

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 828 739**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2007 E 17169315 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3252079**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a la proteína tirosina fosfatasa beta humana (HPTP-beta) y sus usos**

30 Prioridad:

07.04.2006 US 790506 P

09.05.2006 US 798896 P

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

27.05.2021

73 Titular/es:

AERPIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

9987 Carver Road, Suite 420

Cincinnati, OH 45242, US

72 Inventor/es:

ROTELLO, ROCCO JAMIE;

PETERS, KEVIN y

DAVIS, MICHAEL GLENN

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 828 739 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que se unen a la proteína tirosina fosfatasa beta humana (HPTP-beta) y sus usos

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a anticuerpos y a fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a la proteína tirosina fosfatasa beta humana (HPTPbeta) y sus usos.

10 Antecedentes de la invención

La angiogénesis, el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente, juega un papel importante en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos (Nguyen, LL y otros, *Int. Rev. Cytol.*, 204, 1-48, (2001)). La angiogénesis es un proceso complejo, mediado por la comunicación entre las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos y su entorno circundante. En las primeras etapas de la angiogénesis, las células del tejido o tumorales producen y secretan factores de crecimiento proangiogénicos en respuesta a estímulos ambientales como la hipoxia. Estos factores se difunden a las células endoteliales cercanas y estimulan los receptores que conducen a la producción y secreción de proteasas que degradan la matriz extracelular circundante. Las células endoteliales activadas comienzan a migrar y proliferar en el tejido circundante hacia la fuente de estos factores de crecimiento (Bussolino, F., *Trends Biochem. Sci.*, 22, 251-256, (1997)). Las células endoteliales dejan de proliferar y se diferencian en estructuras tubulares, que es el primer paso en la formación de vasos sanguíneos maduros y estables. Posteriormente, las células periendotheliales, como los pericitos y las células del músculo liso, se incorporan al vaso recién formado en un paso adicional hacia la maduración del vaso.

25 La angiogénesis está regulada por un equilibrio de factores proangiogénicos y anti-angiogénicos que ocurren naturalmente. El factor de crecimiento del endotelio vascular, el factor de crecimiento de fibroblastos y la angiopoyetina representan algunos de los muchos factores de crecimiento proangiogénicos potenciales. Estos ligandos se unen a sus respectivos receptores tirosina quinasa en la superficie de la célula endotelial y transducen señales que promueven la migración y proliferación celular. Si bien se han identificado muchos factores reguladores, los mecanismos moleculares que impulsan este proceso aún no se comprenden completamente.

Hay muchos estados patológicos provocados por una angiogénesis persistente no regulada o regulada incorrectamente. En tales estados de enfermedad, la angiogénesis no regulada o regulada incorrectamente puede causar una enfermedad particular o exacerbar una condición patológica existente. Por ejemplo, la neovascularización ocular se ha implicado como la causa más común de ceguera y subyace en la patología de aproximadamente 20 enfermedades oculares. En ciertas condiciones previamente existentes, como la artritis, los vasos sanguíneos capilares recién formados invaden las articulaciones y destruyen el cartílago. En la diabetes, los nuevos capilares formados en la retina invaden el humor vítreo, provocando hemorragia y ceguera.

40 Tanto el crecimiento como la metástasis de los tumores sólidos también pueden ser dependientes de la angiogénesis, Folkman y otros "Tumor Angiogenesis", Capítulo 10, 206-32, en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn y otros, Editorial, W.B. Saunders, (1995). Se demostró que los tumores que se agrandan a más de 2 mm de diámetro deben obtener su propio suministro de sangre y lo hacen induciendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos capilares. Después de que estos nuevos vasos sanguíneos se incrustan en el tumor, proporcionan nutrientes y factores de crecimiento esenciales para el crecimiento del tumor, así como un medio para que las células tumorales entren en la circulación y hagan metástasis en sitios distantes, como el hígado, los pulmones o los huesos (Weidner, *New Eng. J. Med.*, 324, 1, 1-8 (1991)). Cuando se usan como fármacos en animales portadores de tumores, los inhibidores naturales de la angiogénesis pueden prevenir el crecimiento de tumores pequeños (O'Reilly y otros, *Cell*, 79, 315-28 (1994)). En algunos protocolos, la aplicación de tales inhibidores conduce a la regresión y latencia del tumor incluso después de la interrupción del tratamiento (O'Reilly y otros, *Cell*, 88, 277-85 (1997)). Además, el suministro de inhibidores de la angiogénesis a ciertos tumores puede potenciar su respuesta a otros regímenes terapéuticos (véase, por ejemplo, Teischer y otros, *Int. J. Cancer*, 57, 920-25 (1994)).

55 Aunque muchos estados patológicos son estimulados por la angiogénesis persistente no regulada o regulada incorrectamente, algunos estados patológicos pueden tratarse aumentando la angiogénesis. El crecimiento y la reparación de tejidos son eventos biológicos en los que se producen la proliferación celular y la angiogénesis. Por tanto, un aspecto importante de la reparación de heridas es la revascularización del tejido dañado mediante angiogénesis.

60 Las heridas crónicas que no se curan son una de las principales causas de morbilidad prolongada en la población humana anciana. Este es especialmente el caso de pacientes postrados en cama o diabéticos que desarrollan úlceras cutáneas graves que no cicatrizan. En muchos de estos casos, el retraso en la curación es el resultado de un suministro de sangre inadecuado, ya sea como resultado de una presión continua o de un bloqueo vascular. La mala circulación capilar debido a la aterosclerosis de las pequeñas arterias o la estasis venosa contribuye a la falla en la reparación del tejido dañado. Tales tejidos a menudo se infectan con microorganismos que proliferan sin ser atacados por los sistemas de defensa innatos del cuerpo que requieren tejido bien vascularizado para eliminar eficazmente los

organismos patógenos. Como resultado, la mayoría de las intervenciones terapéuticas se centran en restaurar el flujo sanguíneo a los tejidos isquémicos, lo que permite que los nutrientes y los factores inmunológicos accedan al sitio de la herida.

5 Las lesiones ateroscleróticas en vasos grandes pueden causar isquemia tisular que podría mejorarse modulando el crecimiento de vasos sanguíneos en el tejido afectado. Por ejemplo, las lesiones ateroscleróticas en las arterias coronarias pueden causar angina e infarto del miocardio que podrían prevenirse si se pudiera restaurar el flujo sanguíneo estimulando el crecimiento de arterias colaterales. De manera similar, las lesiones ateroscleróticas en las arterias grandes que irrigan las piernas pueden causar isquemia en el músculo esquelético lo cual limita la movilidad y, en algunos casos, requiere amputación, lo cual también puede prevenirse mejorando el flujo sanguíneo con la terapia angiogénica.

10 Otras enfermedades como la diabetes y la hipertensión se caracterizan por una disminución en el número y densidad de vasos sanguíneos pequeños como arteriolas y capilares. Estos vasos sanguíneos pequeños son importantes para el suministro de oxígeno y nutrientes. Una disminución en el número y la densidad de estos vasos contribuye a las consecuencias adversas de la hipertensión y la diabetes, que incluyen claudicación, úlceras isquémicas, hipertensión acelerada e insuficiencia renal. Estos trastornos comunes y muchas otras dolencias menos comunes, como la enfermedad de Burgers, podrían mejorarse aumentando el número y la densidad de los vasos sanguíneos pequeños mediante la terapia angiogénica.

15 Por tanto, existe una necesidad continua de identificar reguladores de la angiogénesis.

20 En vista de lo anterior, existe la necesidad de identificar objetivos bioquímicos en el tratamiento de trastornos mediados por angiogénesis. Sin embargo, la angiogénesis implica la acción de múltiples factores de crecimiento y sus receptores tirosina quinasa afines (RTK), Yancopoulos y otros, *Nature*, 407, 242-248, 2000). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), por ejemplo, es importante para la diferenciación de células endoteliales en nuevos vasos sanguíneos en la vasculatura embrionaria. Además, VEGF mejora el desarrollo de vasos sanguíneos en la vasculatura adulta. La administración de VEGF exógeno mejora el desarrollo de la vasculatura colateral y mejora el flujo sanguíneo a los tejidos isquémicos.

25 Hasta la fecha, se han identificado tres VEGF RTK, VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (KDR) y VEGFR3 (FLT-4). Aunque estos receptores están muy conservados, según la caracterización bioquímica y la actividad biológica, cada uno tiene funciones específicas y no superpuestas. De los tres receptores, se cree que VEGFR2 desempeña el papel predominante en la mediación de las acciones de VEGF en la vasculatura en desarrollo y durante la angiogénesis en adultos. Sin embargo, tanto VEGFR1 como VEGFR3 son necesarios para el desarrollo normal de la vasculatura embrionaria y también pueden ser importantes para la angiogénesis en tejidos adultos. Después de la unión y dimerización de VEGF, un cambio conformacional en el dominio quinasa de VEGFR2 potencia su actividad quinasa dando como resultado la "autofosforilación" del otro miembro del par en residuos de tirosina específicos. Estos eventos de autofosforilación sirven para mejorar aún más la actividad quinasa y proporcionan puntos de anclaje para la asociación de moléculas de señalización intracelular.

30 Sin embargo, la activación de una única vía angiogénica puede no ser suficiente para producir vasos persistentes y funcionales que proporcionen una perfusión adecuada al tejido isquémico. Estos hallazgos, junto con el hecho de que múltiples RTK están involucradas en el ensamblaje de la vasculatura embrionaria, indican que los objetivos bioquímicos que modulan múltiples vías angiogénicas tendrán ventajas sobre la administración de un solo factor de crecimiento.

35 Las proteínas tirosina fosfatasa (PTP) comprenden una gran familia de enzimas estrechamente relacionadas que desfosforilan proteínas que contienen residuos de fosfotirosina. La evidencia reciente sugiere que una función de las PTP es limitar la fosforilación y activación de los RTK. Por ejemplo, se demostró que HCPTPA, una proteína tirosina fosfatasa de bajo peso molecular se asocia con VEGFR2 y regula negativamente su activación en células endoteliales cultivadas y su actividad biológica en ensayos de angiogénesis (Huang y otros, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 38183-38185, 1999).

40 Además de VEGFR2, la señalización de entrada desde otro RTK. Tie-2, el receptor de las angiopoyetinas (Ang1 y Ang2), también es importante. La delección del gen Ang1 o Tie-2 en ratones puede resultar en letalidad embrionaria secundaria a anomalías en la vasculatura en desarrollo (Yancopoulos y otros, *Nature*, 407, 242-248, 2000). Además, la sobreexpresión de Ang1 en la piel aumenta la vascularización de la piel y la administración de Ang1 exógena aumenta el flujo sanguíneo al músculo esquelético isquémico (Suri y otros, *Science*, 282, 468-471, 1998). Además, la inhibición de la activación de Tie-2 inhibe la angiogénesis y limita la progresión tumoral en modelos animales de cáncer (Lin y otros, *J Clin. Invest.*, 100, 2072-2078, 1997). Además de sus actividades angiogénicas, la activación de Tie-2 mediante la administración exógena de Ang1 bloquea la fuga vascular mediada por VEGF y los efectos proinflamatorios, pero mejora sus efectos angiogénicos (Thurston y otros, *Nature Medicine*, 6, 460-463, 2000). Por lo tanto, los objetivos biológicos que modulan tanto la señalización de VEGFR2 como de Tie-2 pueden brindar terapias proangiogénicas o antiangiogénicas superiores.

Se sugirió la HPTPbeta (descrita por primera vez en Kruegar y otros, EMBO J., 9, (1990)) para modular la actividad del receptor de angiopoyetina de tipo tirosina quinasa Tie-2, por ejemplo, el documento WO00/65085). También se sugiere HPTPbeta para regular las actividades de VEGFR2, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Pub. Núm. 2004/0077065.

5 Sería conveniente desarrollar anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado, que regule selectivamente la actividad de HPTPbeta y, por lo tanto, mejore la señalización angiogénica, estimule el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis) y/o aumente el flujo sanguíneo en el tejido isquémico, o reduzca la señalización angiogénica, reduzca el crecimiento de los vasos sanguíneos y/o disminuya el flujo sanguíneo al tejido afectado. En la presente descripción se describen anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a HPTPbeta y regulan la señalización de células angiogénicas, que a su vez, regula la angiogénesis.

Resumen de la invención

15 La invención se define por las reivindicaciones. La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en oclusión venosa, retinopatía diabética, degeneración macular y desprendimiento crónico de retina, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana (HPTPβ), en donde el anticuerpo monoclonal aislado se une al dominio extracelular de HPTPβ, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo monoclonal intacto producido por la línea celular de hibridoma ATCC Núm. PTA-7580, o una forma humanizada del mismo.

También se describen anticuerpos que se unen a la proteína tirosina fosfatasa beta humana HPTPbeta y de esa manera regulan la señalización de las células angiogénicas, que a su vez, regula la angiogénesis.

25 También se describe un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo regula la señalización de células angiogénicas, que a su vez, regula la angiogénesis.

30 También se describe un anticuerpo que se une a la porción del extremo N de la proteína tirosina fosfatasa beta humana.

También se describe un anticuerpo que se une a la primera repetición FN3 de la proteína tirosina fosfatasa beta humana.

35 También se describe un anticuerpo que se une a la primera repetición FN3 de la proteína tirosina fosfatasa beta humana, en donde la primera repetición FN3 de la proteína tirosina fosfatasa beta humana tiene la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 11, o una porción de la misma.

40 También se describe un anticuerpo en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

También se describe un anticuerpo en donde el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal R15E6 (hibridoma de ratón, células de bazo de Balbc (células B) depositadas con 30 *American Type Culture Collection* (ATCC), P.O. caja 1549, Manassas, VA 20108 Estados Unidos el 04 de mayo de 2006, asignado ATCC Núm. PTA-7580).

45 También se describe un anticuerpo que tiene las mismas, o sustancialmente las mismas, características biológicas de R15E6.

También se describe un anticuerpo, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno son humanizados.

50 También se describe un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende residuos de la región de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal R15E6 y es humanizado.

También se describe un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, en donde el fragmento comprende regiones variables de cadena pesada y ligera.

55 También se describe un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, en donde el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un fragmento F(ab')₂.

60 También se describe un método para tratar un trastorno regulado por angiogénesis en un sujeto, que comprende: identificar un sujeto que necesita la regulación de la angiogénesis; y administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a HPTPbeta y regula la angiogénesis.

65 También se describe un método para tratar un trastorno regulado por angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno regulado por angiogénesis es un trastorno de angiogénesis elevada, y se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética, degeneración macular, cáncer, anemia falciforme, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástico,

5 enfermedad de Paget, oclusión de venas, oclusión de arterias, enfermedad carotídea obstructiva, uveítis/vitritis crónica, infecciones por micobacterias. Enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía del prematuro, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, infecciones que provocan retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, enfermedad de Best, miopía, fosas ópticas, enfermedad de Stargardt, pars planitis, desprendimiento crónico de retina, síndrome de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismos y complicaciones post-láser, enfermedades asociadas a rubeosis y vitreoretinopatía proliferativa.

10 También se describe un método para tratar un trastorno regulado por angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno regulado por angiogénesis es un trastorno de angiogénesis elevada, y se selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a, retinopatía diabética, degeneración macular, cáncer, artritis reumatoide, hemangiomas. Enfermedad de Osler-Weber-Rendu o telangiectasia hemorrágica hereditaria y tumores sólidos o transmitidos por la sangre.

15 También se describe un método para tratar un trastorno regulado por angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno regulado por angiogénesis es un trastorno de angiogénesis reducida, y se selecciona del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias del intestino tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, sarcoidosis, enfermedad artritis reumatoide, hemangiomas, enfermedad de Osler-Weber-Rendu o telangiectasia hemorrágica hereditaria, tumores sólidos o de transmisión sanguínea y síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

20 También se describe un método para tratar un trastorno regulado por angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno regulado por angiogénesis es un trastorno de angiogénesis reducida y se selecciona del grupo que incluye, entre otros, isquemia miocárdica o de músculo esquelético, accidente cerebrovascular, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad cerebrovascular, neuropatía diabética y cicatrización de heridas.

25 También se describe un método para tratar un trastorno regulado por angiogénesis en un sujeto, en donde el trastorno regulado por angiogénesis es un trastorno de angiogénesis reducida y se selecciona del grupo que consiste en isquemia del músculo esquelético e isquemia miocárdica, accidente cerebrovascular, enfermedad arterial coronaria, enfermedad vascular periférica, enfermedad de las arterias coronarias.

30 También se describe un método para tratar un trastorno de angiogénesis reducida en un sujeto, en donde el trastorno de angiogénesis reducida es una enfermedad vascular periférica.

35 También se describe un método para tratar un trastorno de angiogénesis reducida en un sujeto, en donde el trastorno de angiogénesis reducida es enfermedad de las arterias coronarias.

También se describe una composición farmacéutica que comprende: un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana; y un portador farmacéuticamente aceptable.

40 También se describe una composición farmacéutica que comprende: un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana, en donde el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal R15E6; y un portador farmacéuticamente aceptable.

