagagaata ttcgcttaat tcccccaacc tgaccacctc 900

attcttatct ttcttctgtt tcttcctccc cgctgtcatt tcagtctctt 950

cattttgtca tacggcctaa ggctttaaag agcaataaaa tttttagtct 1000

gc 1002

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

<400> 20

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

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

<400> 21
ccatccctga gatcttttta taaaaaaccc agtctttgct gaccagacaa 50

agcataccag atctcaccag agagtcgcag acactatgct gcctcccatg 100

gccctgccca gtgtgtcctg gatgctgctt tcctgcctca ttctcctgtg 150

tcaggttcaa ggtgaagaaa cccagaagga actgccctct ccacggatca 200

gctgtcccaa aggctccaag gcctatggct ccccctgcta tgccttgttt 250

ttgtcaccaa aatcctggat ggatgcagat ctggcttgcc agaagcggcc 300

ctctggaaaa ctggtgtctg tgctcagtgg ggctgaggga tccttcgtgt 350

cctccctggt gaggagcatt agtaacagct attcatacat ctggattggg 400

ctccatgacc ccacacaggg ctctgagcct gatggagatg gatgggagtg 450

gagtagcact gatgtgatga attactttgc atgggagaaa aatccctcca 500

ccatcttaaa ccctggccac tgtgggagcc tgtcaagaag cacaggattt 550

ctgaagtgga aagattataa ctgtgatgca aagttaccct atgtctgcaa 600

gttcaaggac tagggcaggt gggaagtcag cagcctgagc ttggcgtgca 650

gctcatcatg gacatgagac cagtgtgaag actcaccctg gaagagaata 700

ttctccccaa actgccctac ctgactacct tgtcatgatc ctccttcttt 750

ttccttttttc ttcaccttca tttcaggctt ttctctgtct tccatgtctt 800

gagatctcag agaataataa taaaaatgtt actttatact taaaaaa 847

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

<400> 22
Met Leu Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu
1 5 10 15

Ser Cys Leu Ile Leu Leu Cys Gln Val Gln Gly Glu Glu Thr Gln
20 25 30

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

Ala Tyr Gly Ser Pro Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser
50 55 60

Trp Met Asp Ala Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Lys
65 70 75

Leu Val Ser Val Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser
80 85 90

Leu Val Arg Ser Ile Ser Asn Ser Tyr Ser Tyr Ile Trp Ile Gly
95 100 105

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

Glu Trp Ser Ser Thr Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Lys
125 130 135

Asn Pro Ser Thr Ile Leu Asn Pro Gly His Cys Gly Ser Leu Ser
140 145 150

Arg Ser Thr Gly Phe Leu Lys Trp Lys Asp Tyr Asn Cys Asp Ala
155 160 165

Lys Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Lys Asp
170 175

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

<400> 23
ccatccctga gatcttttta taaaaaaccc agtctttgct gaccagacaa 50

agcataccag atctcaccag agagtcctag gggactacag aaggaaaaag 100

acaagaggca gtaggatatc tgtgtgtcct cccgctgacc acacttcctt 150

tagtgacccg attgcctcct caagtcgcag acactatgct gcctcccatg 200

gccctgccca gtgtgtcctg gatgctgctt tcctgcctca ttctcctgtg 250

tcaggttcaa ggtgaagaaa cccagaagga actgccctct ccacggatca 300

gctgtcccaa aggctccaag gcctatggct ccccctgcta tgccttgttt 350

ttgtcaccaa aatcctggat ggatgcagat ctggcttgcc agaagcggcc 400

ctctggaaaa ctggtgtctg tgctcagtgg ggctgaggga tccttcgtgt 450

cctccctggt gaggagcatt agtaacagct attcatacat ctggattggg 500

ctccatgacc ccacacaggg ctctgagcct gatggagatg gatgggagtg 550

gagtagcact gatgtgatga attactttgc atgggagaaa aatccctcca 600

ccatcttaaa ccctggccac tgtgggagcc tgtcaagaag cacaggattt 650

ctgaagtgga aagattataa ctgtgatgca aagttaccct atgtctgcaa 700

gttcaaggac tagggcaggt gggaagtcag cagcctgagc ttggcgtgca 750

gctcatcatg gacatgagac cagtgtgaag actcaccctg gaagagaata 800

ttctccccaa actgccctac ctgactacct tgtcatgatc ctccttcttt 850

ttccttttc ttcaccttca tttcaggctt ttctctgtct tccatgtctt 900

gagatctcag agaataataa taaaaatgtt actttatacg taaaaaa 947

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

<400> 24
Met Leu Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu
1 5 10 15

Ser Cys Leu Ile Leu Leu Cys Gln Val Gln Gly Glu Glu Thr Gln
20 25 30

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

Ala Tyr Gly Ser Pro Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser
50 55 60

Trp Met Asp Ala Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Lys
65 70 75

Leu Val Ser Val Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser
80 85 90

Leu Val Arg Ser Ile Ser Asn Ser Tyr Ser Tyr Ile Trp Ile Gly
95 100 105

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

Glu Trp Ser Ser Thr Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Lys
125 130 135