45 También se describe una composición farmacéutica, que comprende: un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que tiene las mismas, o sustancialmente las mismas, características biológicas de R15E6; y un portador farmacéuticamente aceptable.

50 También se describe una composición farmacéutica, que comprende: un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno es humanizado; y un portador farmacéuticamente aceptable.

55 También se describe una composición farmacéutica, que comprende: un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana, en donde el anticuerpo comprende residuos de la región de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal R15E6 y es humanizado; y un portador farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de las figuras

60 Figura 1. Diseño y producción de la proteína HPTPβ ECD. (Panel A) Representación esquemática de la proteína de fusión HPTPβ de longitud completa y el dominio extracelular de HPTPβ-6His. (Panel B) Tinción de plata de la elución con imidazol de una columna de Ni-NTA cargada con sobrenadante de células HEK293 transfectadas con un vector que dirige la expresión de βECD-6His. Se detecta una única banda de alto peso molecular compatible con la proteína del dominio extracelular 6His de HPTPβ.

65 Figura 2. R15E6 reconoce HPTPβ endógena en células endoteliales. (Panel A) Los lisados de células endoteliales se inmunoprecipitan con un anticuerpo de control (carril 1), con R15E6 (carril 2) o con una mezcla de anticuerpos anti-Tie2 y anti-VEGFR2 (carril 3). Los inmunoprecipitados se resuelven mediante SDS-PAGE, se transfieren a una

membrana de PVD y se ensayan mediante transferencia western con una mezcla de anticuerpos R15E6, anti-Tie2 y anti-VEGFR2. Se observa una única banda principal de alto peso molecular consistente con HPTPβ con R15E6 (carril 2) y no con el anticuerpo de control (carril 1) o la mezcla de anti-Tie2 y anti-VEGFR2 (carril 3). (Panel B) Las células endoteliales se someten a análisis FACS con R15E6 (pico blanco) o un control sin anticuerpo primario (pico negro). El fuerte cambio en la fluorescencia indica que R15E6 se une a HPTPβ en la superficie de las células endoteliales intactas.

Figura 3. R15E6 mejora la activación del receptor Tie2 en HUVEC. La activación de Tie2 se mide en células endoteliales humanas como se describe en el Ejemplo 4. La dosis de R15E6 mejora de forma dependiente la activación de Tie2 tanto basal como inducida por Ang1.

Figura 4. R15E6 mejora la sobrevivencia de HUVEC. La sobrevivencia de las células endoteliales humanas en ausencia de suero se mide como se describe en el Ejemplo 4. De acuerdo con sus efectos sobre la activación de Tie2, la dosis de R15E6 mejora de manera dependiente la sobrevivencia de las células endoteliales tanto en condiciones basales como inducidas por Ang1 (Panel A). Además, R15E6 también mejora de manera dependiente de la dosis la sobrevivencia de las células endoteliales mediada por VEGF y FGF (paneles B y C). Un anticuerpo de control no mejora la sobrevivencia de las células endoteliales (Panel D).

Figura 5. R15E6 mejora la migración de HUVEC. La migración de células endoteliales humanas se mide como se describe en el Ejemplo 4. R15E6 mejora de forma dependiente de la dosis la migración de células endoteliales tanto basal como inducida por VEGF.

Figura 6. R15E6 mejora la morfogénesis capilar en el ensayo HUVEC/Brote en perlas La morfogénesis capilar de las células endoteliales humanas se mide en el ensayo de brote en perlas como se describe en el Ejemplo 4. R15E6 mejora la morfogénesis capilar de células endoteliales tanto basal como inducida por VEGF.

Figura 7. El análisis de transferencia western localiza el epítipo de unión de R15E6 en la repetición FN3 del extremo N del dominio extracelular de HPTPβ. (Panel A) Por análisis western, R15E6 se une a todos las mutantes de deleciones del extremo C, lo que demuestra que el epítipo de unión se ubica en las 2 repeticiones FN3 del extremo N. (Panel B) El análisis de proteínas quiméricas de ratón/humano localiza además el epítipo de unión de R15E6 en la repetición de FN3 de extremo N de HPTPβ.

Figura 8. El análisis de MSD confirma la localización del epítipo de unión de R15E6 a la repetición FN3 del extremo N del dominio extracelular de HPTPβ. (Panel A) Por análisis de MSD, R15E6 se une a todos las mutantes de deleciones del extremo C confirmando que el epítipo de unión se ubica en las 2 repeticiones FN3 del extremo N. (Panel B) El análisis de proteínas quiméricas de ratón/humano confirma además la localización del epítipo de unión de R15E6 a la repetición FN3 del extremo N de HPTPβ.

Figura 9. El análisis de MSD demuestra que el fragmento Fab R15E6 monovalente también se une a la repetición FN3 del extremo N de HPTPβ. (Panel A) De manera similar al anticuerpo R15 E6 intacto, el fragmento Fab R15E6 se une a todas las mutantes de deleción del extremo C, lo que confirma que el epítipo de unión se ubica en las 2 repeticiones FN3 del extremo N. (Panel B) El análisis de proteínas quiméricas de ratón/humano localiza además el epítipo de unión del fragmento Fab R15E6 en la repetición FN3 del extremo N de HPTPβ.

Figura 10. El fragmento Fab monovalente de R15E6 no mejora la activación de Tie2 y bloquea la activación de Tie2 por R15E6 intacto.

Figura 11. El fragmento Fab de R15E6 inhibe de forma potente la sobrevivencia de las células endoteliales. (Panel A) En comparación con un fragmento Fab de control, el fragmento Fab R15E6 inhibe de forma potente la sobrevivencia de las células endoteliales. (Panel B) El efecto inhibitorio del fragmento Fab de R15E6 se rescata por competencia con R15E6 intacto.

Figura 12. El fragmento Fab R15E6 inhibe la migración de células endoteliales mediada por VEGF.

Descripción del listado de secuencias

Cada una de las secuencias de nucleótidos y proteínas de la lista de secuencias, junto con los números de acceso de Genbank o Derwent correspondientes, cuando corresponda, y las especies de las que se deriva, se muestran en la Tabla I.

Tabla I

Descripción de la secuencia	SEQ ID NO: nucleótido, proteína	Especies	Equivalente Genbank Acc. Núm.
Dominio extracelular de HPTPbeta con etiqueta His y Gly	1, 2	Homo sapiens	

(continuación)

Descripción de la secuencia	SEQ ID NO: nucleótido, proteína	Especies	Equivalente Genbank Acc. Núm.
Dominio extracelular de HPTPbeta de longitud completa	3	Homo sapiens	X54131 NM_002837
1/2 (AA1-730, 8 FN3) 775 aa	4	Homo sapiens	
1/4 (AA1-376, 4 FN3) 421 aa	5	Homo sapiens	
1/8 (AA1-202, 2 FN3) 247 aa	6	Homo sapiens	
ECD1632 aa de longitud completa, ratón	7	Mus musculus	NM_029928
Primer FN3 humano-ratón ½	8	Quimera humano-ratón	
Segundo FN3 humano-ratón ½	9	Quimera humano-ratón	
Primeros dos FN3 humano, - Ratón ½	10	Quimera humano-ratón	
FN3 humano, primera repetición	11	Homo sapiens	

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a HPTPbeta y sus usos como se define en las reivindicaciones adjuntas.

25 Pueden usarse técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en la presente descripción. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente especificación. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en la presente descripción son las conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Pueden usarse técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéutica y tratamiento de pacientes.

35 Los siguientes términos, a no ser que se indique lo contrario, se entenderá que tienen los siguientes significados:

"Proteína" se usa en la presente descripción de manera intercambiable con péptido y polipéptido. HPTPbeta es proteína tirosina fosfatasa humana como se define en la lista de secuencias. En algunas de las modalidades, se utilizan varios fragmentos de HPTPbeta. Los homólogos, ortólogos, fragmentos, variantes y mutantes de la proteína y el gen HPTPbeta, como se describe a continuación, se consideran dentro del alcance del término "HPTPbeta".

45 Por "fragmento" se entiende una parte de la secuencia de nucleótidos o proteína. Los fragmentos pueden retener la actividad biológica de la proteína nativa. Los fragmentos de una secuencia de nucleótidos también son útiles como sondas de hibridación y cebadores o para regular la expresión de un gen, por ejemplo, ARNip antisentido o micro ARN. Se puede preparar una porción biológicamente activa aislando una porción de una de las secuencias de nucleótidos de la invención, expresando la porción codificada (por ejemplo, mediante expresión recombinante *in vitro*) y evaluando la actividad de la proteína codificada.

50 Un experto en la técnica también reconocería que los genes y proteínas de especies distintas de las enumeradas en la lista de secuencias, particularmente especies de vertebrados, pueden ser útiles. Dichas especies incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, cobayas, conejos, perros, cerdos, cabras, vacas, monos, chimpancés, ovejas, hámsteres y pez cebra. Un experto en la técnica reconocería además que utilizando sondas de las secuencias de especies conocidas, se podrían obtener ADNc o secuencias genómicas homólogas a la secuencia conocida a partir de la misma especie o de especies alternativas mediante métodos de clonación conocidos. Se contempla que tales homólogos y ortólogos sean útiles en la práctica de la invención.

60 Por "variantes" se entienden secuencias similares. Por ejemplo, las variantes conservadoras pueden incluir aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos de la invención. Las variantes alélicas de origen natural y las variantes de corte y empalme pueden identificarse mediante el uso de técnicas conocidas, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de polimorfismo de nucleótido único (SNP) y técnicas de hibridación. Para aislar ortólogos y homólogos, generalmente se utilizan condiciones de hibridación estrictas, dictadas por secuencias específicas, longitud de secuencia, contenido de guanina + citosina (GC) y otros parámetros. Las secuencias de nucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, por ejemplo, derivadas usando

mutagénesis dirigida al sitio. Las variantes pueden contener secuencias adicionales del locus genómico solas o en combinación con otras secuencias.

Las moléculas también incluyen proteínas acortadas y/o mutadas en las que se han eliminado o modificado regiones de la proteína no necesarias para la unión o señalización del ligando. De manera similar, pueden mutarse para modificar sus actividades de unión o señalización de ligando. Tales mutaciones pueden implicar mutaciones no conservadoras, deleciones o adiciones de aminoácidos o dominios proteicos. Las proteínas variantes pueden o no retener la actividad biológica. Tales variantes pueden resultar, por ejemplo, del polimorfismo genético o de la manipulación humana.

También se contemplan en la presente descripción proteínas de fusión. Mediante el uso de métodos conocidos, un experto en la técnica podría preparar proteínas de fusión de las proteínas de la invención; que, aunque diferente de la forma nativa, pueden ser útiles. Por ejemplo, la pareja de fusión puede ser una secuencia de polipéptido señal (o líder) que cotraduccionalmente o postraduccionalmente dirige el movimiento de la proteína desde su sitio de síntesis a otro sitio (por ejemplo, el líder del factor α de levadura). Alternativamente, puede añadirse para facilitar la purificación o identificación de la proteína de la invención (por ejemplo, poli-His, péptido Flag o proteínas fluorescentes).

El término "antígeno" se refiere a una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse a un agente de unión selectiva, como un anticuerpo, y además es capaz de usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante antigénico, preferentemente un determinante polipeptídico, capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de células T. En ciertas modalidades, los determinantes de epítopos incluyen agrupaciones de superficie químicamente activas tales como aminoácidos, azúcares, lípidos, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que es reconocida por un anticuerpo. En determinadas modalidades, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno objetivo en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. También se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando presenta una mayor afinidad por el antígeno que otras moléculas relacionadas y/o no relacionadas.

El término "anticuerpo" (Ab) como se usa en la presente descripción incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos de cadena simple, por ejemplo, anticuerpos de llama y camello, fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, regiones variables y/o fragmentos de región constante, siempre que muestren una actividad biológica deseada, por ejemplo, actividad de unión a antígeno. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa indistintamente con "anticuerpo" en la presente descripción.

Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha identificado y/o separado y/o recuperado de su entorno natural.

La unidad básica de anticuerpo de cuatro cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consta de 5 unidades de heterotetrámero básico junto con un polipéptido adicional llamado cadena J, y por lo tanto, contienen 10 sitios de unión al antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizar para formar conjuntos polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de cuatro cadenas es generalmente de aproximadamente 150 kilo Daltons (kDa). Cada cadena L está unida a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro, dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que determinados residuos de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de V_H y V_L juntos forma un único sitio de unión al antígeno. Para conocer la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8a edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (editorial), Appleton & Lange, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. En dependencia de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H) las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Los miembros de la familia Camelidae, por ejemplo, llama, camello y dromedarios, contienen un tipo único de anticuerpo, que carecen de cadenas ligeras y además carecen del dominio C_H1 (Muyldermans, S., Rev. Mol.

Biotechnol., 74, 277-302 (2001)). La región variable de estos anticuerpos de cadena pesada se denomina V_{HH} o V_{HH} , y constituye el fragmento de unión a antígeno intacto más pequeño disponible (15 kDa) derivado de una inmunoglobulina funcional.

5 El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media la unión del antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de la extensión de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes llamados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de extrema variabilidad llamadas "regiones hipervariables" que tienen cada una de 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de hoja β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de hoja β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

20 El término "región hipervariable" cuando se usa en la presente descripción se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en V_L , y alrededor de 1-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en V_H ; Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ta Edición Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable".

25 El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente descripción se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un solo epítipo, es decir, un solo determinante antigénico. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminarse con otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden prepararse mediante la metodología de hibridomas o pueden prepararse mediante el uso de métodos de ADN recombinante en células bacterianas, animales eucariotas o células vegetales (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Núm. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos, usando las técnicas disponibles, por ejemplo, Clackson y otros, Nature, 352:624-628 (1991).

40 Los anticuerpos monoclonales de la presente incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (véase la patente de Estados Unidos 4,816,567 y Morrison y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855 (1984)).

50 Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo multimérico, preferentemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$, dímeros y trímeros de conjugados Fab, Fv, scFv, minicuerpos; dia-, tria- y tetracuerpos; anticuerpos lineales (véase Hudson y otros, Nature Med. 9, 129-134 (2003)).

55 "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión al antígeno. Este fragmento consta de un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y L) que aportan los residuos de aminoácidos para la unión del antígeno y confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno y, por lo tanto, se incluye en la definición de Fv.

60 "Fv monocatenario" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un polipéptido conector entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

65

Los términos "dia-, tria- y tetracuerpos" se refieren a fragmentos pequeños de anticuerpo preparados mediante la construcción de fragmentos sFv con conectores cortos (alrededor de 5-10 residuos) de manera que se consigue el apareamiento de los dominios V entre los dominios V_H y V_L entre cadenas pero no dentro de la cadena, lo que da como resultado un fragmento multivalente.

5 El término "anticuerpo humanizado" o "anticuerpo humano" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de regiones variables de cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en las que al menos una parte de la secuencia V_H y/o V_L se ha modificado para que sea más "similar al humano", es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo inyectado con CDR, en donde se introducen secuencias de CDR humanas en secuencias de V_H y V_L no humanas para reemplazar las correspondientes secuencias de CDR no humanas. Medios para preparar quimérico. Los expertos en la técnica conocen anticuerpos humanizados e inyectados con CDR (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 4,816,567 y 5,225,539). Un método para producir anticuerpos humanos emplea el uso de animales transgénicos, tal como un ratón transgénico. Estos animales transgénicos contienen una parte sustancial del genoma productor de anticuerpos humanos insertado en su propio genoma y la producción de anticuerpos endógenos del propio animal se vuelve deficiente para la producción de anticuerpos. Los métodos para generar tales animales transgénicos se conocen en la técnica. Tales animales transgénicos se pueden generar mediante el uso de tecnología Xenomouse^{RTM} o mediante el uso de un enfoque de "minilocus". Los métodos para generar Xenomice^{RTM} se describen en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598 y 6,075,181. Los métodos para generar animales transgénicos mediante el uso del enfoque de "minilocus" se describen en la patente de Estados Unidos Núm. 5,545,807, 5,545,806 y 5,625,825 y WO 93/12227.

La humanización de un anticuerpo no humano se ha convertido en una rutina en los últimos años y ahora está dentro del conocimiento de un experto en la técnica. Varias empresas ofrecen servicios para preparar un anticuerpo humanizado, por ejemplo, Xoma, Aries, Medarex, PDL y Cambridge Antibody Technologies. Los protocolos de humanización se describen ampliamente en la literatura técnica, por ejemplo, Kipriyanov y Le Gall, Molecular Biotechnol, vol. 26, páginas. 39-60 (2004), Humana Press, Totowa, Nueva Jersey; Lo, Methods Mol. Biol., Vol. 248, páginas. 135-159 (2004), Humana Press, Totowa, Nueva Jersey; Wu y otros J. Mol. Biol. 294, 151-162 (1999).

En determinadas modalidades, los anticuerpos pueden expresarse en líneas celulares distintas de las líneas celulares de hibridoma. Las secuencias que codifican anticuerpos particulares pueden usarse para la transformación de una célula hospedero adecuada de mamífero mediante métodos conocidos para introducir polinucleótidos en una célula hospedero, que incluyen, por ejemplo, empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula hospedero con el virus (o vector), o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica en las Patentes de Estados Unidos Núm. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 y 4,959,455. El procedimiento de transformación utilizado puede depender del hospedero a transformar. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos se conocen en la técnica e incluyen; pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido(s) en liposomas, mezcla de ácido nucleico con lípidos cargados positivamente y microinyección directa del ADN en núcleos.

Una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada, una región variable de cadena pesada, una región constante de cadena ligera o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo, o un fragmento del mismo en una combinación adecuada si se desea, es/son insertados en un vector de expresión apropiado utilizando técnicas de ligación estándar. La región constante de la cadena pesada o de la cadena ligera del anticuerpo se puede unir al extremo C de la región variable apropiada y se liga en un vector de expresión. El vector se selecciona típicamente para que sea funcional en la célula hospedero particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula hospedero de manera que pueda producirse la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Para una revisión de los vectores de expresión, consulte Methods Enzymol. vol. 185 (Goeddel, edición), 1990, Academic Press.

Los anticuerpos y fragmentos descritos en la presente descripción se unen a HPTPbeta y regulan la angiogénesis. Como se definió anteriormente, el término anticuerpo se usa para indicar un fragmento de unión a antígeno. Los usos de tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno se describen con más detalle a continuación.

55 Ensayos de selección utilizando modelos de angiogénesis *in vitro* e *in vivo*

Los anticuerpos se pueden seleccionar en ensayos de angiogénesis que se conocen en la técnica. Dichos ensayos incluyen ensayos *in vitro* que miden reporteros del crecimiento de vasos sanguíneos en células cultivadas o la formación de estructuras vasculares a partir de explantes de tejido y ensayos *in vivo* que miden el crecimiento de vasos sanguíneos directa o indirectamente (Auerbach, R., y otros (2003). Clin Chem 49, 32-40, Vailhe. B. y otros (2001). Lab Invest 81, 439-452).

Modelos *in vitro* de angiogénesis

65

La mayoría de estos ensayos emplean explantes de tejido o células endoteliales cultivadas y miden el efecto de los agentes sobre las respuestas de las células "angiogénicas" o sobre la formación de estructuras de tipo capilar sanguíneo. Los ejemplos de ensayos de angiogénesis *in vitro* incluyen, pero no se limitan a, migración y proliferación de células endoteliales, formación de tubos capilares, brote endotelial, ensayo de explante de anillo aórtico y ensayo del arco aórtico en pollo.

Modelos in vivo de angiogénesis

En estos ensayos, los agentes o anticuerpos se administran local o sistémicamente en presencia o ausencia de factores de crecimiento (es decir, VEGF o angiopoyetina 1) y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos se mide por observación directa o midiendo un marcador reportero como el contenido de hemoglobina o un indicador fluorescente. Los ejemplos de angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo, el ensayo de angiogénesis corneal y el ensayo de tapón MATRIGEL™.

Tratamiento de trastornos regulados por angiogénesis

El término "regular" se define como en sus significados aceptados en el diccionario. Por tanto, el significado del término "regular" incluye, pero no se limita a, regular a la alta o regular a la baja, fijar, traer orden o uniformidad, gobernar o dirigir por varios medios. En un aspecto, puede usarse un anticuerpo en un método para el tratamiento de un "trastorno de angiogénesis elevada" o "trastorno de angiogénesis reducida". Como se usa en la presente descripción, un "trastorno de angiogénesis elevada" es uno que implica angiogénesis elevada o no deseada en la manifestación biológica de la enfermedad, trastorno y/o afección; en la cascada biológica que conduce al trastorno; o como síntoma del trastorno. De manera similar, el "trastorno de angiogénesis reducida" es uno que implica angiogénesis deseada o reducida en las manifestaciones biológicas. Esta "participación" de la angiogénesis en un trastorno de angiogénesis elevada/reducida incluye, pero no se limita a, lo siguiente:

(1) La angiogénesis como "causa" del trastorno o manifestación biológica, ya sea que el nivel de angiogénesis esté elevado o reducido genéticamente, por infección, por autoinmunidad, trauma, causas biomecánicas, estilo de vida o por algunas otras causas.

(2) La angiogénesis como parte de la manifestación observable de la enfermedad o trastorno. Es decir, la enfermedad o trastorno puede medirse en términos de angiogénesis aumentada o reducida. Desde un punto de vista clínico, la angiogénesis indica la enfermedad; sin embargo, la angiogénesis no tiene por qué ser el "sello distintivo" de la enfermedad o trastorno.

(3) La angiogénesis es parte de la cascada bioquímica o celular que da como resultado la enfermedad o trastorno. A este respecto, la regulación de la angiogénesis puede interrumpir la cascada y puede controlar la enfermedad. A continuación se describen ejemplos no limitantes de trastornos regulados por angiogénesis que se pueden tratar mediante la presente invención.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar enfermedades asociadas con neovascularización retiniana/coroidea que incluyen, pero no se limitan a, retinopatía diabética, degeneración macular, cáncer, anemia de células falciformes, sarcoidosis, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión de vena, arteria. oclusión, enfermedad carotídea obstructiva, uveítis/vitritis crónica, infecciones por micobacterias, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía del prematuro, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, infecciones que provocan retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, enfermedad de Best, miopía, pterisia óptica, enfermedad de Stargardt, pars planitis, desprendimiento crónico de retina, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismos y complicaciones post-láser. Otras enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del iris) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso que incluyen todas las formas de vitreorretinopatía proliferativa, estén o no asociadas con diabetes.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar enfermedades asociadas con la inflamación crónica. Las enfermedades con síntomas de inflamación crónica incluyen enfermedades inflamatorias del intestino como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, sarcoidosis y artritis reumatoide. La angiogénesis es un elemento clave que tienen en común estas enfermedades inflamatorias crónicas. La inflamación crónica depende de la formación continua de brotes capilares para mantener la afluencia de células inflamatorias. La afluencia y presencia de las células inflamatorias producen granulomas y, por tanto, mantienen el estado inflamatorio crónico. La inhibición de la angiogénesis evitaría la formación de granulomas y aliviaría la enfermedad.

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se caracterizan por inflamación crónica y angiogénesis en varios sitios del tracto gastrointestinal. La enfermedad de Crohn se caracteriza por una inflamación granulomatosa crónica en todo el tracto gastrointestinal que consiste en nuevos brotes capilares rodeados por un cilindro de células inflamatorias. La prevención de la angiogénesis inhibe la formación de brotes y previene la formación de granulomas. La enfermedad de Crohn se presenta como una enfermedad inflamatoria transmural crónica que afecta con mayor frecuencia el íleon distal y el colon, pero también puede ocurrir en cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano y

el área perianal. Los pacientes con enfermedad de Crohn generalmente tienen diarrea crónica asociada con dolor abdominal, fiebre, anorexia, pérdida de peso e hinchazón abdominal. La colitis ulcerosa es también una enfermedad crónica, inespecífica, inflamatoria y ulcerosa que surge en la mucosa del colon y se caracteriza por la presencia de diarrea sanguinolenta.

5 Las enfermedades inflamatorias del intestino también presentan manifestaciones extraintestinales como lesiones cutáneas. Tales lesiones se caracterizan por inflamación y angiogénesis y pueden ocurrir en muchos sitios distintos del tracto gastrointestinal. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser capaces de tratar estas lesiones previniendo la angiogénesis, reduciendo así el influjo de células inflamatorias y la formación de lesiones.

10 La sarcoidosis es otra enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por ser un trastorno granulomatoso multisistémico. Los granulomas de esta enfermedad pueden formarse en cualquier parte del cuerpo y, por lo tanto, los síntomas dependen del sitio de los granulomas y de si la enfermedad está activa. Los granulomas son creados por los brotes capilares angiogénicos que proporcionan un suministro constante de células inflamatorias.

15 Los anticuerpos descritos en la presente descripción también pueden tratar las afecciones inflamatorias crónicas asociadas con la psoriasis. La psoriasis, una enfermedad de la piel, es otra enfermedad crónica y recurrente que se caracteriza por pápulas y placas de varios tamaños. La prevención de la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener las lesiones características conduce al alivio de los síntomas.

20 La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por una inflamación inespecífica de las articulaciones periféricas. Se cree que los vasos sanguíneos del revestimiento sinovial de las articulaciones sufren angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies reactivas de oxígeno que conducen al crecimiento del pannus y la destrucción del cartílago. Los factores involucrados en la angiogénesis pueden contribuir activamente y ayudar a mantener el estado de inflamación crónica de la artritis reumatoide. Otras enfermedades que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención son hemangiomas, enfermedad de Osler-Weber-Rendu o telangiectasia hemorrágica hereditaria, tumores sólidos o transmitidos por sangre y síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

30 Los anticuerpos descritos en la presente descripción también pueden usarse para tratar un "trastorno de angiogénesis reducida". Como se usa en la presente descripción, un "trastorno de angiogénesis reducida" es aquel en donde la angiogénesis se consideraría beneficiosa para tratar una enfermedad, trastorno y/o afección. El trastorno se caracteriza por tejido que sufre o corre el riesgo de sufrir daño isquémico, infección y/o mala cicatrización, que se produce cuando el tejido está privado de un suministro adecuado de sangre oxigenada debido a una circulación inadecuada. Como se usa en la presente descripción, "tejido" se usa en el sentido más amplio, para incluir, pero sin limitarse a, lo siguiente: tejido cardíaco, tal como miocardio y ventrículos cardíacos; tejido eréctil; músculo esquelético; tejido neurológico, como el del cerebelo; órganos internos, como cerebro, corazón, páncreas, hígado, bazo y pulmón; o área generalizada del cuerpo como miembros enteros, un pie o apéndices distales como dedos de manos o pies.

40 Métodos de vascularización del tejido isquémico.

Los anticuerpos pueden usarse en un método de vascularización de tejido isquémico. Como se usa en la presente descripción, "tejido isquémico" significa tejido que está privado de un flujo sanguíneo adecuado. Los ejemplos de tejido isquémico incluyen, pero no se limitan a, tejido que carece de un suministro sanguíneo adecuado como resultado de infartos de miocardio y cerebrales, isquemia mesentérica o de extremidades, o el resultado de una oclusión o estenosis vascular. En un ejemplo, la interrupción del suministro de sangre oxigenada puede deberse a una oclusión vascular. Dicha oclusión vascular puede ser causada por arteriosclerosis, traumatismos, procedimientos quirúrgicos, enfermedades y/u otras etiologías. Se encuentran disponibles técnicas de rutina estándar para determinar si un tejido tiene riesgo de sufrir daño isquémico por una oclusión vascular indeseable. Por ejemplo, en la enfermedad del miocardio, estos métodos incluyen una variedad de técnicas de imagenología (por ejemplo, metodologías de radiotrazadores, rayos X y MRI) y pruebas fisiológicas. Por tanto, la inducción de la angiogénesis es un medio efectivo para prevenir o atenuar la isquemia en los tejidos afectados por una oclusión vascular o en riesgo de serlo. Además, el tratamiento del músculo esquelético y la isquemia miocárdica, accidente cerebrovascular, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica, enfermedad de las arterias coronarias está completamente contemplado.

Una persona experta en la técnica del uso de técnicas estándar puede medir la vascularización del tejido. Los ejemplos no limitantes de medición de la vascularización en un sujeto incluyen SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotón único); PET (tomografía por emisión de positrones); MRI (imágenes por resonancia magnética); y combinación de los mismos, midiendo el flujo sanguíneo al tejido antes y después del tratamiento. La angiografía se puede utilizar como evaluación de la vascularización macroscópica. La evaluación histológica se puede utilizar para cuantificar la vascularización a nivel de los vasos pequeños. Estas y otras técnicas se describen en Simons, y otros, "Clinical trial in coronary angiogenesis", *Circulation*, 102, 73-86 (2000).

65 Métodos de reparación de tejidos.

Los anticuerpos pueden usarse en un método para reparar tejido. Como se usa en la presente descripción, "reparar tejido" significa promover la reparación, regeneración, crecimiento y/o mantenimiento de tejido, incluyendo, pero sin limitarse a, reparación de heridas o ingeniería de tejidos. Un experto en la técnica apreciará que se requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos para la reparación del tejido. A su vez, el tejido puede resultar dañado por, entre otros, lesiones o afecciones traumáticas que incluyen artritis, osteoporosis y otros trastornos esqueléticos y quemaduras. El tejido también puede resultar dañado por lesiones debidas a procedimientos quirúrgicos, irradiación, laceración, productos químicos tóxicos, infecciones virales o bacterianas, o quemaduras. El tejido que necesita reparación también incluye las heridas que no cicatrizan. Ejemplos de heridas que no cicatrizan incluyen úlceras cutáneas que no cicatrizan como resultado de patología diabética; o fracturas que no se curan fácilmente.

Los anticuerpos también pueden usarse en la reparación de tejidos en el contexto de procedimientos dirigidos de regeneración de tejidos (GTR). Los expertos en la técnica utilizan actualmente dichos procedimientos para acelerar la cicatrización de heridas después de procedimientos quirúrgicos invasivos.

Los anticuerpos pueden usarse en un método para promover la reparación de tejidos caracterizado por un mayor crecimiento de tejido durante el proceso de ingeniería de tejidos. Tal como se usa en la presente descripción, "ingeniería de tejidos" se define como la creación, diseño y fabricación de dispositivos prostéticos biológicos, en combinación con materiales sintéticos o naturales, para el aumento o reemplazo de tejidos y órganos corporales. Por tanto, los presentes métodos pueden usarse para aumentar el diseño y el crecimiento de tejidos humanos fuera del cuerpo para su posterior implantación en la reparación o sustitución de tejidos enfermos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser útiles para promover el crecimiento de reemplazos de injertos de piel que se usan como terapia en el tratamiento de quemaduras.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden incluirse en dispositivos que contienen células o que no contienen células los cuales inducen la regeneración de tejidos humanos funcionales cuando se implantan en un sitio que requiere regeneración. Como se discutió previamente, la regeneración de tejido dirigida por biomaterial puede usarse para promover el recrecimiento óseo, por ejemplo, en la enfermedad periodontal. Por tanto, los anticuerpos pueden usarse para promover el crecimiento de tejidos reconstituidos ensamblados en configuraciones tridimensionales en el sitio de una herida u otro tejido que necesita tal reparación.

En otro aspecto de la ingeniería de tejidos, los anticuerpos pueden incluirse en dispositivos externos o internos que contienen tejidos humanos diseñados para reemplazar la función de los tejidos internos enfermos. Este enfoque implica aislar las células del cuerpo, colocarlas con matrices estructurales e implantar el nuevo sistema dentro del cuerpo o usar el sistema fuera del cuerpo. Por ejemplo, se pueden incluir anticuerpos en un injerto vascular revestido de células para promover el crecimiento de las células contenidas en el injerto. Se prevé que los métodos de la invención pueden usarse para aumentar la reparación, regeneración e ingeniería de tejidos en productos tales como cartílago y hueso, tejidos del sistema nervioso central, músculos, hígado y células de islotes pancreáticos (productoras de insulina).

Formulaciones farmacéuticas y métodos de uso

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden administrarse a individuos para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que son regulados por genes y proteínas de la invención. El término "tratamiento" se usa en la presente descripción significando que la administración de un compuesto de la presente invención mitiga una enfermedad o un trastorno en un hospedero. Por tanto, el término "tratamiento" incluye evitar que se produzca un trastorno en un hospedero, particularmente cuando el hospedero está predispuesto a contraer la enfermedad, pero aún no ha sido diagnosticado con la enfermedad; inhibir el trastorno; y/o aliviar o revertir el trastorno. En la medida en que los métodos descritos en la presente descripción estén dirigidos a prevenir trastornos, se entiende que el término "prevenir" no requiere que el estado patológico sea frustrado por completo. (Véase Webster's Ninth Collegiate Dictionary.) En realidad, como se usa en la presente descripción, el término prevención se refiere a la capacidad del experto en la técnica para identificar una población que es susceptible a trastornos, de modo que la administración de los compuestos de la presente invención puede ocurrir antes del inicio de una enfermedad. El término no implica que la enfermedad se evite por completo. Los compuestos identificados por los métodos de selección descritos en la presente descripción pueden administrarse junto con otros compuestos.

La seguridad y la eficacia terapéutica de los compuestos identificados pueden determinarse mediante procedimientos estándar que utilizan tecnologías *in vitro* o *in vivo*. Pueden preferirse los compuestos que presentan índices terapéuticos altos, aunque los compuestos con índices terapéuticos más bajos pueden ser útiles si el nivel de efectos secundarios es aceptable. Los datos obtenidos de las técnicas toxicológicas y farmacológicas *in vitro* e *in vivo* pueden usarse para formular el intervalo de dosis.

La efectividad de un compuesto puede evaluarse adicionalmente en modelos animales o en ensayos clínicos de pacientes con angiogénesis no regulada o regulada incorrectamente.