Asn Pro Ser Thr Ile Leu Asn Pro Gly His Cys Gly Ser Leu Ser
140 145 150

Arg Ser Thr Gly Phe Leu Lys Trp Lys Asp Tyr Asn Cys Asp Ala
155 160 165

Lys Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Lys Asp
170 175

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

<400> 25
ataagacttt tatggatgga ttgtttttct caaataatat tatcgctttg 50

tgactaaagt aaagattatt aattcctgag gcaagaagat ataaaagctc 100

cagaaacgtt gactgggacc actggagaca ctgaagaagg caggggccct 150

tagagtcttg gttgccaaac agatttgcag atcaaggaga acccaggagt 200

ttcaaagaag cgctagtaag gtctctgaga tccttgcact agctacatcc 250

tcagggtagg aggaagatgg cttccagaag catgcggctg ctcctattgc 300

tgagctgcct ggccaaaaca ggagtcctgg gtgatatcat catgagaccc 350

agctgtgctc ctggatggtt ttaccacaag tccaattgct atggttactt 400

caggaagctg aggaactggt ctgatgccga gctcgagtgt cagtcttacg 450

gaaacggagc ccacctggca tctatcctga gtttaaagga agccagcacc 500

atagcagagt acataagtgg ctatcagaga agccagccga tatggattgg 550

cctgcacgac ccacagaaga ggcagcagtg gcagtggatt gatggggcca 600

tgtatctgta cagatcctgg tctggcaagt ccatgggtgg gaacaagcac 650

tgtgctgaga tgagctccaa taacaacttt ttaacttgga gcagcaacga 700

atgcaacaag cgccaacact tcctgtgcaa gtaccgacca tagagcaaga 750

atcaagattc tgctaactcc tgcacagccc cgtcctcttc ctttctgcta 800

gcctggctaa atctgctcat tatttcagag gggaaaccta gcaaactaag 850

agtgataagg gccctactac actggctttt ttaggcttag agacagaaac 900

tttagcattg gcccagtagt ggcttctagc tctaaatgtt tgccccgcca 950

tccctttcca cagtatcctt cttccctcct cccctgtctc tggctgtctc 1000

gagcagtcta gaagagtgca tctccagcct atgaaacagc tgggtctttg 1050

gccataagaa gtaaagattt gaagacagaa ggaagaaact caggagtaag 1100

cttctagacc ccttcagctt ctacaccctt ctgccctctc tccattgcct 1150

gcaccccacc ccagccactc aactcctgct tgtttttcct ttggccatag 1200

gaaggtttac cagtagaatc cttgctaggt tgatgtgggc catacattcc 1250

tttaataaac cattgtgtac ataagaaaaa aaaaa 1285

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

<400> 26

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

Lys Ser Met Gly Gly Asn Lys His Cys Ala Glu Met Ser Ser Asn
125 130 135

Asn Asn Phe Leu Thr Trp Ser Ser Asn Glu Cys Asn Lys Arg Gln
140 145 150

His Phe Leu Cys Lys Tyr Arg Pro
155

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

<400> 27
ccaagaacga tagtcaattc cagaaaccgc tatgaagttc ctctctgcaa 50

gagacttcca tccagttgcc ttcttgggac tgatgctggt gacaaccacg 100

gccttcccta cttcacaagt ccggagagga gacttcacag aggataccac 150

tcccaacaga cctgtctata ccacttcaca agtcggaggc ttaattacac 200

atgttctctg ggaaatcgtg gaaatgagaa aagagttgtg caatggcaat 250

tctgattgta tgaacaacga tgatgcactt gcagaaaaca atctgaaact 300

tccagagata caaagaaatg atggatgcta ccaaactgga tataatcagg 350

aaatttgcct attgaaaatt tcctctggtc ttctggagta ccatagctac 400

ctggagtaca tgaagaacaa cttaaaagat aacaagaaag acaaagccag 450

agtccttcag agagatacag aaactctaat tcatatcttc aaccaagagg 500

taaaagattt acataaaata gtccttccta ccccaatttc caatgctctc 550

ctaacagata agctggagtc acagaaggag tggctaagga ccaagaccat 600

ccaattcatc ttgaaatcac ttgaagaatt tctaaaagtc actttgagat 650

ctactcggca aacctagtgc gttatgccta agcatatcag tttgtggaca 700

ttcctcactg tggtcagaaa atatatcctg ttgtcaggta tctgacttat 750

gttgttctct acgaagaact gacaatatga atgttgggac actattttaa 800

ttatttttaa tttattgata atttaaataa gtaaacttta agttaattta 850

tgattgatat ttattatttt tatgaagtgt cacttgaaat gttatatgtt 900

atagttttga aatgataacc taaaaatcta tttgatataa atattctgtt 950

acctagccag atggtttctt ggaatgtata agtttacctc aatgaattgc 1000

taatttaaat atgtttttaa agaaatcttt gtgatgtatt tttataatgt 1050

ttagactgtc ttcaaacaaa taaattatat tatattt 1087

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

<400> 28
Met Lys Phe Leu Ser Ala Arg Asp Phe His Pro Val Ala Phe Leu
1 5 10 15

Gly Leu Met Leu Val Thr Thr Thr Ala Phe Pro Thr Ser Gln Val
20 25 30

Arg Arg Gly Asp Phe Thr Glu Asp Thr Thr Pro Asn Arg Pro Val
35 40 45

Tyr Thr Thr Ser Gln Val Gly Gly Leu Ile Thr His Val Leu Trp
50 55 60

Glu Ile Val Glu Met Arg Lys Glu Leu Cys Asn Gly Asn Ser Asp
65 70 75

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

Pro Glu Ile Gln Arg Asn Asp Gly Cys Tyr Gln Thr Gly Tyr Asn
95 100 105

Gln Glu Ile Cys Leu Leu Lys Ile Ser Ser Gly Leu Leu Glu Tyr
110 115 120

His Ser Tyr Leu Glu Tyr Met Lys Asn Asn Leu Lys Asp Asn Lys
125 130 135

Lys Asp Lys Ala Arg Val Leu Gln Arg Asp Thr Glu Thr Leu Ile
140 145 150

His Ile Phe Asn Gln Glu Val Lys Asp Leu His Lys Ile Val Leu
155 160 165

Pro Thr Pro Ile Ser Asn Ala Leu Leu Thr Asp Lys Leu Glu Ser
170 175 180

Gln Lys Glu Trp Leu Arg Thr Lys Thr Ile Gln Phe Ile Leu Lys
185 190 195

Ser Leu Glu Glu Phe Leu Lys Val Thr Leu Arg Ser Thr Arg Gln
200 205 210

Thr

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

<400> 29
agaaggaaca gtgggtgtcc aggcacatca gaccaggcag ctcgcagcaa 50

agcaaggtaa gttctctcct cttccctgtc gctaactccc tgcatctaga 100

ggctgtccag attcagactc caggggacag gctacccctg aaccaggcag 150

cgtgggagtg ggatgtgtcc tcagaagcta accatctcct ggtttgccat 200

cgttttgctg gtgtctccac tcatggccat gtgggagctg gagaaagacg 250

tttatgttgt agaggtggac tggactcccg atgcccctgg agaaacagtg 300

aacctcacct gtgacacgcc tgaagaagat gacatcacct ggacctcaga 350

ccagagacat ggagtcatag gctctggaaa gaccctgacc atcactgtca 400

aagagtttct agatgctggc cagtacacct gccacaaagg aggcgagact 450

ctgagccact cacatctgct gctccacaag aaggaaaatg gaatttggtc 500

cactgaaatt ttaaaaaatt tcaaaaacaa gactttcctg aagtgtgaag 550

caccaaatta ctccggacgg ttcacgtgct catggctggt gcaaagaaac 600

atggacttga agttcaacat caagagcagt agcagttccc ctgactctcg 650

ggcagtgaca tgtggaatgg cgtctctgtc tgcagagaag gtcacactgg 700

accaaaggga ctatgagaag tattcagtgt cctgccagga ggatgtcacc 750

tgcccaactg ccgaggagac cctgcccatt gaactggcgt tggaagcacg 800

gcagcagaat aaatatgaga actacagcac cagcttcttc atcagggaca 850

tcatcaaacc agacccgccc aagaacttgc agatgaagcc tttgaagaac 900

tcacaggtgg aggtcagctg ggagtaccct gactcctgga gcactcccca 950

ttcctacttc tccctcaagt tctttgttcg aatccagcgc aagaaagaaa 1000

agatgaagga gacagaggag gggtgtaacc agaaaggtgc gttcctcgta 1050

gagaagacat ctaccgaagt ccaatgcaaa ggcgggaatg tctgcgtgca 1100