Como se usa en la presente descripción, "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y

retardadores de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, tales medios pueden usarse en las composiciones de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones. Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que puede inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. Puede conseguirse una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un portador estéril que contiene un medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr usando aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, pomadas, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En una modalidad, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán al compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de vinilo etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas que contienen anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también pueden usarse como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 4,522,811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. "Forma de unidad de dosificación", como se usa en la presente descripción, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto

terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación viene dictada y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se desea lograr, y de las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

5

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción de la proteína del dominio extracelular HPTPβ.

10 Métodos: Se clona HPTPβ de longitud completa a partir de una biblioteca de placenta humana de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Origene). El clon es idéntico a un clon de cDNA previamente informado (número de acceso de Genbank X54131) excepto que no contiene la repetición de FNIII núm. 5. Un cDNA que codifica el dominio extracelular soluble (ECD) de HPTPβ completo se clona mediante PCR a partir del cDNA de longitud completa (ver secuencia a continuación) que codifica AA 1-1534 con una His-His-His-His-His-His-Gly (6His-Gly) añadida en el extremo C (SEQ ID NO: 1). El cDNA resultante se clona en vectores de expresión de mamíferos para la expresión transitoria (pShuttle-CMV) o estable (pcDNA3.1(-)) en células HEK293. Para obtener HPTPβ ECD (βECD) purificada, las células HEK293 transfectadas con un vector de expresión de βECD se incuban en OptiMEM sin suero (Gibco) durante 24 horas en condiciones normales de crecimiento. A continuación, se recupera el medio acondicionado, se centrifuga para eliminar los residuos (1000 rpm x 5 minutos) y se añade 1 ml de agarosa Ni-NTA (Qiagen) lavada (500 μl de material empaquetado) a cada 10 ml de medio aclarado y se deja agitar durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la mezcla se carga en una columna y se lava con 20 volúmenes de solución de NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, pH 8. La proteína del dominio extracelular HPTPβ purificada (SEQ ID NO: 2) se eluye luego en seis fracciones con 200 μL/elución en NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM, pH 8. Las fracciones se analizan para determinar el contenido de proteínas usando electroforesis en gel de poliacrilimida-SDS desnaturizante reductor y se detectan mediante tinción de plata (Invitrogen) y se confirman mediante espectrometría de masas.

Resultados: Para desarrollar un anticuerpo contra el dominio extracelular de HPTPβ, se generan vectores de expresión que dirigen la expresión de una proteína del dominio extracelular de HPTPβ marcada con 6-His (Figura 1, Panel A). Posteriormente, la proteína del dominio extracelular de HPTPβ marcada con 6-His se purifica hasta casi 30 homogeneidad (Figura 1, Panel B) a partir del medio acondicionado de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión.

Ejemplo 2. Generación de anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de HPTPβ.

35 Métodos: Para la producción del inmunógeno del dominio extracelular HPTPβ, la proteína del dominio extracelular de HPTPβ-6His purificada se conjuga con tiroglobulina porcina (Sigma) usando química de acoplamiento EDC (Hockfield, S. y otros, (1993) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Volumen 1 páginas 111-201, Inmunocitoquímica). El conjugado de tiroglobulina-dominio extracelular de HPTPβ resultante se dializa frente a PBS, pH 7,4. Los ratones adultos Balb/c se inmunizan luego por vía subcutánea con el conjugado (100-200 μg) y el adyuvante completo de Freund en una mezcla 1:1. Después de 2-3 semanas, se inyecta a los ratones por vía intraperitoneal o subcutánea con adyuvante incompleto de Freund y el conjugado en una mezcla 1:1. La inyección se repite a las 4-6 semanas. Los sueros se recogen de ratones 7 días después de la tercera inyección y se analizan para determinar la inmunorreactividad al antígeno del dominio extracelular de HPTPβ mediante ELISA y transferencia de Western. Los ratones que muestran una buena respuesta al antígeno son reforzados por una única inyección intraesplénica con 50 μl de proteína de dominio extracelular HPTPβ purificada mezclada 1:1 con hidróxido de alumbre usando una aguja extra larga de calibre 31 (Goding, J. W., (1996) Monoclonal Antibodies: Principles and Practices. Tercera edición, Academic Press Limited. página 145). En resumen, los ratones se anestesian con avertina al 2,5 % y se crea una incisión de 1 centímetro en la piel y la pared oblicua izquierda del cuerpo. La mezcla de antígenos se administra insertando la aguja desde la parte posterior hasta la parte anterior del bazo en una inyección longitudinal. Se sutura la pared del cuerpo y se sella la piel con dos pequeños clips metálicos. Los ratones se controlan para una recuperación segura. Cuatro días después de la cirugía, se extrae el bazo del ratón y se preparan suspensiones de células individuales para fusionarlas con células de mieloma de ratón para la creación de líneas celulares de hibridoma (Spitz, M., (1986) Methods In Enzymology, Volumen 121. Editores John J, Lagone y Helen Van Vunakis. Páginas 33-41 (Academic Press, Nueva York, NY)). Los hibridomas resultantes se cultivan en medio modificado de Dulbeccos (Gibco) complementado con suero de ternero fetal al 15 % (Hyclone) e hipoxantina, aminopterina y timidina.

La detección de hibridomas positivos comienza 8 días después de la fusión y continúa durante 15 días. Los hibridomas que producen anticuerpos de dominio extracelular anti-HPTPβ se identifican mediante ELISA en dos conjuntos de placas de 96 pocillos: uno recubierto con el dominio extracelular HPTPβ etiquetado con histidina y otro recubierto con una proteína MurA bacteriana etiquetada con histidina como control negativo. El anticuerpo secundario es una IgG anti-ratón de burro marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Immunoresearch). La inmunorreactividad se controla en los pocillos usando el desarrollo de color iniciado por tabletas ABTS disueltas en tampón TBS, pH 7,5. Las mezclas de reacción de HRP individuales se terminan añadiendo 100 microlitros de SDS al 1 % y leyendo la absorbancia a 405 nm con un espectrofotómetro. Los hibridomas que producen anticuerpos que interactúan con el dominio extracelular-6His de HPTPβ y no con la proteína murA-6His se utilizan para análisis adicionales. Se realizan diluciones limitantes (0,8 células por pocillo) dos veces en clones positivos en placas de 96

65

pocillos, con la clonalidad definida para tener más del 99 % de los pocillos con reactividad positiva. Los isotipos de anticuerpos se determinan mediante la tecnología iso-strip (Roche). Para obtener un anticuerpo purificado para una evaluación adicional, los sobrenadantes del cultivo de tejidos se purifican por afinidad usando columnas de proteína A o proteína G.

5 Resultados: Se aíslan cinco anticuerpos monoclonales inmunorreactivos a la proteína del dominio extracelular de HPTPβ y se les asigna la siguiente nomenclatura, R15E6, R12A7, R3A2, R11C3, R15G2 y R5A8.

10 El anticuerpo monoclonal R15E6 se deposita en la *American Type Culture Collection* (ATCC), P.O. Caja 1549, Manassas, VA 20108 Estados Unidos el 04 de mayo de 2006.

Ejemplo 3. R15E6 se une a HPTPβ endógena en células endoteliales humanas.

15 A. R15E6 se une a HPTPβ endógena como se demuestra por inmunoprecipitación y transferencia western.

20 Materiales: células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), medio EGM y solución neutralizante de tripsina de Cambrex; OPTIMEM I (Gibco), albúmina de suero bovino (BSA; Santa Cruz), solución salina tamponada con fosfato (PBS; Gibco), factores de crecimiento que incluyen angiopoyetina 1 (Ang1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (R&D Systems), anticuerpo monoclonal Tie2 (Universidad de Duke/P&GP), anticuerpo policlonal receptor 2 de VEGF (VEGFR2) (Whitaker y otros), agarosa de proteína A/G (Santa Cruz), sistema de transferencia/electroforesis en gel prefabricado de tris-glicina (6-8 %) (Invitrogen), membranas de PVDF (Invitrogen), tampón de lisis (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 10 % glicerol, 1 % triton-X-100, EDTA 2 mM, NaOAc 1 mM, NaF 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml).

25 Método: Las HUVEC se tratan de manera previa durante 30 min con anticuerpo (en OPTIMEM) u OPTIMEM I solo. Después de la eliminación del tratamiento previo, las células se tratan con Ang1 (100 ng/ml) durante 6 minutos en PBS+BSA al 0,2 % y se lisan en tampón de lisis. Los lisados se procesan directamente en un gel de Tris-Glicina o se inmunoprecipitan con 2-5 µg/ml de anticuerpo Tie-2 o 10 µg/ml de anticuerpo R15E6 y proteína A/G agarosa. Las muestras inmunoprecipitadas se lavan 1x con tampón de lisis y se hierven durante 5 min en tampón de muestra 1x.
30 Las muestras se resuelven en un gel de Tris-Glicina, se transfieren a una membrana de PVDF y se detectan mediante transferencia western utilizando los anticuerpos indicados (pTYR Ab (PY99, Santa Cruz), Tie-2, VEGFR2 y/o R15E6).

35 Resultados: Por IP/transferencia western, R15E6 reconoce una banda principal de alto peso molecular consistente con el tamaño de HPTPβ (Figura 2, Panel A, Carril 2). Las bandas de menor peso molecular, menos intensas, probablemente representan formas precursoras menos glicosiladas de HPTPβ. Una inmunoprecipitación (IP) con control, IgG no inmune no muestra bandas en el intervalo de peso molecular de HPTPβ (Figura 2, Panel A, Carril 1), y una IP combinada Tie2/VEGFR2 muestra bandas del peso molecular esperado (Figura 2, Panel A, Carril 3). Este resultado demuestra que R15E6 reconoce y es específico para HPTPβ.

40 B. R15E6 se une a HPTPβ endógena como lo demuestra el análisis FACS

45 Materiales: HUVEC, medio EGM y solución neutralizante de tripsina de Cambrex; Anticuerpo secundario marcado con Alexafluor 488 de Molecular Probes; Solución salina equilibrada de Hanks (Gibco); Citómetro de flujo FACSCAN y programa CellQuest de Becton Dickenson.

50 Método: Las HUVEC se tratan con tripsina, se tratan con solución neutralizante de tripsina y se lavan con HBSS. Se añade anticuerpo R15E6 (0,6 µg) a 250 000 células en 50 µl de HBSS y se incuba en hielo durante 20 minutos. Las células se lavan con 1 ml de HBSS seguido de la adición de 2 µg de anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia durante 20 minutos en hielo. Las células se lavan y se resuspenden en 1 ml de HBSS y luego se analizan en el citómetro de flujo FACSCAN con el programa CellQuest. Las células de control se tratan únicamente con anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia.

55 Resultados: Por análisis FACS, HUVEC intactas, R15E6 causa un cambio robusto (>90 % de las células) en la señal de fluorescencia en comparación con el anticuerpo secundario solo (Figura 2, Panel B). Este resultado indica que R15E6 se une a HPTPβ endógeno presentado en la superficie de células endoteliales intactas.

Ejemplo 4. R15E6 mejora la activación de Tie2 y promueve múltiples respuestas angiogénicas (sobrevivencia de células endoteliales, migración y morfogénesis capilar).

60 A. R15E6 mejora la fosforilación de Tie2 en ausencia y presencia de la angiopoyetina 1 (Ang1), el ligando de Tie2.

65 Métodos: Las HUVEC se cultivan en medio en ausencia de suero como se describió anteriormente en presencia o ausencia de diversas concentraciones de R15E6 y con o sin Ang1 añadida. Los lisados se preparan, se inmunoprecipitan con un anticuerpo Tie2, se resuelven mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfieren a una membrana de PVDF. A continuación, las proteínas inmunoprecipitadas unidas a la membrana se someten a transferencia western en serie con un anticuerpo antifosfotirosina para cuantificar la fosforilación de Tie2 seguido de

un anticuerpo de Tie2 para cuantificar el Tie2 total. La fosforilación de Tie2 se expresa como la relación entre la señal de antifosfotirosina y la señal de Tie2 total.

5 Resultados: R15E6 mejora la fosforilación de Tie2 tanto en ausencia como en presencia de Ang1 (Figura 3). Este resultado indica que la unión de R15E6 a HPTPβ en la superficie de las células endoteliales modula su función biológica dando como resultado una activación mejorada de Tie2 en ausencia o presencia de ligando.

10 B. R15E6 mejora la sobrevivencia de las células endoteliales en ausencia y en presencia de factores de crecimiento endoteliales.

10 Materiales: HUVEC, medio EGM y solución neutralizante de tripsina de Cambrex; DMEM (Cell Gro), BSA deslipidizado (BD Falcon), Ensayo de ATP Cell Titer Glo (Promega), Factores de crecimiento (Ang1, VEGF 165 y FGF) (R&D Systems), lector de placas Victor V Multilabel (Perkin Elmer Wallac).

15 Método: Las HUVEC se siembran en placas a 10 000 células/pocillo, se privan de suero en DMEM/BSA al 0,2 % y se tratan durante 72 h en presencia o ausencia de factor de crecimiento (Ang1, VEGF o FGF), con o sin varias concentraciones de anticuerpo R15E6. Después de 72 horas, las células se lavan con DMEM y las células sobrevivientes se cuantifican midiendo los niveles de ATP utilizando el ensayo de luminiscencia Cell Titer Glo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega).

20 Resultados: De acuerdo con los resultados del ensayo de activación Tie2, R15E6 mejora la sobrevivencia de las células endoteliales en ausencia de factor de crecimiento añadido a concentraciones entre 0,5 y 5 nM (Figura 4, Panel A). De manera similar, R15E6 mejora la sobrevivencia de las células endoteliales mediada por Ang1 (Figura 4, Panel A) así como la sobrevivencia celular mediada por VEGF y FGF (Figura 4, Paneles B y C). No se observa una sobrevivencia mejorada con un anticuerpo monoclonal de control (Figura 4, Panel D). Estos resultados demuestran que la unión de R15E6 a HPTPβ en la superficie de la célula endotelial mejora la sobrevivencia de las células endoteliales basales así como la sobrevivencia celular mediada por múltiples vías angiogénicas (Ang1, VEGF y FGF).

30 C. R15E6 mejora la migración de células endoteliales en ausencia y en presencia de VEGF.

30 Materiales: HUVEC, medio EGM y solución neutralizante de tripsina de Cambrex; EBM-rojo de fenol libre (PRF-EBM, Cambrex), BSA deslipidizado (BD Falcon), sistema de migración de células endoteliales BD Falcon Biocoat (BD Falcon), Calceína AM (Molecular Probes); Factores de crecimiento (VEGF 165) (R&D Systems), lector de placas Victor V Multilabel (Perkin Elmer Wallac).

35 Método: Las HUVEC se resuspenden en PRF-EBM + BSA al 0,1 % y se cultivan en placas a 50 000 células/transwell (BD Bioscience, tamaño de poro de 3 μm). El factor de crecimiento/R15E6 se coloca en el pocillo inferior de la cámara transwell y se incuba 4-22 h. Las células que migran a través de la membrana se detectan marcando con 4 μg/ml de Calceína AM durante 90'. La fluorescencia se mide usando un instrumento Victor V (485/535).

40 Resultados: De acuerdo con los resultados del estudio de sobrevivencia, R15E6 mejora la migración de células endoteliales tanto basal como mediada por VEGF (Figura 5).

45 D. R15E6 mejora el brote de células endoteliales y la morfogénesis capilar en ausencia y en presencia de factores de crecimiento endotelial.

Materiales: medios HUVEC y EGM de Cambrex; Perlas Cytodex y colágeno tipo I de Sigma; PBS de Dulbecco y medios M199 de Gibco; VEGF de R&D.

50 Método: El pase 4 de HUVEC (2×10^6 células) se cultivan con 5 mg de perlas Cytodex en 10 ml de EGM en placas bacteriológicas tratadas con cultivo no tisular de 100 mm durante 48 horas con agitación ocasional. Las perlas recubiertas de células se transfieren a un tubo cónico de 50 ml y se resuspenden en 380 μl de D-PBS. Los geles de colágeno se preparan añadiendo 71,4 μl de perlas recubiertas de células a 2,8 ml de una solución de matriz que consta de 3 mg/ml de colágeno en medio M199 suplementado con NaOH 0,005 N, HEPES 20 mM y NaHCO₃ 26 mM. Trescientos cincuenta microlitros de las perlas se dispensan en un pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos y se permite a la matriz solidificar durante 1 hora a 37 °C/5 % de CO₂. Se añade un ml de medio EGM con o sin VEGF (10 ng/ml) o R15E6 (7,5 μg/ml) por pocillo y se regresa a la incubadora. Después de 48 horas, un observador ciego visualiza los brotes con un microscopio invertido de contraste de fase y observa 50 perlas por pocillo, en pozos triplicados, para detectar la presencia de brotes de células endoteliales. Los resultados se expresan como el número de brotes por perla.

55 Resultados: de acuerdo con los resultados de los otros ensayos, R15E6 también mejora la morfogénesis capilar mediada por VEGF y la línea de base en el ensayo de germinación de perlas endoteliales (Figura 6).

65 Ejemplo 5. El epitopo de unión para R15E6 está en la repetición FN3 del extremo N del dominio extracelular de HPTPβ

humano.

5 A. El análisis de transferencia western de mutantes recombinantes de deleciones del extremo C y proteínas quiméricas de ratón/humano muestra que el epítipo de unión a R15E6 está en la repetición FN3 del extremo N del dominio extracelular de HPTPβ.

10 Métodos: las células HEK293 se transfectan con vectores de expresión que codifican la mutante de deleción de HPTPβ indicada o la quimera de ratón/humano. A continuación, las células transfectadas se incuban en OptiMEM durante 24 horas más, después de las cuales se recolecta el medio acondicionado que contiene el dominio extracelular HPTPβ indicado y se almacena para uso futuro o se usa inmediatamente para estudios de transferencia western o ECL (ver más abajo). Para el análisis de transferencia western, se resuelven por PAGE 20 μl de medio acondicionado que contiene la proteína HPTPβ indicada o ninguna proteína recombinante (Simulación, vector vacío transfectado), se transfieren a una membrana PVDF y se ensayan con R15E6.

15 Resultados: mediante análisis de transferencia western, R15E6 se une a todas las mutantes de deleción del extremo C de HPTPβ (Figura 7A), lo que indica que el epítipo de unión está dentro de las dos primeras repeticiones de FN3 del extremo N. R15E6 no se une al dominio extracelular de HPTPβ murino (SEQ ID NO: 7) que demuestra especificidad por la proteína humana (Figura 7B carril 6 frente al carril 2). La sustitución de las repeticiones murinas FN3 1ra o 1ra y 2da del extremo N con las secuencias humanas restauró la unión de R15E6 (Figura 7B carriles 3 y 5). Por el contrario, reemplazar sólo la 2da repetición murina de FN3 con la secuencia humana no logra restaurar la unión (Figura 7B carril 4). Tomados en conjunto, estos hallazgos localizan el epítipo de unión de R15E6 a la repetición FN3 del extremo N (-100 aminoácidos) de HPTPβ de humano.

25 B. El análisis ECL (electroquimioluminiscente) de mutantes de deleciones de los extremos y proteínas quiméricas de ratón/humano confirma que el epítipo de unión a R15E6 está en la repetición FN3 del extremo N del dominio extracelular de HPTPβ.

30 Métodos: Los sobrenadantes que contienen la proteína HPTPβ indicada se recubren en una placa de 96 pocillos de MSD (Meso Scale Discovery) de alta unión, se dejan secar y se bloquean con BSA al 3 % durante 1 h. A continuación, la proteína se incuba con el anticuerpo monoclonal R15E6 o el fragmento Fab R15E6 (10 nM o 1,5 μg/ml) durante 1 h, se lava y se incuba con un anticuerpo de cabra anti-ratón con una etiqueta MSD-Tag (10 nM) para 1 h. El exceso de anticuerpo se lava y se añade tampón de lectura MSD. La emisión de luz se mide utilizando el lector Sector 2400 (MSD). MSD utiliza detección electroquimioluminiscente para detectar eventos de unión en matrices con patrones. La tecnología de Meso Scale Discovery utiliza microplacas patentadas MULTI-ARRAY™ y MULTI-SPOT™ con electrodos integrados en la parte inferior de la placa. Los electrodos de MSD están hechos de carbono y los reactivos biológicos se pueden unir al carbono simplemente por adsorción pasiva y retienen un alto nivel de actividad biológica. Los ensayos MSD utilizan etiquetas electroquimioluminiscentes para una detección ultrasensible. Estos marcadores electroquimioluminiscentes emiten luz cuando se estimulan electroquímicamente. El proceso de detección se inicia en los electrodos integrados ubicados en la parte inferior de las microplacas de MSD y solo se excitan las etiquetas cercanas al electrodo y se detecta la luz a 620 nm.

45 Resultados: de acuerdo con los estudios de transferencia western, R15E6 se une a todas las proteínas de deleciones del extremo C de HPTPβ mediante análisis de MSD (Figura 8A). También en consonancia con el análisis de transferencia western, R15E6 no se une al dominio extracelular de HPTPβ murino, pero la unión se restaura reemplazando la repetición FN3 del extremo N murina con el dominio FN3 del extremo N humana (Figura 8B). Estos datos confirman que el epítipo de unión de R15E6 se encuentra en la repetición FN3 del extremo N de HPTPβ humana. Como se esperaba, el epítipo de unión del fragmento Fab R15E6 monovalente también podría mapearse en la repetición FN3 más cercana al extremo N de HPTPβ humana (Figura 9).

50 Ejemplo 6. Un fragmento Fab monovalente de R15E6 bloquea la activación de Tie2 mediada por R15E6 e inhibe la sobrevivencia y migración de las células endoteliales.

55 Métodos: Se realizan ensayos de activación de Tie2 y de sobrevivencia y migración de células endoteliales como se describió anteriormente en el ejemplo 4. Los fragmentos Fab R15E6 monovalentes se preparan como se describió previamente. El R15E6 purificado se dializa en Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, que contiene EDTA 2 mM y ditiotreitól 1 mM. Se activa papaína (Pierce) a 1-2 mg/ml en el tampón mencionado anteriormente durante 15 minutos a 37 °C. Se incuba R15E6 a 10 mg/ml con papaína en el mismo tampón usando una relación enzima: sustrato de 1:100, durante 1 hora a 37 °C. La digestión se termina mediante la adición de yodoacetamida (concentración final 20 mM, y se mantiene en hielo durante 1 h, protegida de la luz. El material digerido con papaína se dializa durante toda la noche contra solución salina tamponada con fosfato, para eliminar la yodoacetamida. El grado de digestión se controla mediante SDS-PAGE con la desaparición de la cadena pesada gamma (PM 55,000 kDa) y la aparición del fragmento Fc de gamma (PM 27,000 kDa) y cadenas ligeras (PM 22,000-25,000 kDa).

65 Resultados: a diferencia del anticuerpo R15E6 intacto, los fragmentos Fab no mejoran la activación de Tie2 (Figura 10). Además, en presencia de un exceso de fragmento Fab, se bloquea la activación de Tie2 mediada por R15E6 (Figura 10). Sorprendentemente, el fragmento Fab de R15E6 inhibe notablemente la sobrevivencia de las células

5 endoteliales en comparación con un Fab de control (Figura 11A) y este efecto podría rescatarse mediante la adición de R15E6 intacto (Figura 11B). De acuerdo con el efecto negativo sobre la sobrevivencia endotelial, el R15E6 Fab también bloquea la migración de células endoteliales mediada por VEGF (Figura 12). Estos hallazgos demuestran que el R15E6 dimérico intacto es necesario para la potenciación de la señalización angiogénica y que el R15E6 monomérico bloquea estas acciones y, de hecho, tiene un efecto negativo sobre las respuestas de las células endoteliales angiogénicas.

10 Salvo que se indique lo contrario, se entiende que todas las cantidades, incluyendo cantidades, porcentajes, porciones y proporciones, están modificadas por la palabra "aproximadamente", y no se pretende que las cantidades indiquen dígitos significativos.

Salvo que se indique de cualquier otra manera, los artículos "un", "una" y "el" significan "uno o más".

Listado de secuencias

15 <110> Compañía The Procter & Gamble
Rotello, Rocco J
Peters, Kevin G
20 Davis, Michael G

<120> Anticuerpos que se unen a la Proteína Tirosina Fosfatasa beta humana (HPTPbeta) y sus usos

<130> 10365P2

25 <140> No asignado aún
<141> 2006-05-09

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.3

30 <210> 1
<211> 4623
<212> DNA
<213> Homo sapiens

35 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(4623)

40 <400> 1

ES 2 828 739 T3

5
atg ctg agc cat gga gcc ggg ttg gcc ttg tgg atc aca ctg agc ctg 48
Met Leu Ser His Gly Ala Gly Leu Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Leu
1 5 10 15

10
ctg cag act gga ctg gcg gag cca gag aga tgt aac ttc acc ctg gcg 96
Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
20 25 30

15
gag tcc aag gcc tcc agc cat tct gtg tct atc cag tgg aga att ttg 144
Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
35 40 45

20
ggc tca ccc tgt aac ttt agc ctc atc tat agc agt gac acc ctg ggg 192
Gly Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly
50 55 60

25
gcc gcg ttg tgc cct acc ttt cgg ata gac aac acc aca tac gga tgt 240
Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
65 70 75 80

30
aac ctt caa gat tta caa gca gga acc atc tat aac ttc aag att att 288
Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
85 90 95

35
tct ctg gat gaa gag aga act gtg gtc ttg caa aca gat cct tta cct 336
Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
100 105 110

35
cct gct agg ttt gga gtc agt aaa gag aag acg act tca acc ggc ttg 384
Pro Ala Arg Phe Gly Val Ser Lys Glu Lys Thr Thr Ser Thr Gly Leu
115 120 125

cat gtt tgg tgg act cct tct tcc gga aaa gtc acc tca tat gag gtg 432

ES 2 828 739 T3

	His	Val	Trp	Trp	Thr	Pro	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Thr	Ser	Tyr	Glu	Val	
	130						135					140					
5	caa	tta	ttt	gat	gaa	aat	aac	caa	aag	ata	cag	ggg	gtt	caa	att	caa	480
	Gln	Leu	Phe	Asp	Glu	Asn	Asn	Gln	Lys	Ile	Gln	Gly	Val	Gln	Ile	Gln	
	145					150					155				160		
10	gaa	agt	act	tca	tgg	aat	gaa	tac	act	ttt	ttc	aat	ctc	act	gct	ggt	528
	Glu	Ser	Thr	Ser	Trp	Asn	Glu	Tyr	Thr	Phe	Phe	Asn	Leu	Thr	Ala	Gly	
					165					170					175		
15	agt	aaa	tac	aat	att	gcc	atc	aca	gct	ggt	tct	gga	gga	aaa	cgt	tct	576
	Ser	Lys	Tyr	Asn	Ile	Ala	Ile	Thr	Ala	Val	Ser	Gly	Gly	Lys	Arg	Ser	
				180					185					190			
20	ttt	tca	ggt	tat	acc	aat	gga	tca	aca	gtg	cca	tct	cca	gtg	aaa	gat	624
	Phe	Ser	Val	Tyr	Thr	Asn	Gly	Thr	Val	Pro	Ser	Pro	Val	Lys	Asp		
			195				200					205					
25	att	ggt	att	tcc	aca	aaa	gcc	aat	tct	ctc	ctg	att	tcc	tgg	tcc	cat	672
	Ile	Gly	Ile	Ser	Thr	Lys	Ala	Asn	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Ser	His	
	210					215						220					
30	ggt	tct	ggg	aat	gtg	gaa	cga	tac	cgg	ctg	atg	cta	atg	gat	aaa	ggg	720
	Gly	Ser	Gly	Asn	Val	Glu	Arg	Tyr	Arg	Leu	Met	Leu	Met	Asp	Lys	Gly	
	225				230					235					240		
35	atc	cta	ggt	cat	ggc	ggt	ggt	gtg	gac	aaa	cat	gct	act	tcc	tat	gct	768
	Ile	Leu	Val	His	Gly	Gly	Val	Val	Asp	Lys	His	Ala	Thr	Ser	Tyr	Ala	
					245				250						255		
40	ttt	cac	ggg	ctg	acc	cct	ggc	tac	ctc	tac	aac	ctc	act	gtt	atg	act	816
	Phe	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Leu	Thr	Val	Met	Thr	
				260					265					270			
45	gag	gct	gca	ggg	ctg	caa	aac	tac	agg	tgg	aaa	cta	gtc	agg	aca	gcc	864
	Glu	Ala	Ala	Gly	Leu	Gln	Asn	Tyr	Arg	Trp	Lys	Leu	Val	Arg	Thr	Ala	
			275				280					285					
50	ccc	atg	gaa	gtc	tca	aat	ctg	aag	gtg	aca	aat	gat	ggc	agt	ttg	acc	912
	Pro	Met	Glu	Val	Ser	Asn	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Asp	Gly	Ser	Leu	Thr	
		290				295						300					
55	tct	cta	aaa	gtc	aaa	tgg	caa	aga	cct	cct	gga	aat	gtg	gat	tct	tac	960
	Ser	Leu	Lys	Val	Lys	Trp	Gln	Arg	Pro	Pro	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Tyr	
	305				310						315				320		
60	aat	atc	acc	ctg	tct	cac	aaa	ggg	acc	atc	aag	gaa	tcc	aga	gta	tta	1008
	Asn	Ile	Thr	Leu	Ser	His	Lys	Gly	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser	Arg	Val	Leu	
					325					330					335		
65	gca	cct	tgg	att	act	gaa	act	cac	ttt	aaa	gag	tta	gtc	ccc	ggt	cga	1056
	Ala	Pro	Trp	Ile	Thr	Glu	Thr	His	Phe	Lys	Glu	Leu	Val	Pro	Gly	Arg	
				340					345					350			
70	ctt	tat	caa	ggt	act	gtc	agc	tgt	gtc	tct	ggt	gaa	ctg	tct	gct	cag	1104
	Leu	Tyr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Cys	Val	Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Ala	Gln	
			355					360					365				
75	aag	atg	gca	gtg	ggc	aga	aca	ttc	ccc	ctg	gct	gtc	ctc	cag	ctt	cgt	1152
	Lys	Met	Ala	Val	Gly	Arg	Thr	Phe	Pro	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Leu	Arg	
		370					375					380					

ES 2 828 739 T3

	gtc aaa cat gcc aat gaa acc tca ctg agt atc atg tgg cag acc cct	1200
	Val Lys His Ala Asn Glu Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro	
	385 390 395 400	
5	gta gca gaa tgg gag aaa tac atc att tcc cta gct gac aga gac ctc	1248
	Val Ala Glu Trp Glu Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu	
	405 410 415	
10	tta ctg atc cac aag tca ctc tcc aaa gat gcc aaa gaa ttc act ttt	1296
	Leu Leu Ile His Lys Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe	
	420 425 430	
15	act gac ctg gtg cct gga cga aaa tac atg gct aca gtc acc agt att	1344
	Thr Asp Leu Val Pro Gly Arg Lys Tyr Met Ala Thr Val Thr Ser Ile	
	435 440 445	
20	agt gga gac tta aaa aat tcc tct tca gta aaa gga aga aca gtg cct	1392
	Ser Gly Asp Leu Lys Asn Ser Ser Ser Val Lys Gly Arg Thr Val Pro	
	450 455 460	
25	gcc caa gtg act gac ttg cat gtg gcc aac caa gga atg acc agt agt	1440
	Ala Gln Val Thr Asp Leu His Val Ala Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser	
	465 470 475 480	
30	ctg ttt act aac tgg acc cag gca caa gga gac gta gaa ttt tac caa	1488
	Leu Phe Thr Asn Trp Thr Gln Ala Gln Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln	
	485 490 495	
35	gtc tta ctg atc cat gaa aat gtg gtc att aaa aat gaa agc atc tcc	1536
	Val Leu Leu Ile His Glu Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser	
	500 505 510	
40	agt gag acc agc aga tac agc ttc cac tct ctc aag tcc ggc agc ctg	1584
	Ser Glu Thr Ser Arg Tyr Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu	
	515 520 525	
45	tac tcc gtg gtg gta aca aca gtg agt gga ggg atc tct tcc cga caa	1632
	Tyr Ser Val Val Val Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln	
	530 535 540	
50	gtg gtt gtg gag gga aga aca gtc cct tcc agt gtg agt gga gta acg	1680
	Val Val Val Glu Gly Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr	
	545 550 555 560	
55	gtg aac aat tcc ggt cgt aat gac tac ctc agc gtt tcc tgg ctg ctg	1728
	Val Asn Asn Ser Gly Arg Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Leu	
	565 570 575	
60	gcg ccc gga gat gtg gat aac tat gag gta aca ttg tct cat gac ggc	1776
	Ala Pro Gly Asp Val Asp Asn Tyr Glu Val Thr Leu Ser His Asp Gly	
	580 585 590	
65	aag gtg gtt cag tcc ctt gtc att gcc aag tct gtc aga gaa tgt tcc	1824
	Lys Val Val Gln Ser Leu Val Ile Ala Lys Ser Val Arg Glu Cys Ser	
	595 600 605	
70	ttc agc tcc ctc acc cca ggc cgc ctc tac acc gtg acc ata act aca	1872
	Phe Ser Ser Leu Thr Pro Gly Arg Leu Tyr Thr Val Thr Ile Thr Thr	
	610 615 620	
75	agg agt ggc aag tat gaa aat cac tcc ttc agc caa gag cgg aca gtg	1920
	Arg Ser Gly Lys Tyr Glu Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val	
	625 630 635 640	