agctcaggat cgctattaca attcctcatg cagcaagtgg gcatgtgttc 1150

cctgcagggt ccgatcctag gatgcaacgt tggaaaggaa agaaaagtgg 1200

aagacattaa ggaagaaaaa tttaaactca ggatggaaga gtcccccaaa 1250

agctgtcttc tgcttggttg gctttttcca gttttcctaa gttcatcatg 1300

acacctttgc tgatttctac atgtaaatgt taaatgcccg cagagccagg 1350

gagctaatgt atgcatagat attctagcat tccacttggc cttatgctgt 1400

tgaaatattt aagtaattta tgtatttatt aatttatttc tgcatttcac 1450

atttgtatac caagatgtat tgaatatttc atgtgctcgt ggcctgatcc 1500

actgggacca ggccctatta tgcaaattgt gagcttgtta tcttcttcaa 1550

cagctcttca atcagggctg cgtaggtaca ttagcttttg tgacaaccaa 1600

taagaacata atattctgac acaagcagtg ttacatattt gtgaccagta 1650

aagacatagg tggtatttgg agacatgaag aagctgtaaa gttgactctg 1700

aagagtttag cactagtttc aacaccaaga aagacttttt agaagtgata 1750

ttgataagaa accagggcct tctttagaag ggtacctaaa tttaaaagaa 1800

ttttgaaagg ctgggtatcg gtggtatatg cttttaattc cagcactcag 1850

gagaccaagg caggcagatc tctgtgagtt tgaggacagc ctggtgtaca 1900

gagggagttc cagcacagcc agtgccacac agaaattctg tctcaaaaac 1950

a 1951

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

<400> 30

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

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

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

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

Thr Ser Asp Gln Arg His Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Leu
             65                  70                  75

Thr Ile Thr Val Lys Glu Phe Leu Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys
             80                  85                  90

His Lys Gly Gly Glu Thr Leu Ser His Ser His Leu Leu Leu His
             95                 100                 105

Lys Lys Glu Asn Gly Ile Trp Ser Thr Glu Ile Leu Lys Asn Phe
            110                 115                 120

Lys Asn Lys Thr Phe Leu Lys Cys Glu Ala Pro Asn Tyr Ser Gly
            125                 130                 135

Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln Arg Asn Met Asp Leu Lys
            140                 145                 150

Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Ser Pro Asp Ser Arg Ala Val
            155                 160                 165

Thr Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys Val Thr Leu Asp
            170                 175                 180

Gln Arg Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln Glu Asp Val
            185                 190                 195

Thr Cys Pro Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu Ala Leu
            200                 205                 210

Glu Ala Arg Gln Gln Asn Lys Tyr Glu Asn Tyr Ser Thr Ser Phe
            215                 220                 225

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

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

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

Phe Val Arg Ile Gln Arg Lys Lys Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu
275 280 285

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

Thr Glu Val Gln Cys Lys Gly Gly Asn Val Cys Val Gln Ala Gln
305 310 315

Asp Arg Tyr Tyr Asn Ser Ser Cys Ser Lys Trp Ala Cys Val Pro
320 325 330

Cys Arg Val Arg Ser
335

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

<400> 31
ggcacagctg gacctggtgg gggttctctg tggttccatg ctttctggac 50

tcctgcctgc tggctggagc tgctgacagg cctgacatct tctgcaacct 100

ccagcatcag gacaaagaaa gccgcctcaa accttccaaa tcacttcctc 150

ttggcccagg aacaatggct gccatgtcag aagactcttg cgtcaacttc 200

aaggaaatga tgtttattga caacacgctt tactttatac ctgaagaaaa 250

tggagacctg gaatcagaca actttggccg acttcactgt acaaccgcag 300

taatacggaa tataaatgac caagttctct tcgttgacaa aagacagcct 350

gtgttcgagg atatgactga tattgatcaa agtgccagtg aaccccagac 400

cagactgata atatacatgt acaaagacag tgaagtaaga ggactggctg 450

tgaccctctc tgtgaaggat agtaaaatgt ctaccctctc ctgtaagaac 500

aagatcattt cctttgagga aatggatcca cctgaaaata ttgatgatat 550

acaaagtgat ctcatattct ttcagaaacg tgttccagga cacaacaaga 600

tggagtttga atcttcactg tatgaaggac actttcttgc ttgccaaaag 650

gaagatgatg ctttcaaact cattctgaaa aaaaaggatg aaaatgggga 700

taaatctgta atgttcactc tcactaactt acatcaaagt taggtgggga 750

gggtttgtgt tccagaaaga tgattagcac acatgcgcct tgtgatgacc 800

tcgcctgtat ttccataaca gaatacccga ggctgcatga tttatagagt 850

aaacacgttt atttgt 866

<210> 32
<211> 192

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 32

```
Met Ala Ala Met Ser Glu Asp Ser Cys Val Asn Phe Lys Glu Met
  1               5                  10                  15

Met Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Pro Glu Glu Asn Gly
             20                  25                  30

Asp Leu Glu Ser Asp Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala
             35                  40                  45

Val Ile Arg Asn Ile Asn Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg
             50                  55                  60

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser
             65                  70                  75

Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu
             80                  85                  90

Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser Val Lys Asp Ser Lys Met
             95                 100                 105

Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met
            110                 115                 120

Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser Asp Leu Ile Phe
            125                 130                 135

Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu Phe Glu Ser
            140                 145                 150

Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu Asp Asp
            155                 160                 165

Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp Lys
            170                 175                 180

Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
            185                 190
```

<210> 33
<211> 1121
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 33

```
cctaaacagg ctctcctctc acttatcaac tgttgacact tgtgcgatct 50

ctgatggctg tcctgcagaa atctatgagt ttttccctta tggggacttt 100

ggccgccagc tgcctgcttc tcattgccct gtgggcccag gaggcaaatg 150

cgctgcccgt caacacccgg tgcaagcttg aggtgtccaa cttccagcag 200

ccgtacatcg tcaaccgcac ctttatgctg gccaaggagg ccagccttgc 250

agataacaac acagacgtcc ggctcatcgg ggagaaactg ttccgaggag 300

tcagtgctaa agatcagtgc tacctgatga agcaggtgct caacttcacc 350
```

ctggaagacg ttctgctccc ccagtcagac aggttccagc cctacatgca 400

ggaggtggta cctttcctga ccaaactcag caatcagctc agctcctgtc 450

acatcagcgg tgacgaccag aacatccaga agaatgtcag aaggctgaag 500

gagacagtga aaaagcttgg agagagtgga gagatcaagg cgattgggga 550

actggacctg ctgtttatgt ctctgagaaa tgcttgcgtc tgagcgagaa 600

gaagctagaa aacgaagaac tgctccttcc tgccttctaa aaagaacaat 650

aagatccctg aatggacttt tttactaaag gaaagtgaga agctaacgtc 700

catcatcatt agaagatttc acatgaaacc tggctcagtt gaaaaagaaa 750

atagtgtcaa gttgtccatg agaccagagg tagacttgat aaccacaaag 800

attcattgac aatattttat tgtcactgat gatacaacag aaaaataatg 850

tactttaaaa aattgtttga aaggaggtta cctctcattc ctttagaaaa 900

aaagcttatg taacttcatt tccatatcca atattttata tatgtaagtt 950

tatttattat aagtatacat tttatttatg tcagtttatt aatatggatt 1000

tatttataga aacattatct gctattgata tttagtataa ggcaaataat 1050

atttatgaca ataactatgg aaacaagata tcttaggctt taataaacac 1100

atggatatca taaaaaaaaa a 1121

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

<400> 34

```
Met Ala Val Leu Gln Lys Ser Met Ser Phe Ser Leu Met Gly Thr
  1               5                  10                  15

Leu Ala Ala Ser Cys Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Ala Gln Glu
             20                  25                  30

Ala Asn Ala Leu Pro Val Asn Thr Arg Cys Lys Leu Glu Val Ser
             35                  40                  45

Asn Phe Gln Gln Pro Tyr Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala
             50                  55                  60

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

Gly Glu Lys Leu Phe Arg Gly Val Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr
             80                  85                  90

Leu Met Lys Gln Val Leu Asn Phe Thr Leu Glu Asp Val Leu Leu
             95                 100                 105

Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro
            110                 115                 120

Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln Leu Ser Ser Cys His Ile Ser
```

125 130 135

Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn Val Arg Arg Leu Lys Glu
140 145 150

Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile Lys Ala Ile Gly
155 160 165

Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala Cys Val
170 175

<210> 35
<211> 1359
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 35
cgcttagaag tcggactaca gagttagact cagaaccaaa ggaggtggat 50