ES 2 828 739 T3

	cct gac aaa gtc cag gga gtc agt gtt agc aac tca gcc agg agt gac	1968
	Pro Asp Lys Val Gln Gly Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp	
	645 650 655	
5	tat tta agg gta tcc tgg gtg cat gcc act gga gac ttt gat cac tat	2016
	Tyr Leu Arg Val Ser Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr	
	660 665 670	
10	gaa gtc acc att aaa aac aaa aac aac ttc att caa act aaa agc att	2064
	Glu Val Thr Ile Lys Asn Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile	
	675 680 685	
15	ccc aag tca gaa aac gaa tgt gta ttt gtt cag cta gtc cct gga cgg	2112
	Pro Lys Ser Glu Asn Glu Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg	
	690 695 700	
20	ttg tac agt gtc act gtt act aca aaa agt gga caa tat gaa gcc aat	2160
	Leu Tyr Ser Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn	
	705 710 715 720	
25	gaa caa ggg aat ggg aga aca att cca gag cct gtt aag gat cta aca	2208
	Glu Gln Gly Asn Gly Arg Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr	
	725 730 735	
30	ttg cgc aac agg agc act gag gac ttg cat gtg act tgg tca gga gct	2256
	Leu Arg Asn Arg Ser Thr Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala	
	740 745 750	
35	aat ggg gat gtc gac caa tat gag atc cag ctg ctc ttc aat gac atg	2304
	Asn Gly Asp Val Asp Gln Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met	
	755 760 765	
40	aaa gta ttt cct cct ttt cac ctt gta aat acc gca acc gag tat cga	2352
	Lys Val Phe Pro Pro Phe His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg	
	770 775 780	
45	ttt act tcc cta aca cca ggc cgc caa tac aaa att ctt gtc ttg acg	2400
	Phe Thr Ser Leu Thr Pro Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr	
	785 790 795 800	
50	att agc ggg gat gta cag cag tca gcc ttc att gag ggc ttc aca gtt	2448
	Ile Ser Gly Asp Val Gln Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val	
	805 810 815	
55	cct agt gct gtc aaa aat att cac att tct ccc aat gga gca aca gat	2496
	Pro Ser Ala Val Lys Asn Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp	
	820 825 830	
60	agc ctg acg gtg aac tgg act cct ggt ggg gga gac gtt gat tcc tac	2544
	Ser Leu Thr Val Asn Trp Thr Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr	
	835 840 845	
65	acg gtg tcg gca ttc agg cac agt caa aag gtt gac tct cag act att	2592
	Thr Val Ser Ala Phe Arg His Ser Gln Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile	
	850 855 860	
70	ccc aag cac gtc ttt gag cac acg ttc cac aga ctg gag gcc ggg gag	2640
	Pro Lys His Val Phe Glu His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Glu	
	865 870 875 880	
75	cag tac cag atc atg att gcc tca gtc agc ggg tcc ctg aag aat cag	2688
	Gln Tyr Gln Ile Met Ile Ala Ser Val Ser Gly Ser Leu Lys Asn Gln	

ES 2 828 739 T3

	885	890	895	
5	ata aat gtg gtt ggg cgg aca gtt cca gca tct gtc caa gga gta att Ile Asn Val Val Gly Arg Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Gly Val Ile 900 905 910			2736
	gca gac aat gca tac agc agt tat tcc tta ata gta agt tgg caa aaa Ala Asp Asn Ala Tyr Ser Ser Tyr Ser Leu Ile Val Ser Trp Gln Lys 915 920 925			2784
10	gct gct ggt gtg gca gaa aga tat gat atc ctg ctt cta act gaa aat Ala Ala Gly Val Ala Glu Arg Tyr Asp Ile Leu Leu Leu Thr Glu Asn 930 935 940			2832
15	gga atc ctt ctg cgc aac aca tca gag cca gcc acc act aag caa cac Gly Ile Leu Leu Arg Asn Thr Ser Glu Pro Ala Thr Thr Lys Gln His 945 950 955 960			2880
	aaa ttt gaa gat cta aca cca gcc aag aaa tac aag ata cag atc cta Lys Phe Glu Asp Leu Thr Pro Gly Lys Lys Tyr Lys Ile Gln Ile Leu 965 970 975			2928
20	act gtc agt gga ggc ctc ttt agc aag gaa gcc cag act gaa ggc cga Thr Val Ser Gly Gly Leu Phe Ser Lys Glu Ala Gln Thr Glu Gly Arg 980 985 990			2976
25	aca gtc cca gca gct gtc acc gac ctg agg atc aca gag aac tcc acc Thr Val Pro Ala Ala Val Thr Asp Leu Arg Ile Thr Glu Asn Ser Thr 995 1000 1005			3024
	agg cac ctg tcc ttc cgc tgg acc gcc tca gag ggg gag ctc agc Arg His Leu Ser Phe Arg Trp Thr Ala Ser Glu Gly Glu Leu Ser 1010 1015 1020			3069
30	tgg tac aac atc ttt ttg tac aac cca gat ggg aat ctc cag gag Trp Tyr Asn Ile Phe Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Asn Leu Gln Glu 1025 1030 1035			3114
35	aga gct caa gtt gac cca cta gtc cag agc ttc tct ttc cag aac Arg Ala Gln Val Asp Pro Leu Val Gln Ser Phe Ser Phe Gln Asn 1040 1045 1050			3159
	ttg cta caa ggc aga atg tac aag atg gtg att gta act cac agt Leu Leu Gln Gly Arg Met Tyr Lys Met Val Ile Val Thr His Ser 1055 1060 1065			3204
40	ggg gag ctg tct aat gag tct ttc ata ttt ggt aga aca gtc cca Gly Glu Leu Ser Asn Glu Ser Phe Ile Phe Gly Arg Thr Val Pro 1070 1075 1080			3249
45	gcc tct gtg agt cat ctc agg ggg tcc aat cgg aac acg aca gac Ala Ser Val Ser His Leu Arg Gly Ser Asn Arg Asn Thr Thr Asp 1085 1090 1095			3294
	agc ctt tgg ttc aac tgg agt cca gcc tct ggg gac ttt gac ttt Ser Leu Trp Phe Asn Trp Ser Pro Ala Ser Gly Asp Phe Asp Phe 1100 1105 1110			3339
50	tat gag ctg att ctc tat aat ccc aat ggc aca aag aag gaa aac Tyr Glu Leu Ile Leu Tyr Asn Pro Asn Gly Thr Lys Lys Glu Asn 1115 1120 1125			3384
55	tgg aaa gac aag gac ctg acg gag tgg cgg ttt caa ggc ctt gtt			3429

ES 2 828 739 T3

	Trp	Lys	Asp	Lys	Asp	Leu	Thr	Glu	Trp	Arg	Phe	Gln	Gly	Leu	Val	
		1130					1135					1140				
5	cct	gga	agg	aag	tac	gtg	ctg	tgg	gtg	gta	act	cac	agt	gga	gat	3474
	Pro	Gly	Arg	Lys	Tyr	Val	Leu	Trp	Val	Val	Thr	His	Ser	Gly	Asp	
		1145					1150					1155				
10	ctc	agc	aat	aaa	gtc	aca	gcg	gag	agc	aga	aca	gct	cca	agt	cct	3519
	Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Thr	Ala	Glu	Ser	Arg	Thr	Ala	Pro	Ser	Pro	
		1160					1165					1170				
15	ccc	agt	ctt	atg	tca	ttt	gct	gac	att	gca	aac	aca	tcc	ttg	gcc	3564
	Pro	Ser	Leu	Met	Ser	Phe	Ala	Asp	Ile	Ala	Asn	Thr	Ser	Leu	Ala	
		1175					1180					1185				
20	atc	acg	tgg	aaa	ggg	ccc	cca	gac	tgg	aca	gac	tac	aac	gac	ttt	3609
	Ile	Thr	Trp	Lys	Gly	Pro	Pro	Asp	Trp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Asp	Phe	
		1190					1195					1200				
25	gag	ctg	cag	tgg	ttg	ccc	aga	gat	gca	ctt	act	gtc	ttc	aac	ccc	3654
	Glu	Leu	Gln	Trp	Leu	Pro	Arg	Asp	Ala	Leu	Thr	Val	Phe	Asn	Pro	
		1205					1210					1215				
30	tac	aac	aac	aga	aaa	tca	gaa	gga	cgc	att	gtg	tat	ggg	ctt	cgt	3699
	Tyr	Asn	Asn	Arg	Lys	Ser	Glu	Gly	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Leu	Arg	
		1220					1225					1230				
35	cca	ggg	aga	tcc	tat	caa	ttc	aac	gtc	aag	act	gtc	agt	ggt	gat	3744
	Pro	Gly	Arg	Ser	Tyr	Gln	Phe	Asn	Val	Lys	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	
		1235					1240					1245				
40	tcc	tgg	aaa	act	tac	agc	aaa	cca	att	ttt	gga	tct	gtg	agg	aca	3789
	Ser	Trp	Lys	Thr	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ile	Phe	Gly	Ser	Val	Arg	Thr	
		1250					1255					1260				
45	aag	cct	gac	aag	ata	caa	aac	ctg	cat	tgc	cgg	cct	cag	aac	tcc	3834
	Lys	Pro	Asp	Lys	Ile	Gln	Asn	Leu	His	Cys	Arg	Pro	Gln	Asn	Ser	
		1265					1270					1275				
50	acg	gcc	att	gcc	tgt	tct	tgg	atc	cct	cct	gat	tct	gac	ttt	gat	3879
	Thr	Ala	Ile	Ala	Cys	Ser	Trp	Ile	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Phe	Asp	
		1280					1285					1290				
55	ggt	tat	agt	att	gaa	tgc	cgg	aaa	atg	gac	acc	caa	gaa	gtt	gag	3924
	Gly	Tyr	Ser	Ile	Glu	Cys	Arg	Lys	Met	Asp	Thr	Gln	Glu	Val	Glu	
		1295					1300					1305				
60	ttt	tcc	aga	aag	ctg	gag	aaa	gaa	aaa	tct	ctg	ctc	aac	atc	atg	3969
	Phe	Ser	Arg	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ile	Met	
		1310					1315					1320				
65	atg	cta	gtg	ccc	cat	aag	agg	tac	ctg	gtg	tcc	atc	aaa	gtg	cag	4014
	Met	Leu	Val	Pro	His	Lys	Arg	Tyr	Leu	Val	Ser	Ile	Lys	Val	Gln	
		1325					1330					1335				
70	tcg	gcc	ggc	atg	acc	agc	gag	gtg	gtt	gaa	gac	agc	act	atc	aca	4059
	Ser	Ala	Gly	Met	Thr	Ser	Glu	Val	Val	Glu	Asp	Ser	Thr	Ile	Thr	
		1340					1345					1350				
75	atg	ata	gac	cgc	ccc	cct	cct	cca	ccc	cca	cac	att	cgt	gtg	aat	4104
	Met	Ile	Asp	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	His	Ile	Arg	Val	Asn	
		1355					1360					1365				

ES 2 828 739 T3

	gaa aag gat gtg cta att agc aag tct tcc atc aac ttt act gtc	4149
	Glu Lys Asp Val Leu Ile Ser Lys Ser Ser Ile Asn Phe Thr Val	
	1370 1375 1380	
5	aac tgc agc tgg ttc agc gac acc aat gga gct gtg aaa tac ttc	4194
	Asn Cys Ser Trp Phe Ser Asp Thr Asn Gly Ala Val Lys Tyr Phe	
	1385 1390 1395	
10	aca gtg gtg gtg aga gag gct gat ggc agt gat gag ctg aag cca	4239
	Thr Val Val Val Arg Glu Ala Asp Gly Ser Asp Glu Leu Lys Pro	
	1400 1405 1410	
15	gaa cag cag cac cct ctc cct tcc tac ctg gag tac agg cac aat	4284
	Glu Gln Gln His Pro Leu Pro Ser Tyr Leu Glu Tyr Arg His Asn	
	1415 1420 1425	
20	gcc tcc att cgg gtg tat cag act aat tat ttt gcc agc aaa tgt	4329
	Ala Ser Ile Arg Val Tyr Gln Thr Asn Tyr Phe Ala Ser Lys Cys	
	1430 1435 1440	
25	gcc gaa aat cct aac agc aac tcc aag agt ttt aac att aag ctt	4374
	Ala Glu Asn Pro Asn Ser Asn Ser Lys Ser Phe Asn Ile Lys Leu	
	1445 1450 1455	
30	gga gca gag atg gag agc cta ggt gga aaa tgc gat ccc act cag	4419
	Gly Ala Glu Met Glu Ser Leu Gly Gly Lys Cys Asp Pro Thr Gln	
	1460 1465 1470	
35	caa aaa ttc tgt gat gga cca ctg aag cca cac act gcc tac aga	4464
	Gln Lys Phe Cys Asp Gly Pro Leu Lys Pro His Thr Ala Tyr Arg	
	1475 1480 1485	
40	atc agc att cga gct ttt aca cag ctc ttt gat gag gac ctg aag	4509
	Ile Ser Ile Arg Ala Phe Thr Gln Leu Phe Asp Glu Asp Leu Lys	
	1490 1495 1500	
45	gaa ttc aca aag cca ctc tat tca gac aca ttt ttt tct tta ccc	4554
	Glu Phe Thr Lys Pro Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Phe Ser Leu Pro	
	1505 1510 1515	
50	atc act act gaa tca gag ccc ttg ttt gga gct att gaa cgc ggc	4599
	Ile Thr Thr Glu Ser Glu Pro Leu Phe Gly Ala Ile Glu Arg Gly	
	1520 1525 1530	
55	cgc cat cat cat cat cac gga	4623
	Arg His His His His His Gly	
	1535 1540	
60	<210> 2	
	<211> 1541	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
65	<400> 2	
70	Met Leu Ser His Gly Ala Gly Leu Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Leu	
	1 5 10 15	
75	Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala	
	20 25 30	

ES 2 828 739 T3

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

ES 2 828 739 T3

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr
 290 295 300
 5
 Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320
 10
 Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu
 325 330 335
 Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350
 15
 Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln
 355 360 365
 20
 Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg
 370 375 380
 25
 Val Lys His Ala Asn Glu Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro
 385 390 395 400
 Val Ala Glu Trp Glu Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu
 405 410 415
 30
 Leu Leu Ile His Lys Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe
 420 425 430
 35
 Thr Asp Leu Val Pro Gly Arg Lys Tyr Met Ala Thr Val Thr Ser Ile
 435 440 445
 40
 Ser Gly Asp Leu Lys Asn Ser Ser Ser Val Lys Gly Arg Thr Val Pro
 450 455 460
 Ala Gln Val Thr Asp Leu His Val Ala Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser
 465 470 475 480
 45
 Leu Phe Thr Asn Trp Thr Gln Ala Gln Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln
 485 490 495
 50
 Val Leu Leu Ile His Glu Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser
 500 505 510
 Ser Glu Thr Ser Arg Tyr Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu
 515 520 525
 55
 Tyr Ser Val Val Val Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln

60

65

ES 2 828 739 T3

	530					535										540			
5	Val 545	Val	Val	Glu	Gly	Arg 550	Thr	Val	Pro	Ser	Ser 555	Val	Ser	Gly	Val	Thr 560			
		Val	Asn	Asn	Ser	Gly 565	Arg	Asn	Asp	Tyr	Leu 570	Ser	Val	Ser	Trp	Leu 575	Leu		
10	Ala	Pro	Gly	Asp	Val	Asp	Asn	Tyr	Glu 585	Val	Thr	Leu	Ser	His 590	Asp	Gly			
15	Lys	Val	Val	Gln	Ser	Leu	Val	Ile 600	Ala	Lys	Ser	Val	Arg 605	Glu	Cys	Ser			
20	Phe 610	Ser	Ser	Leu	Thr	Pro	Gly 615	Arg	Leu	Tyr	Thr	Val 620	Thr	Ile	Thr	Thr			
	Arg 625	Ser	Gly	Lys	Tyr	Glu 630	Asn	His	Ser	Phe	Ser 635	Gln	Glu	Arg	Thr	Val 640			
25	Pro	Asp	Lys	Val	Gln	Gly 645	Val	Ser	Val	Ser 650	Asn	Ser	Ala	Arg	Ser 655	Asp			
30	Tyr	Leu	Arg	Val	Ser	Trp 660	Val	His	Ala 665	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp 670	His	Tyr			
35	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Asn	Lys	Asn 680	Asn	Phe	Ile	Gln	Thr 685	Lys	Ser	Ile			
40	Pro	Lys 690	Ser	Glu	Asn	Glu	Cys 695	Val	Phe	Val	Gln	Leu 700	Val	Pro	Gly	Arg			
45	Leu 705	Tyr	Ser	Val	Thr	Val 710	Thr	Thr	Lys	Ser	Gly 715	Gln	Tyr	Glu	Ala	Asn 720			
	Glu	Gln	Gly	Asn	Gly 725	Arg	Thr	Ile	Pro	Glu 730	Pro	Val	Lys	Asp	Leu 735	Thr			
50	Leu	Arg	Asn	Arg	Ser	Thr	Glu	Asp 740	Leu 745	His	Val	Thr	Trp	Ser 750	Gly	Ala			
55	Asn	Gly	Asp 755	Val	Asp	Gln	Tyr	Glu 760	Ile	Gln	Leu	Leu	Phe 765	Asn	Asp	Met			
60	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Phe	His 770	Leu 775	Val	Asn	Thr	Ala 780	Thr	Glu	Tyr	Arg			
65																			

ES 2 828 739 T3

Phe Thr Ser Leu Thr Pro Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr
 785 790 795 800