aggggtcca caggcctggt gcagatcaca gagccagcca gatctgagaa 100

gcagggaaca agatgctgga ttgcagagca gtaataatgc tatggctgtt 150

gccctgggtc actcagggcc tggctgtgcc taggagtagc agtcctgact 200

gggctcagtg ccagcagctc tctcggaatc tctgcatgct agcctggaac 250

gcacatgcac cagcgggaca tatgaatcta ctaagagaag aagaggatga 300

agagactaaa aataatgtgc cccgtatcca gtgtgaagat ggttgtgacc 350

cacaaggact caaggacaac agccagttct gcttgcaaag gatccgccaa 400

ggtctggctt tttataagca cctgcttgac tctgacatct tcaaagggga 450

gcctgctcta ctccctgata gccccatgga gcaacttcac acctccctac 500

taggactcag ccaactcctc cagccagagg atcacccccg ggagacccaa 550

cagatgccca gcctgagttc tagtcagcag tggcagcgcc cccttctccg 600

ttccaagatc cttcgaagcc tccaggcctt tttggccata gctgcccggg 650

tctttgccca cggagcagca actctgactg agcccttagt gccaacagct 700

taaggatgcc caggttccca tggctaccat gataagacta atctatcagc 750

ccagacatct accagttaat taacccatta ggacttgtgc tgttcttgtt 800

ttgtttgttt tgcgtgaagg gcaaggacac cattattaaa gagaaaagaa 850

acaaacccca gagcaggcag ctggctagag aaaggagctg gagaagaaga 900

ataaagtctc gagcccttgg ccttggaagc gggcaagcag ctgcgtggcc 950

tgaggggaag ggggcggtgg catcgagaaa ctgtgagaaa acccagagca 1000

tcagaaaaag tgagcccagg ctttggccat tatctgtaag aaaaacaaga 1050

aaaggggaac attatacttt cctgggtggc tcagggaaat gtgcagatgc 1100

acagtactcc agacagcagc tctgtacctg cctgctctgt ccctcagttc 1150

taacagaatc tagtcactaa gaactaacag gactaccaat acgaactgac 1200

aaatactacc actatgacct gtgacaaagc tgcatattta ttaagtggga 1250

agggaacttt tgatattatt tatccttgta acagtataga tgatggttat 1300

ttattctatt tataaggaat tatgtatttt ttttttcaat aaagatttat 1350

ttatgtggc 1359

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

<400> 36

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

Ala

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

<400> 37
acaccatcca gatctctgga agacagacaa gatgctgcct ccaacagcct 50

gctccgtcat gtcctggatg ctgctctcct gcctgatgct cttatctcag 100

gttcaaggtg aagactccct gaagaatata ccctccgcac gcattagttg 150

ccccaagggc tcccaggctt atggctccta ctgctatgcc ttgtttcaga 200

taccacagac ctggtttgat gcagaactgg cctgccaaaa gaggcctgga 250

ggacacctcg tatctgtgct caatagcgct gaggcttcat tcttgtcctc 300

catggtgaag agaacaggaa acagctacca atacacttgg attgggctcc 350

atgaccccac tctgggtgca gaacccaatg gaggtggatg ggaatggagt 400

aacaatgacg tgatgaatta ctttaactgg gagaggaacc catctactgc 450

cttagaccgt gctttctgtg gcagcttgtc aagagcttct ggatttctaa 500

aatggagaga tatgacatgt gaggtgaagt tgccctatgt ctgcaaattt 550

actggttaaa cttatcagac agcaaacatc ccgaatttgt cttgaagagc 600

atcatggaca agggacaaaa tgtgaagact cacctagaaa aagcattttc 650

tatctacagt ccacattaga gccttaatct gctctttcca tatctgtctt 700

tagtccttt ggtataagtt tgggctcaat tctaaaataa aaataagctt 750

tctgtcaca 759

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

<400> 38
Met Leu Pro Pro Thr Ala Cys Ser Val Met Ser Trp Met Leu Leu
1 5 10 15

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

Lys Asn Ile Pro Ser Ala Arg Ile Ser Cys Pro Lys Gly Ser Gln
35 40 45

Ala Tyr Gly Ser Tyr Cys Tyr Ala Leu Phe Gln Ile Pro Gln Thr
50 55 60

Trp Phe Asp Ala Glu Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Gly Gly His
65 70 75

Leu Val Ser Val Leu Asn Ser Ala Glu Ala Ser Phe Leu Ser Ser
80 85 90

Met Val Lys Arg Thr Gly Asn Ser Tyr Gln Tyr Thr Trp Ile Gly
95 100 105

Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Ala Glu Pro Asn Gly Gly Gly Trp
110 115 120

Glu Trp Ser Asn Asn Asp Val Met Asn Tyr Phe Asn Trp Glu Arg
125 130 135

Asn Pro Ser Thr Ala Leu Asp Arg Ala Phe Cys Gly Ser Leu Ser
140 145 150

Arg Ala Ser Gly Phe Leu Lys Trp Arg Asp Met Thr Cys Glu Val
155 160 165

Lys Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Thr Gly
170 175

<210> 39
<211> 769
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 39
aagacacctt ggtctcagcc tgcagagatc gttgagttgc atcctaagca 50

aaagactgtc tgctgctcag catggctagg aacgcctact tcatcctgct 100

ctcatgcctg atcgtcctgt ctccaagcca aggccaggaa gctgaagaag 150

acctgccatc tgccaggatc agttgcccag aaggttccaa tgcctacagc 200

tcctattgtt actacttcac tgaagaccgt ttaacttggg ctgatgcaga 250

tctttttttgc cagaacatga attcaggcta cctggtgtca gttctcagtc 300

aggctgaggg caactttgtg gcctctctga ttaaggagag tggcactaca 350

gacgccaatg tctggactgg actccatgat cccaaaagga atcgtcgctg 400

gcactggagc agtgggtctc tgtttctcta caaatcctgg gcaactgggt 450

ctcctaacag ttccaatcgt ggctactgtg tatctctgac ttcaaacaca 500

ggatacaaga aatggaagga tgacaactgt gatgcccaat actcatttgt 550

ctgcaagttc aaaggctgaa gtcacctgaa aaaaaatagt catataaagc 600

aaaattgaaa ttactatagt gtcagaaatt aaattggacc atctatcaaa 650

agcaaattag atcctgtctt cctggagaga cattcttgct tcactgtcct 700

atggtacctg tatctccatt attttctgga aatttgcaca actgaaataa 750

aaacaccttt acaatgttg 769

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

<400> 40
Met Ala Arg Asn Ala Tyr Phe Ile Leu Leu Ser Cys Leu Ile Val
1 5 10 15

Leu Ser Pro Ser Gln Gly Gln Glu Ala Glu Glu Asp Leu Pro Ser
20 25 30

Ala Arg Ile Ser Cys Pro Glu Gly Ser Asn Ala Tyr Ser Ser Tyr

35 40 45

Cys Tyr Tyr Phe Thr Glu Asp Arg Leu Thr Trp Ala Asp Ala Asp
50 55 60

Leu Phe Cys Gln Asn Met Asn Ser Gly Tyr Leu Val Ser Val Leu
65 70 75

Ser Gln Ala Glu Gly Asn Phe Val Ala Ser Leu Ile Lys Glu Ser
80 85 90

Gly Thr Thr Asp Ala Asn Val Trp Thr Gly Leu His Asp Pro Lys
95 100 105

Arg Asn Arg Arg Trp His Trp Ser Ser Gly Ser Leu Phe Leu Tyr
110 115 120

Lys Ser Trp Ala Thr Gly Ser Pro Asn Ser Ser Asn Arg Gly Tyr
125 130 135

Cys Val Ser Leu Thr Ser Asn Thr Gly Tyr Lys Lys Trp Lys Asp
140 145 150

Asp Asn Cys Asp Ala Gln Tyr Ser Phe Val Cys Lys Phe Lys Gly
155 160 165

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

<400> 41
agtattcatt attcctagct gacagaaatt attgatttag aatttaaatc 50

gaagactgtc tgctgatcag catggctcag aacaatgtat accttatcct 100

gttcttatgc ctgatgttcc tgtcatacag ccaaggccag gtagctgaag 150

aagacttccc cttggctgaa aaagaccttc cttctgccaa aatcaactgc 200

ccagagggtg ccaacgccta tggttcctac tgttattatc taattgaaga 250

ccgtttgacc tgggggggagg ctgatctctt ttgccagaac atgaatgcag 300

gtcacctggt gtcaatactc agccaggctg agagcaactt tgtggcctcg 350

ctggttaagg agagtggtac tacagcttcc aatgtctgga ctggacttca 400

tgaccctaaa agtaaccgtc gttggcactg gagcagtggc tccctatttc 450

tcttcaagtc atgggccact ggagctccaa gcactgccaa ccgtggttat 500

tgtgtatcgc tgacttcaaa cacagcatac aaaaaatgga aggacgaaaa 550

ctgtgaggca cagtactcct ttgtctgcaa gttcagagcc taaagtcacc 600

tgaagaacag atgtgcagaa ctctgttact atatattata aatgaaagaa 650

gaccatctat ctgcaaaata aatactcttt cctgtaataa ct 692

<210> 42
<211> 173
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Met Ala Gln Asn Asn Val Tyr Leu Ile Leu Phe Leu Cys Leu Met
1 5 10 15

Phe Leu Ser Tyr Ser Gln Gly Gln Val Ala Glu Glu Asp Phe Pro
20 25 30

Leu Ala Glu Lys Asp Leu Pro Ser Ala Lys Ile Asn Cys Pro Glu
35 40 45

Gly Ala Asn Ala Tyr Gly Ser Tyr Cys Tyr Tyr Leu Ile Glu Asp
50 55 60

Arg Leu Thr Trp Gly Glu Ala Asp Leu Phe Cys Gln Asn Met Asn
65 70 75

Ala Gly His Leu Val Ser Ile Leu Ser Gln Ala Glu Ser Asn Phe
80 85 90

Val Ala Ser Leu Val Lys Glu Ser Gly Thr Thr Ala Ser Asn Val
95 100 105

Trp Thr Gly Leu His Asp Pro Lys Ser Asn Arg Arg Trp His Trp
110 115 120

Ser Ser Gly Ser Leu Phe Leu Phe Lys Ser Trp Ala Thr Gly Ala
125 130 135

Pro Ser Thr Ala Asn Arg Gly Tyr Cys Val Ser Leu Thr Ser Asn
140 145 150

Thr Ala Tyr Lys Lys Trp Lys Asp Glu Asn Cys Glu Ala Gln Tyr
155 160 165

Ser Phe Val Cys Lys Phe Arg Ala
170

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

<400> 43

gcccttcctt caaatcctat cataaagcag tcacctttgt cctgacaaac 50

catctcagat ctctacaaga gagacaagat gctgcctcac ctggtcctca 100

acagtatttc ctggatgctg ctctcctgcc tgttgtttgt atttcaggta 150

caaggtgaag acttccagaa ggaagtgccc tctccacgta ccagctgccc 200

catgggttac aaggcttatc gctcccactg ctatgcctta gttatgacac 250

ctaaatcctg gtttcaagca gatctggtct gccagaagag accctcagga 300

catctcgtgt ctattcttag tggaggtgag gcttcctttg tgtcctcctt 350

ggtgaacggc agagtggaca actaccaaga catctggatt gggctccatg 400

atccaacaat gggtcaacaa cccaatggag gtggatggga gtggagtaac 450

tccgatgtgc tgaattatct taactgggat ggggatcctt cctctactgt 500

caaccgtggt cactgtggga gtctgacagc aagttcaggg tttctgaagt 550

ggggagacta ttactgcgat gggacattac catttgtctg caagttcaag 600

cagtagacaa gcagcatcca gcatttatca tgaagctccc catgacaagg 650

gatgaaatac aagaattcac ccggcaaggc tgtacttgct ttacagttgt 700

gcatcagact tattctggtt ttctgtcctc tttcatccat ctccttcccc 750

ttacttcagg cttttcaata tagttcctgc tttgcaatct tgcagataaa 800

taataaatac aacattttgg ttttactttt gtgtttt 837

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

<400> 44

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

<210> 45
<211> 788
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 45
cccggggcga aatcacctct gagctgtcaa agcattgcag acctctgtat 50

agacagatat accatggtgt ctcacaagac ccttcatagc atgtcctgga 100

tgctactgtg ttgcctgatg tccctttctt gggtacaagg ggaacaatcc 150

cagaaaaaac tgtcttctcc acgcatcagc tgtccccaag aagcccaagc 200

ttatggctcc tattgctatt tactgattct ggaaccacag acctgggcta 250

atgcagagat ccactgccag aagcatttct caggacacct ggcatttctg 300

ctcacttatg gggaaattat ctttgtgtcc tctctggtga aaaacagttt 350

gaccacattc ccatacatct ggattggact ccatgatctg tcacttggga 400

gtttgcccaa tgaaaatgga tggaagtgga gcagctctga ccctctgacc 450

ttctataact gggagatccc accctccatg tctgcacacc acggttactg 500

cgcagctttg tctcaggcct caggttatca gaagtggaga gattattatt 550

gtgacccaac atttccctat gtctgcaaat tcaagggtta ggccagttct 600

gatttcaact gcctgaaagt atcctgaaga tcacatagac aaaggagcga 650

gcatgatggc tcaccaagaa agtccttctc acaccccgac accgaattcc 700

tcatctcatc tctgctgttc ttccataagt gtattctctg gggactctgg 750

cctaaggatt cggagaacta taataaaatt tagtcaat 788

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

<400> 46

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

Lys Trp Ser Ser Ser Asp Pro Leu Thr Phe Tyr Asn Trp Glu Ile
125 130 135

Pro Pro Ser Met Ser Ala His His Gly Tyr Cys Ala Ala Leu Ser
140 145 150

Gln Ala Ser Gly Tyr Gln Lys Trp Arg Asp Tyr Tyr Cys Asp Pro
155 160 165

Thr Phe Pro Tyr Val Cys Lys Phe Lys Gly
170 175

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

<400> 47
ccgactcaag ctgaaaaagg cagggttctc ggagtgttgc ttccaatcag 50

attgcaggtc taggagaatc cacaaaaaag agaagaaaag aaaagaaaaa 100

aactggaacg ggctctgagg gccttgaaat caaagcattg aagtatcatc 150

tccatcgaaa gaggaagatg gcttacaaag gcgtgcggct actcttactg 200

ctgagctggg tagctggccc cgaagtcctg agcgatatct tgagacccag 250

ctgtgcccca ggatggtttt actataggtc ccactgctat ggatacttcc 300

ggaagctaag aaactggtct catgctgagc tggagtgtca gtcatatgga 350

aatggatccc atctggcatc tgtcttgaat caaaaggaag ccagtgtcat 400

atcaaagtac ataactggct atcagagaaa cctgcctgtg tggattggcc 450

tgcatgaccc acaaaagaag caattatggc agtggactga tgggtctaca 500

aacctgtaca gacgctggaa tcccaggaca aagagtgaag ccaggcattg 550

cgctgagatg aaccccaagg ataaattctt aacttggaac aaaaatggat 600

gtgccaaccg ccaacacttc ctgtgcaagt ataagacata gagcaaaaat 650

caagcgtcta ccagccttgc acaaactctt cccacttccc tctcacctgg 700

tggctgatct aatcattatc ccagagtaaa cactgtagca aacattgagg 750

aggcctccag ggcactggct atcaagccct gcttagcatg gtgggacagt 800

ggcttccggt ctcagagttt agcatggtgg gacggtgact tccggtctca 850

gagattagca tggtgggaca agggcttctg gtctccgtgt tcactctaca 900

atcctttctg gtactcccct tccctctcat tgtcttaaac agcaatgctt 950

aacaagctag aaatgtgctt tcttgactac tgcgtctctg tcaaaccagt 1000

aaagttttgg agccaagaaa cagc 1024

<210> 48
<211> 157
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

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

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

Pro Gly Trp Phe Tyr Tyr Arg Ser His Cys Tyr Gly Tyr Phe Arg
             35                  40                  45