 5 Ile Ser Gly Asp Val Gln Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val
 805 810 815

 10 Pro Ser Ala Val Lys Asn Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp
 820 825 830

 15 Ser Leu Thr Val Asn Trp Thr Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr
 835 840 845

 20 Thr Val Ser Ala Phe Arg His Ser Gln Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile
 850 855 860

 25 Pro Lys His Val Phe Glu His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Glu
 865 870 875 880

 30 Gln Tyr Gln Ile Met Ile Ala Ser Val Ser Gly Ser Leu Lys Asn Gln
 885 890 895

 35 Ile Asn Val Val Gly Arg Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Gly Val Ile
 900 905 910

 40 Ala Asp Asn Ala Tyr Ser Ser Tyr Ser Leu Ile Val Ser Trp Gln Lys
 915 920 925

 45 Ala Ala Gly Val Ala Glu Arg Tyr Asp Ile Leu Leu Leu Thr Glu Asn
 930 935 940

 50 Gly Ile Leu Leu Arg Asn Thr Ser Glu Pro Ala Thr Thr Lys Gln His
 945 950 955 960

 55 Lys Phe Glu Asp Leu Thr Pro Gly Lys Lys Tyr Lys Ile Gln Ile Leu
 965 970 975

 60 Thr Val Ser Gly Gly Leu Phe Ser Lys Glu Ala Gln Thr Glu Gly Arg
 980 985 990

 65 Thr Val Pro Ala Ala Val Thr Asp Leu Arg Ile Thr Glu Asn Ser Thr
 995 1000 1005

 Arg His Leu Ser Phe Arg Trp Thr Ala Ser Glu Gly Glu Leu Ser
 1010 1015 1020

 Trp Tyr Asn Ile Phe Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Asn Leu Gln Glu
 1025 1030 1035

ES 2 828 739 T3

	Arg	Ala	Gln	Val	Asp	Pro	Leu	Val	Gln	Ser	Phe	Ser	Phe	Gln	Asn
		1040					1045					1050			
5	Leu	Leu	Gln	Gly	Arg	Met	Tyr	Lys	Met	Val	Ile	Val	Thr	His	Ser
		1055					1060					1065			
	Gly	Glu	Leu	Ser	Asn	Glu	Ser	Phe	Ile	Phe	Gly	Arg	Thr	Val	Pro
10		1070					1075					1080			
	Ala	Ser	Val	Ser	His	Leu	Arg	Gly	Ser	Asn	Arg	Asn	Thr	Thr	Asp
		1085					1090					1095			
15	Ser	Leu	Trp	Phe	Asn	Trp	Ser	Pro	Ala	Ser	Gly	Asp	Phe	Asp	Phe
		1100					1105					1110			
	Tyr	Glu	Leu	Ile	Leu	Tyr	Asn	Pro	Asn	Gly	Thr	Lys	Lys	Glu	Asn
20		1115					1120					1125			
	Trp	Lys	Asp	Lys	Asp	Leu	Thr	Glu	Trp	Arg	Phe	Gln	Gly	Leu	Val
		1130					1135					1140			
25	Pro	Gly	Arg	Lys	Tyr	Val	Leu	Trp	Val	Val	Thr	His	Ser	Gly	Asp
		1145					1150					1155			
	Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Thr	Ala	Glu	Ser	Arg	Thr	Ala	Pro	Ser	Pro
30		1160					1165					1170			
	Pro	Ser	Leu	Met	Ser	Phe	Ala	Asp	Ile	Ala	Asn	Thr	Ser	Leu	Ala
35		1175					1180					1185			
	Ile	Thr	Trp	Lys	Gly	Pro	Pro	Asp	Trp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Asp	Phe
		1190					1195					1200			
40	Glu	Leu	Gln	Trp	Leu	Pro	Arg	Asp	Ala	Leu	Thr	Val	Phe	Asn	Pro
		1205					1210					1215			
	Tyr	Asn	Asn	Arg	Lys	Ser	Glu	Gly	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Leu	Arg
45		1220					1225					1230			
	Pro	Gly	Arg	Ser	Tyr	Gln	Phe	Asn	Val	Lys	Thr	Val	Ser	Gly	Asp
		1235					1240					1245			
50	Ser	Trp	Lys	Thr	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ile	Phe	Gly	Ser	Val	Arg	Thr
		1250					1255					1260			
	Lys	Pro	Asp	Lys	Ile	Gln	Asn	Leu	His	Cys	Arg	Pro	Gln	Asn	Ser
55		1265					1270					1275			
60															
65															

ES 2 828 739 T3

Thr Ala Ile Ala Cys Ser Trp Ile Pro Pro Asp Ser Asp Phe Asp
 1280 1285 1290
 5 Gly Tyr Ser Ile Glu Cys Arg Lys Met Asp Thr Gln Glu Val Glu
 1295 1300 1305
 Phe Ser Arg Lys Leu Glu Lys Glu Lys Ser Leu Leu Asn Ile Met
 1310 1315 1320
 10 Met Leu Val Pro His Lys Arg Tyr Leu Val Ser Ile Lys Val Glu
 1325 1330 1335
 Ser Ala Gly Met Thr Ser Glu Val Val Glu Asp Ser Thr Ile Thr
 1340 1345 1350
 15 Met Ile Asp Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ile Arg Val Asn
 1355 1360 1365
 Glu Lys Asp Val Leu Ile Ser Lys Ser Ser Ile Asn Phe Thr Val
 1370 1375 1380
 20 Asn Cys Ser Trp Phe Ser Asp Thr Asn Gly Ala Val Lys Tyr Phe
 1385 1390 1395
 Thr Val Val Val Arg Glu Ala Asp Gly Ser Asp Glu Leu Lys Pro
 1400 1405 1410
 25 Glu Gln Gln His Pro Leu Pro Ser Tyr Leu Glu Tyr Arg His Asn
 1415 1420 1425
 Ala Ser Ile Arg Val Tyr Gln Thr Asn Tyr Phe Ala Ser Lys Cys
 1430 1435 1440
 30 Ala Glu Asn Pro Asn Ser Asn Ser Lys Ser Phe Asn Ile Lys Leu
 1445 1450 1455
 Gly Ala Glu Met Glu Ser Leu Gly Gly Lys Cys Asp Pro Thr Gln
 1460 1465 1470
 35 Gln Lys Phe Cys Asp Gly Pro Leu Lys Pro His Thr Ala Tyr Arg
 1475 1480 1485
 Ile Ser Ile Arg Ala Phe Thr Gln Leu Phe Asp Glu Asp Leu Lys
 1490 1495 1500
 40 Glu Phe Thr Lys Pro Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Phe Ser Leu Pro
 1505 1510 1515
 45 Ile Thr Thr Glu Ser Glu Pro Leu Phe Gly Ala Ile Glu Arg Gly
 1520 1525 1530
 Arg His His His His His His Gly
 1535 1540
 50
 55
 60
 65

<210> 3

ES 2 828 739 T3

<211> 1621
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 3

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

ES 2 828 739 T3

Met Asp Asp Thr Gly Leu Val Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Val Glu Val
 435 440 445

5 Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Lys Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly Arg
 450 455 460

Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn Glu
 465 470 475 480

10 Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro Val Ala Glu Trp Glu Lys
 485 490 495

15 Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu Leu Leu Ile His Lys Ser
 500 505 510

20 Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Val Pro Gly
 515 520 525

Arg Lys Tyr Met Ala Thr Val Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu Lys Asn
 530 535 540

25 Ser Ser Ser Val Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp Leu
 545 550 555 560

30 His Val Ala Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp Thr
 565 570 575

35 Gln Ala Gln Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His Glu
 580 585 590

Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser Ser Glu Thr Ser Arg Tyr
 595 600 605

40 Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val Thr
 610 615 620

45 Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Val Glu Gly Arg
 625 630 635 640

Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly Arg
 645 650 655

50 Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Leu Ala Pro Gly Asp Val Asp
 660 665 670

55 Asn Tyr Glu Val Thr Leu Ser His Asp Gly Lys Val Val Gln Ser Leu
 675 680 685

60

65

ES 2 828 739 T3

Val Ile Ala Lys Ser Val Arg Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr Pro
 690 695 700
 5 Gly Arg Leu Tyr Thr Val Thr Ile Thr Thr Arg Ser Gly Lys Tyr Glu
 705 710 715
 10 Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln Gly
 725 730 735
 Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Arg Val Ser Trp
 740 745 750
 15 Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys Asn
 755 760 765
 20 Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile Pro Lys Ser Glu Asn Glu
 770 775 780
 Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr Val
 785 790 795 800
 25 Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn Glu Gln Gly Asn Gly Arg
 805 810 815
 30 Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Arg Asn Arg Ser Thr
 820 825 830
 35 Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala Asn Gly Asp Val Asp Gln
 835 840 845
 Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro Pro Phe
 850 855 860
 40 His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Thr Pro
 865 870 875 880
 45 Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val Gln
 885 890 895
 Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Ala Val Lys Asn
 900 905 910
 50 Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp Ser Leu Thr Val Asn Trp
 915 920 925
 55 Thr Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Thr Val Ser Ala Phe Arg
 930 935 940
 60
 65

ES 2 828 739 T3

His Ser Gln Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile Pro Lys His Val Phe Glu
 945 950 955 960

 5 His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Glu Gln Tyr Gln Ile Met Ile
 965 970 975

 Ala Ser Val Ser Gly Ser Leu Lys Asn Gln Ile Asn Val Val Gly Arg
 980 985 990

 10 Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Gly Val Ile Ala Asp Asn Ala Tyr Ser
 995 1000 1005

 15 Ser Tyr Ser Leu Ile Val Ser Trp Gln Lys Ala Ala Gly Val Ala
 1010 1015 1020

 20 Glu Arg Tyr Asp Ile Leu Leu Leu Thr Glu Asn Gly Ile Leu Leu
 1025 1030 1035

 Arg Asn Thr Ser Glu Pro Ala Thr Thr Lys Gln His Lys Phe Glu
 1040 1045 1050

 25 Asp Leu Thr Pro Gly Lys Lys Tyr Lys Ile Gln Ile Leu Thr Val
 1055 1060 1065

 30 Ser Gly Gly Leu Phe Ser Lys Glu Ala Gln Thr Glu Gly Arg Thr
 1070 1075 1080

 Val Pro Ala Ala Val Thr Asp Leu Arg Ile Thr Glu Asn Ser Thr
 1085 1090 1095

 35 Arg His Leu Ser Phe Arg Trp Thr Ala Ser Glu Gly Glu Leu Ser
 1100 1105 1110

 40 Trp Tyr Asn Ile Phe Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Asn Leu Gln Glu
 1115 1120 1125

 Arg Ala Gln Val Asp Pro Leu Val Gln Ser Phe Ser Phe Gln Asn
 1130 1135 1140

 Leu Leu Gln Gly Arg Met Tyr Lys Met Val Ile Val Thr His Ser
 1145 1150 1155

 50 Gly Glu Leu Ser Asn Glu Ser Phe Ile Phe Gly Arg Thr Val Pro
 1160 1165 1170

 55 Ala Ser Val Ser His Leu Arg Gly Ser Asn Arg Asn Thr Thr Asp

60

65

ES 2 828 739 T3

	1175		1180		1185										
5	Ser	Leu	Trp	Phe	Asn	Trp	Ser	Pro	Ala	Ser	Gly	Asp	Phe	Asp	Phe
	1190						1195					1200			
10	Tyr	Glu	Leu	Ile	Leu	Tyr	Asn	Pro	Asn	Gly	Thr	Lys	Lys	Glu	Asn
	1205						1210					1215			
15	Trp	Lys	Asp	Lys	Asp	Leu	Thr	Glu	Trp	Arg	Phe	Gln	Gly	Leu	Val
	1220						1225					1230			
20	Pro	Gly	Arg	Lys	Tyr	Val	Leu	Trp	Val	Val	Thr	His	Ser	Gly	Asp
	1235						1240					1245			
25	Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Thr	Ala	Glu	Ser	Arg	Thr	Ala	Pro	Ser	Pro
	1250						1255					1260			
30	Pro	Ser	Leu	Met	Ser	Phe	Ala	Asp	Ile	Ala	Asn	Thr	Ser	Leu	Ala
	1265						1270					1275			
35	Ile	Thr	Trp	Lys	Gly	Pro	Pro	Asp	Trp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Asp	Phe
	1280						1285					1290			
40	Glu	Leu	Gln	Trp	Leu	Pro	Arg	Asp	Ala	Leu	Thr	Val	Phe	Asn	Pro
	1295						1300					1305			
45	Tyr	Asn	Asn	Arg	Lys	Ser	Glu	Gly	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Leu	Arg
	1310						1315					1320			
50	Pro	Gly	Arg	Ser	Tyr	Gln	Phe	Asn	Val	Lys	Thr	Val	Ser	Gly	Asp
	1325						1330					1335			
55	Ser	Trp	Lys	Thr	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ile	Phe	Gly	Ser	Val	Arg	Thr
	1340						1345					1350			
60	Lys	Pro	Asp	Lys	Ile	Gln	Asn	Leu	His	Cys	Arg	Pro	Gln	Asn	Ser
	1355						1360					1365			
65	Thr	Ala	Ile	Ala	Cys	Ser	Trp	Ile	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Phe	Asp
	1370						1375					1380			
70	Gly	Tyr	Ser	Ile	Glu	Cys	Arg	Lys	Met	Asp	Thr	Gln	Glu	Val	Glu
	1385						1390					1395			
75	Phe	Ser	Arg	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ile	Met
	1400						1405					1410			

ES 2 828 739 T3

	Met	Leu	Val	Pro	His	Lys	Arg	Tyr	Leu	Val	Ser	Ile	Lys	Val	Gln
		1415					1420					1425			
5	Ser	Ala	Gly	Met	Thr	Ser	Glu	Val	Val	Glu	Asp	Ser	Thr	Ile	Thr
		1430					1435					1440			
10	Met	Ile	Asp	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	His	Ile	Arg	Val	Asn
		1445					1450					1455			
15	Glu	Lys	Asp	Val	Leu	Ile	Ser	Lys	Ser	Ser	Ile	Asn	Phe	Thr	Val
		1460					1465					1470			
20	Asn	Cys	Ser	Trp	Phe	Ser	Asp	Thr	Asn	Gly	Ala	Val	Lys	Tyr	Phe
		1475					1480					1485			
25	Thr	Val	Val	Val	Arg	Glu	Ala	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Leu	Lys	Pro
		1490					1495					1500			
30	Glu	Gln	Gln	His	Pro	Leu	Pro	Ser	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Arg	His	Asn
		1505					1510					1515			
35	Ala	Ser	Ile	Arg	Val	Tyr	Gln	Thr	Asn	Tyr	Phe	Ala	Ser	Lys	Cys
		1520					1525					1530			
40	Ala	Glu	Asn	Pro	Asn	Ser	Asn	Ser	Lys	Ser	Phe	Asn	Ile	Lys	Leu
		1535					1540					1545			
45	Gly	Ala	Glu	Met	Glu	Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Arg	Asp	Pro	Thr	Gln
		1550					1555					1560			
50	Gln	Lys	Phe	Cys	Asp	Gly	Pro	Leu	Lys	Pro	His	Thr	Ala	Tyr	Arg
		1565					1570					1575			
55	Ile	Ser	Ile	Arg	Ala	Phe	Thr	Gln	Leu	Phe	Asp	Glu	Asp	Leu	Lys
		1580					1585					1590			
60	Glu	Phe	Thr	Lys	Pro	Leu	Tyr	Ser	Asp	Thr	Phe	Phe	Ser	Leu	Pro
		1595					1600					1605			
65	Ile	Thr	Thr	Glu	Ser	Glu	Pro	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Glu		
		1610					1615					1620			

<210> 4
 <211> 775
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

ES 2 828 739 T3

Phe His Gly Leu Thr Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr
 260 265 270
 5
 Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
 275 280 285
 Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr
 290 295 300
 10
 Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320
 15
 Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu
 325 330 335
 Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350
 20
 Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln
 355 360 365
 25
 Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg
 370 375 380
 30
 Val Lys His Ala Asn Glu Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro
 385 390 395 400
 Val Ala Glu Trp Glu Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu
 405 410 415
 35
 Leu Leu Ile His Lys Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe
 420 425 430
 40
 Thr Asp Leu Val Pro Gly Arg Lys Tyr Met Ala Thr Val Thr Ser Ile
 435 440 445
 Ser Gly Asp Leu Lys Asn Ser Ser Ser Val Lys Gly Arg Thr Val Pro
 450 455 460
 45
 Ala Gln Val Thr Asp Leu His Val Ala Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser
 465 470 475 480
 50
 Leu Phe Thr Asn Trp Thr Gln Ala Gln Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln
 485 490 495
 55
 Val Leu Leu Ile His Glu Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser
 500 505 510