Lys Leu Arg Asn Trp Ser His Ala Glu Leu Glu Cys Gln Ser Tyr
             50                  55                  60

Gly Asn Gly Ser His Leu Ala Ser Val Leu Asn Gln Lys Glu Ala
             65                  70                  75

Ser Val Ile Ser Lys Tyr Ile Thr Gly Tyr Gln Arg Asn Leu Pro
             80                  85                  90

Val Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Lys Gln Leu Trp Gln
             95                 100                 105

Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Leu Tyr Arg Arg Trp Asn Pro Arg
            110                 115                 120

Thr Lys Ser Glu Ala Arg His Cys Ala Glu Met Asn Pro Lys Asp
            125                 130                 135

Lys Phe Leu Thr Trp Asn Lys Asn Gly Cys Ala Asn Arg Gln His
            140                 145                 150

Phe Leu Cys Lys Tyr Lys Thr
            155
```

<210> 49
<211>
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 49

```
1   atgacaccac ctgaacgtct cttcctccca agggtgtgtg gcaccaccct acacctcctc
61  cttctggggc tgctgctggt tctgctgcct ggggcccagg ggctccctgg tgttggcctc
121 acaccttcag ctgcccagac tgcccgtcag caccccaaga tgcatcttgc ccacagcacc
181 ctcaaacctg ctgctcacct cattggagac cccagcaagc agaactcact gctctggaga
241 gcaaacacgg accgtgcctt cctccaggat ggtttctcct tgagcaacaa ttctctcctg
301 gtccccacca gtggcatcta cttcgtctac tcccaggtgg tcttctctgg gaaagcctac
361 tctcccaagg ccacctcctc cccactctac ctggcccatg aggtccagct cttctcctcc
421 cagtaccccct tccatgtgcc tctcctcagc tcccagaaga tggtgtatcc agggctgcag
481 gaaccctggc tgcactcgat gtaccacggg gctgcgttcc agctcaccca gggagaccag
541 ctatccaccc acacagatgg catcccccac ctagtcctca gccctagtac tgtcttcttt
601 ggagccttcg ctctgtag
```

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

<400> 50

```
MTPPERLFLPRVCGTTLHLLLLGLLLVLLPGAQGLPGVGLTPSAAQTARQHPKMHLAHSTLKPAAHLIGDPSK
QNSLLWRANTDRAFLQDGFSLSNNSLLVPTSGIYFVYSQVVFSGKAYSPKATSSPLYLAHEVQLFSSQYPFHV
```

PLLSSQKMVYPGLQEPWLHSMYHGAAFQLTQGDQLSTHTDGIPHLVLSPSTVFFGAFAL

<210> 51
<211>
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 51

```
1   atgggggcac tggggctgga gggcaggggt gggaggctcc aggggagggg ttccctcctg
61  ctagctgtgg caggagccac ttctctggtg accttgttgc tggcggtgcc tatcactgtc
121 ctggctgtgc tggccttagt gccccaggat cagggaggac tggtaacgga gacggccgac
181 cccggggcac aggcccagca aggactgggg tttcagaagc tgccagagga ggagccagaa
241 acagatctca gccccgggct cccagctgcc cacctcatag gcgctccgct gaaggggcag
301 gggctaggct gggagacgac gaaggaacag gcgtttctga cgagcgggac gcagttctcg
361 gacgccgagg ggctggcgct cccgcaggac ggcctctatt acctctactg tctcgtcggc
421 taccggggcc gggcgccccc tggcggcggg gacccccagg gccgctcggt cacgctgcgc
481 agctctctgt accgggcggg gggcgcctac gggccgggca ctcccgagct gctgctcgag
541 ggcgccgaga cggtgactcc agtgctggac ccggccagga gacaagggta cgggcctctc
601 tggtacacga gcgtggggtt cggcggcctg gtgcagctcc ggaggggcga gagggtgtac
661 gtcaacatca gtcaccccga tatggtggac ttcgcgagag ggaagacctt ctttggggcc
721 gtgatggtgg ggtga
```

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

<400> 52

MGALGLEGRGGRLQGRGSLLLAVAGATSLVTLLLAVPITVLAVLALVPQDQGGLVTETADPGAQAQQGLGFQKLPEEEPETDL
SPGLPAAHLIGAPLKGQGLGWETTKEQAFLTSGTQFSDAEGLALPQDGLYYLYCLVGYRGRAPPGGGDPQGRSVTLRSSLYRA
GGAYGPGTPELLLEGAETVTPVLDPARRQGYGPLWYTSVGFGGLVQLRRGERVYVNISHPDMVDFARGKTFFGAVMVG

<210> 53
<211>
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 53

```
1   atgacactgc tcggccgtct ccacctcttg agggtgcttg gcacccctcc tgtcttcctc
61  ctggggctgc tgctggccct gcctctaggg gcccagggac tctctggtgt ccgcttctcc
121 gctgccagga cagcccatcc actccctcag aagcacttga cccatggcat cctgaaacct
181 gctgctcacc ttgttgggta ccccagcaag cagaactcac tgctctggag agcaagcacg
241 gatcgtgcct ttctccgaca tggcttctct ttgagcaaca actcctcct gatccccacc
301 agtggcctct actttgtcta ctcccaggtg gttttctctg gagaaagctg ctcccccagg
361 gccattccca ctcccatcta cctggcacac gaggtccagc tcttttcctc ccaatacccc
421 ttccatgtgc ctctcctcag tgcgcagaag tctgtgtatc cgggacttca aggaccgtgg
481 gtgcgctcaa tgtaccaggg ggctgtgttc ctgctcagta agggagacca gctgtccacc
541 cacaccgacg gcatctccca tctacacttc agccccagca gtgtattctt tggagccttt
601 gcactgtag
```

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

<400> 54

MTLLGRLHLL RVLGTPPVFL LGLLLALPLG AQGLSGVRFS AARTAHPLPQ KHLTHGILKPAAHLVGYPSK
QNSLLWRAST DRAFLRHGFS LSNNSLLIPT SGLYFVYSQV VFSGESCSPRAIPTPIYLAH EVQLFSSQYP
FHVPLLSAQK SVYPGLQGPW VRSMYQGAVF LLSKGDQLSTHTDGISHLHF SPSSVFFGAFAL

<210> 55
<211>
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 55

```
  1 atgacactgc tcggccgtct ccacctcttg agggtgcttg gcacccctcc tgtcttcctc
 61 ctggggctgc tgctggccct gcctctaggg gcccagggac tctctggtgt ccgcttctcc
121 gctgccagga cagcccatcc actccctcag aagcacttga cccatggcat cctgaaacct
181 gctgctcacc ttgttgggta ccccagcaag cagaactcac tgctctggag agcaagcacg
241 gatcgtgcct ttctccgaca tggcttctct ttgagcaaca actccctcct gatccccacc
301 agtggcctct actttgtcta ctcccaggtg gttttctctg gagaaagctg ctcccccagg
361 gccattccca ctcccatcta cctggcacac gaggtccagc tcttttcctc ccaatacccc
421 ttccatgtgc ctctcctcag tgcgcagaag tctgtgtatc cgggacttca aggaccgtgg
481 gtgcgctcaa tgtaccaggg ggctgtgttc ctgctcagta agggagacca gctgtccacc
541 cacaccgacg gcatctccca tctacacttc agccccagca gtgtattctt tggagccttt
601 gcactgtag
```

<210> 56
<211>
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 56

```
MGTRGLQGLG GRPQGRGCLL LAVAGATSLV TLLLAVPITV LAVLALVPQD QGRRVEKIIGSGAQAQKRLD
DSKPSCILPS PSSLSETPDP RLHPQRSNAS RNLASTSQGP VAQSSREASAWMTILSPAAD STPDPGVQQL
PKGEPETDLN PELPAAHLIG AWMSGQGLSW EASQEEAFLRSGAQFSPTHG LALPQDGVYY LYCHVGYRGR
TPPAGRSRAR SLTLRSALYR AGGAYGRGSPELLLEGAETV TPVVDPIGYG SLWYTSVGFG GLAQLRSGER
VYVNISHPDM VDYRRGKTFF GAVMVG
```

<210> 57
<211>
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 57

```
ATGCTCCTGCCTTGGGCCACCTCTGCCCCCGGCCTGGCCTGGGGGCCTCTGGTGCTGGGCCTCTTCGGGCTCCTGGCAGC
ATCGCAGCCCCAGGCGGTGCCTCCATATGCGTCGGAGAACCAGACCTGCAGGGACCAGGAAAAGGAATACTATGAGCCCC
AGCACCGCATCTGCTGCTCCCGCTGCCCGCCAGGCACCTATGTCTCAGCTAAATGTAGCCGCATCCGGGACACAGTTTGT
GCCACATGTGCCGAGAATTCCTACAACGAGCACTGGAACTACCTGACCATCTGCCAGCTGTGCCGCCCCTGTGACCCAGT
GATGGGCCTCGAGGAGATTGCCCCCTGCACAAGCAAACGGAAGACCCAGTGCCGCTGCCAGCCGGGAATGTTCTGTGCTG
CCTGGGCCCTCGAGTGTACACACTGCGAGCTACTTTCTGACTGCCCGCCTGGCACTGAAGCCGAGCTCAAAGATGAAGTT
GGGAAGGGTAACAACCACTGCGTCCCCTGCAAGGCAGGGCACTTCCAGAATACCTCCTCCCCCAGCGCCCGCTGCCAGCC
CCACACCAGGTGTGAGAACCAAGGTCTGGTGGAGGCAGCTCCAGGCACTGCCCAGTCCGACACAACCTGCAAAAATCCAT
TAGAGCCACTGCCCCCAGAGATGTCAGGAGGG
```

<210> 58
<211>
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 58

```
CGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCACTATACTCTGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG
TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
```

TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAT

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

<400> 59

ATGCGCCTGCCCCGGGCCTCCTCTCCCTGCGGCCTGGCCTGGGGGCCACTCCTGCTGGGACTCAGCGGGCTTCTGGTGGC
CTCTCAGCCCCAGCTGGTGCCCCCTTATCGCATAGAAAACCAGACTTGCTGGGACCAGGACAAGGAATACTACGAGCCCA
TGCACGACGTCTGCTGCTCCCGCTGTCCCCCAGGCGAGTTTGTCTTTGCGGTATGCAGCCGCAGCCAAGACACGGTTTGC
AAGACTTGCCCCCATAATTCCTATAATGAACACTGGAACCATCTCTCCACCTGCCAGCTGTGCCGCCCCTGTGACATTGT
GCTGGGCTTTGAGGAGGTTGCCCCTTGCACCAGCGATCGGAAAGCCGAGTGCCGCTGTCAGCCGGGGATGTCCTGTGTGT
ATCTGGACAATGAGTGTGTGCACTGTGAGGAGGAGCGGCTTGTACTCTGCCAGCCTGGCACAGAAGCCGAGGTCACAGAT
GAAATTATGGATACTGACGTCAACTGTGTCCCCTGTAAGCCGGGACACTTCCAGAACACTTCCTCCCCTCGAGCCCGCTG
TCAACCCCATACCAGATGTGAGATCCAGGGCCTGGTGGAGGCAGCTCCAGGTACCTCCTACTCGGATACCATCTGTAAAA

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

<400> 60

CTCGAGGACCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATC
TTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGA
TGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATT
ACGACAGTACTCTACGCGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAG
GTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATA
TGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAG
ACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGT
TCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAGTGGTCCA
CGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGAAAGCTTGGCCGCCATGGCCC

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

<400> 61

MKHQHQHQHQHQMHQAQTARQHPK-
MHLAHSTLKPAAHLIGDPSKQNSLLWRANTDRAFLQDGFSLSNNSLLVPTSGIYFVYSQVVFSGKAYSPKATSSPLYLAHE
VQLFSSQYPFHVPLLSSQKMVYPGLQEPWLHSMYHGAAFQLTQGDQLSTHTDGIPHLVLSPSTVFFGAFAL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-063303- -00000-0000

Fecha: 2010-05-26 16:30:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 323

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- 1 ☒ Indicación que se solicita una PCT
- 92 ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- 256 ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- 2 ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpor diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	10 063303
	Solicitud internacional	PCT/US2008/082890
	Fecha inicio fase nacional	07/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	NO 08938

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continua en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 16 JUL. 2010.
adpa11

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5 , 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.

REFERENCIA		
	Radicación No.	10 063303
	Solicitud internacional	PCT/US2008/082890
	Fecha inicio fase nacional	07/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	№ 08939

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del titulo primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 16 JUL. 2010.
adpa11