60

65

ES 2 828 739 T3

Ser Glu Thr Ser Arg Tyr Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu
 515 520 525
 5 Tyr Ser Val Val Val Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln
 530 535 540
 10 Val Val Val Glu Gly Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr
 545 550 555 560
 15 Val Asn Asn Ser Gly Arg Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Leu
 565 570 575
 20 Ala Pro Gly Asp Val Asp Asn Tyr Glu Val Thr Leu Ser His Asp Gly
 580 585 590
 25 Lys Val Val Gln Ser Leu Val Ile Ala Lys Ser Val Arg Glu Cys Ser
 595 600 605
 30 Phe Ser Ser Leu Thr Pro Gly Arg Leu Tyr Thr Val Thr Ile Thr Thr
 610 615 620
 35 Arg Ser Gly Lys Tyr Glu Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val
 625 630 635 640
 40 Pro Asp Lys Val Gln Gly Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp
 645 650 655
 45 Tyr Leu Arg Val Ser Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr
 660 665 670
 50 Glu Val Thr Ile Lys Asn Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile
 675 680 685
 55 Pro Lys Ser Glu Asn Glu Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg
 690 695 700
 60 Leu Tyr Ser Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn
 705 710 715 720
 65 Glu Gln Gly Asn Gly Arg Thr Ile Pro Glu Lys Gly Asn Ser Ala Asp
 725 730 735
 70 Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu
 740 745 750
 75 Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr
 755 760 765
 80 Gly His His His His His His
 770 775

<210> 5
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 828 739 T3

<400> 5

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

50

55

60

65

ES 2 828 739 T3

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

ES 2 828 739 T3

Asp Leu Gly Ile Ser Pro Asn Pro Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser
 210 215 220
 5 Arg Gly Ser Gly Asn Val Glu Gln Tyr Arg Leu Val Leu Met Asp Lys
 225 230 235
 Gly Ala Ile Val Gln Asp Thr Asn Val Asp Arg Arg Asp Thr Ser Tyr
 245 250 255
 10 Ala Phe His Glu Leu Thr Pro Gly His Leu Tyr Asn Leu Thr Ile Val
 260 265 270
 15 Thr Met Ala Ser Gly Leu Gln Asn Ser Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr
 275 280 285
 20 Ala Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Arg Leu
 290 295 300
 Thr Ser Leu Asn Val Lys Trp Gln Lys Pro Pro Gly Asp Val Asp Ser
 305 310 315
 25 Tyr Ser Ile Thr Leu Ser His Gln Gly Thr Ile Lys Glu Ser Lys Thr
 325 330 335
 30 Leu Ala Pro Pro Val Thr Glu Thr Gln Phe Lys Asp Leu Val Pro Gly
 340 345 350
 35 Arg Leu Tyr Gln Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Gly Glu Leu Ser Ala
 355 360 365
 Glu Lys Ser Ala Ala Gly Arg Thr Val Pro Glu Lys Val Arg Asn Leu
 370 375 380
 40 Val Ser Tyr Asn Glu Ile Trp Met Lys Ser Phe Thr Val Asn Trp Thr
 385 390 395 400
 45 Pro Pro Ala Gly Asp Trp Glu His Tyr Arg Ile Val Leu Phe Asn Glu
 405 410 415
 Ser Leu Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr His Tyr
 420 425 430
 50 Ala Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ile Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Ile Glu
 435 440 445
 55 Val Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Arg Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly
 450 455 460

60

65

ES 2 828 739 T3

Arg Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn
 465 470 475 480

 5 Glu Thr Ser Leu Gly Ile Thr Trp Arg Ala Pro Leu Gly Glu Trp Glu
 485 490 495

 10 Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Met Asp Arg Glu Leu Leu Val Ile His Lys
 500 505 510

 Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Met Pro
 515 520 525

 15 Gly Arg Asn Tyr Lys Ala Thr Val Thr Ser Met Ser Gly Asp Leu Lys
 530 535 540

 20 Gln Ser Ser Ser Ile Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp
 545 550 555 560

 Leu His Val Asn Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp
 565 570 575

 25 Thr Lys Ala Leu Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His
 580 585 590

 30 Glu Asn Val Val Val Lys Asn Glu Ser Val Ser Ser Asp Thr Ser Arg
 595 600 605

 Tyr Ser Phe Arg Ala Leu Lys Pro Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val
 610 615 620

 35 Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Ala Glu Gly
 625 630 635 640

 40 Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly
 645 650 655

 45 Arg Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Pro Ala Pro Gly Glu Val
 660 665 670

 Asp His Tyr Val Val Ser Leu Ser His Glu Gly Lys Val Asp Gln Phe
 675 680 685

 50 Leu Ile Ile Ala Lys Ser Val Ser Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr
 690 695 700

 55 Pro Gly Arg Leu Tyr Asn Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Asn Tyr
 705 710 715 720

 60

 65

ES 2 828 739 T3

Ala Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln
725 730 735

5 Gly Ile Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Lys Val Ser
740 745 750

10 Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys
755 760 765

15 Asn Arg Glu Ser Phe Ile Gln Thr Lys Thr Ile Pro Lys Ser Glu Asn
770 775 780

20 Glu Cys Glu Phe Ile Glu Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr
785 790 795 800

25 Val Ser Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Ser Glu Gln Gly Thr Gly
805 810 815

30 Arg Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Leu Asn Arg Ser
820 825 830

35 Thr Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Arg Ala Asn Gly Asp Val Asp
835 840 845

40 Gln Tyr Glu Val Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro His
850 855 860

45 Ile His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Thr
865 870 875 880

50 Pro Gly Arg His Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val
885 890 895

55 Gln Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Leu Thr Val Pro Ser Thr Val Lys
900 905 910

60 Asn Ile His Ile Ser Ala Asn Gly Ala Thr Asp Arg Leu Met Val Thr
915 920 925

65 Trp Ser Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Val Val Ser Ala Phe
930 935 940

Arg Gln Asp Glu Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile Pro Lys His Ala Ser
945 950 955 960

Glu His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Ala Lys Tyr Arg Ile Ala

ES 2 828 739 T3

Phe Tyr Glu Leu Ile Leu Tyr Asn Pro Asn Gly Thr Lys Lys Glu
 1205 1210 1215
 5 Asn Trp Lys Glu Lys Asp Val Thr Glu Trp Arg Phe Gln Gly Leu
 1220 1225 1230
 10 Val Pro Gly Arg Lys Tyr Thr Leu Tyr Val Val Thr His Ser Gly
 1235 1240 1245
 15 Asp Leu Ser Asn Lys Val Thr Gly Glu Gly Arg Thr Ala Pro Ser
 1250 1255 1260
 20 Ala Ile Thr Trp Lys Gly Pro Pro Asp Trp Thr Asp Tyr Asn Asp
 1280 1285 1290
 25 Phe Glu Leu Gln Trp Phe Pro Gly Asp Ala Leu Thr Ile Phe Asn
 1295 1300 1305
 30 Pro Tyr Ser Ser Arg Lys Ser Glu Gly Arg Ile Val Tyr Gly Leu
 1310 1315 1320
 35 His Pro Gly Arg Ser Tyr Gln Phe Ser Val Lys Thr Val Ser Gly
 1325 1330 1335
 40 Asp Ser Trp Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Ile Ser Gly Ser Val Arg
 1340 1345 1350
 45 Thr Lys Pro Asp Lys Ile Gln Asn Leu His Cys Arg Pro Gln Asn
 1355 1360 1365
 50 Ser Thr Ala Ile Ala Cys Ser Trp Ile Pro Pro Asp Ser Asp Phe
 1370 1375 1380
 55 Asp Gly Tyr Ser Ile Glu Cys Arg Lys Met Asp Thr Gln Glu Ile
 1385 1390 1395
 60 Glu Phe Ser Arg Lys Leu Glu Lys Glu Lys Ser Leu Leu Asn Ile
 1400 1405 1410
 65 Met Met Leu Val Pro His Lys Arg Tyr Leu Val Ser Ile Lys Val
 1415 1420 1425
 Gln Ser Ala Gly Met Thr Ser Glu Val Val Glu Asp Ser Thr Ile
 1430 1435 1440

ES 2 828 739 T3

Thr Met Ile Asp Arg Pro Pro Gln Pro Pro Pro His Ile Arg Val
 1445 1450 1455
 5 Asn Glu Lys Asp Val Leu Ile Ser Lys Ser Ser Ile Asn Phe Thr
 1460 1465 1470
 10 Val Asn Cys Ser Trp Phe Ser Asp Thr Asn Gly Ala Val Lys Tyr
 1475 1480 1485
 Phe Ala Val Val Val Arg Glu Ala Asp Ser Met Asp Glu Leu Lys
 1490 1495 1500
 15 Pro Glu Gln Gln His Pro Leu Pro Ser Tyr Leu Glu Tyr Arg His
 1505 1510 1515
 20 Asn Ala Ser Ile Arg Val Tyr Gln Thr Asn Tyr Phe Ala Ser Lys
 1520 1525 1530
 Cys Ala Glu Ser Pro Asp Ser Ser Ser Lys Ser Phe Asn Ile Lys
 1535 1540 1545
 25 Leu Gly Ala Glu Met Asp Ser Leu Gly Gly Lys Cys Asp Pro Ser
 1550 1555 1560
 30 Gln Gln Lys Phe Cys Asp Gly Pro Leu Lys Pro His Thr Ala Tyr
 1565 1570 1575
 35 Arg Ile Ser Ile Arg Ala Phe Thr Gln Leu Phe Asp Glu Asp Leu
 1580 1585 1590
 Lys Glu Phe Thr Lys Pro Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Phe Ser Met
 1595 1600 1605
 40 Pro Ile Thr Thr Glu Ser Glu Pro Leu Phe Gly Val Ile Glu Arg
 1610 1615 1620
 45 Gly Arg His His His His His His Gly
 1625 1630

<210> 8

<211> 774

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

<223> molécula quimérica humano-ratón

55 <400> 8

60

65

ES 2 828 739 T3

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

ES 2 828 739 T3

Phe His Glu Leu Thr Pro Gly His Leu Tyr Asn Leu Thr Ile Val Thr
 260 265 270
 5 Met Ala Ser Gly Leu Gln Asn Ser Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
 275 280 285
 10 Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Arg Leu Thr
 290 295 300
 15 Ser Leu Asn Val Lys Trp Gln Lys Pro Pro Gly Asp Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320
 20 Ala Pro Pro Val Thr Glu Thr Gln Phe Lys Asp Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350
 25 Leu Tyr Gln Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Gly Glu Leu Ser Ala Glu
 355 360 365
 30 Lys Ser Ala Ala Gly Arg Thr Val Pro Glu Lys Val Arg Asn Leu Val
 370 375 380
 35 Pro Ala Gly Asp Trp Glu His Tyr Arg Ile Val Leu Phe Asn Glu Ser
 405 410 415
 40 Leu Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr His Tyr Ala
 420 425 430
 45 Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Arg Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly Arg
 450 455 460
 50 Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn Glu
 465 470 475 480
 55 Tyr Ile Ile Ser Leu Met Asp Arg Glu Leu Leu Val Ile His Lys Ser
 500 505 510

ES 2 828 739 T3

Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Met Pro Gly
 515 520 525
 5 Arg Asn Tyr Lys Ala Thr Val Thr Ser Met Ser Gly Asp Leu Lys Gln
 530 535 540
 10 Ser Ser Ser Ile Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp Leu
 545 550 555 560
 15 His Val Asn Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp Thr
 565 570 575
 20 Lys Ala Leu Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His Glu
 580 585 590
 25 Asn Val Val Val Lys Asn Glu Ser Val Ser Ser Asp Thr Ser Arg Tyr
 595 600 605
 30 Ser Phe Arg Ala Leu Lys Pro Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val Thr
 610 615 620
 35 Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Ala Glu Gly Arg
 625 630 635 640
 40 Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly Arg
 645 650 655
 45 Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Pro Ala Pro Gly Glu Val Asp
 660 665 670
 50 His Tyr Val Val Ser Leu Ser His Glu Gly Lys Val Asp Gln Phe Leu
 675 680 685
 55 Ile Ile Ala Lys Ser Val Ser Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr Pro
 690 695 700
 60 Gly Arg Leu Tyr Asn Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Asn Tyr Ala
 705 710 715 720
 65 Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Lys Gly Asn Ser Ala Asp Ile
 725 730 735
 70 Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly
 740 745 750
 75 Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly
 755 760 765
 80 His His His His His His
 770

<210> 9
 <211> 775
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 828 739 T3

<220>

<223> molécula quimérica humano-ratón

<400> 9

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

10 Val Gln Thr Gly Val Ala Glu Gln Val Lys Cys Asn Phe Thr Leu Leu
20 25 30

15 Glu Ser Arg Val Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gln Trp Arg Thr Phe
35 40 45

20 Ala Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Ser Gly
50 55 60

25 Pro Met Trp Cys His Pro Ile Arg Ile Asp Asn Phe Thr Tyr Gly Cys
65 70 75 80

30 Asn Pro Lys Asp Leu Gln Ala Gly Thr Val Tyr Asn Phe Arg Ile Val
85 90 95

35 Ser Leu Asp Gly Glu Glu Ser Thr Leu Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu
100 105 110

40 Pro Pro Ala Arg Phe Gly Val Ser Lys Glu Lys Thr Thr Ser Thr Gly
115 120 125

45 Leu His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu
130 135 140

50 Val Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile
145 150 155 160

55 Gln Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala
165 170 175

60 Gly Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg
180 185 190

65

ES 2 828 739 T3

Ser Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys
 195 200 205
 5 Asp Leu Gly Ile Ser Pro Asn Pro Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser
 210 215 220
 Arg Gly Ser Gly Asn Val Glu Gln Tyr Arg Leu Val Leu Met Asp Lys
 225 230 235 240
 10 Gly Ala Ile Val Gln Asp Thr Asn Val Asp Arg Arg Asp Thr Ser Tyr
 245 250 255
 15 Ala Phe His Glu Leu Thr Pro Gly His Leu Tyr Asn Leu Thr Ile Val
 260 265 270
 Thr Met Ala Ser Gly Leu Gln Asn Ser Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr
 275 280 285
 20 Ala Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Arg Leu
 290 295 300
 25 Thr Ser Leu Asn Val Lys Trp Gln Lys Pro Pro Gly Asp Val Asp Ser
 305 310 315 320
 30 Tyr Ser Ile Thr Leu Ser His Gln Gly Thr Ile Lys Glu Ser Lys Thr
 325 330 335
 Leu Ala Pro Pro Val Thr Glu Thr Gln Phe Lys Asp Leu Val Pro Gly
 340 345 350
 35 Arg Leu Tyr Gln Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Gly Glu Leu Ser Ala
 355 360 365
 40 Glu Lys Ser Ala Ala Gly Arg Thr Val Pro Glu Lys Val Arg Asn Leu
 370 375 380
 Val Ser Tyr Asn Glu Ile Trp Met Lys Ser Phe Thr Val Asn Trp Thr
 385 390 395 400
 45 Pro Pro Ala Gly Asp Trp Glu His Tyr Arg Ile Val Leu Phe Asn Glu
 405 410 415
 50 Ser Leu Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr His Tyr
 420 425 430
 55 Ala Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ile Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Ile Glu
 60
 65

ES 2 828 739 T3

Leu Ile Ile Ala Lys Ser Val Ser Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr
 690 695 700
 5 Pro Gly Arg Leu Tyr Asn Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Asn Tyr
 705 710 715 720
 10 Ala Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Lys Gly Asn Ser Ala Asp
 725 730 735
 15 Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu
 740 745 750
 20 Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr
 755 760 765
 25 <210> 10
 <211> 774
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> molécula quimérica humano-ratón
 <400> 10
 35 Met Leu Arg His Gly Ala Leu Thr Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Val
 1 5 10 15
 40 Val Gln Thr Gly Val Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
 20 25 30
 45 Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
 35 40 45
 50 Gly Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly
 50 55 60
 55 Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
 65 70 75 80
 60 Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
 85 90 95
 65 Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
 100 105 110
 Pro Ala Arg Phe Gly Val Ser Lys Glu Lys Thr Thr Ser Thr Gly Leu

ES 2 828 739 T3

Lys Ser Ala Ala Gly Arg Thr Val Pro Glu Lys Val Arg Asn Leu Val
 370 375 380
 5 Ser Tyr Asn Glu Ile Trp Met Lys Ser Phe Thr Val Asn Trp Thr Pro
 385 390 395 400
 10 Pro Ala Gly Asp Trp Glu His Tyr Arg Ile Val Leu Phe Asn Glu Ser
 405 410 415
 15 Leu Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr His Tyr Ala
 420 425 430
 20 Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ile Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Ile Glu Val
 435 440 445
 25 Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Arg Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly Arg
 450 455 460
 30 Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn Glu
 465 470 475 480
 35 Thr Ser Leu Gly Ile Thr Trp Arg Ala Pro Leu Gly Glu Trp Glu Lys
 485 490 495
 40 Tyr Ile Ile Ser Leu Met Asp Arg Glu Leu Leu Val Ile His Lys Ser
 500 505 510
 45 Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Met Pro Gly
 515 520 525
 50 Arg Asn Tyr Lys Ala Thr Val Thr Ser Met Ser Gly Asp Leu Lys Gln
 530 535 540
 55 Ser Ser Ser Ile Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp Leu
 545 550 555 560
 60 His Val Asn Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp Thr
 565 570 575
 65 Lys Ala Leu Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His Glu
 580 585 590
 60 Asn Val Val Val Lys Asn Glu Ser Val Ser Ser Asp Thr Ser Arg Tyr
 595 600 605
 65 Ser Phe Arg Ala Leu Lys Pro Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val Thr
 610 615 620

ES 2 828 739 T3

Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Ala Glu Gly Arg
 625 630 635 640
 5
 Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly Arg
 645 650 655
 10
 Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Pro Ala Pro Gly Glu Val Asp
 660 665 670
 His Tyr Val Val Ser Leu Ser His Glu Gly Lys Val Asp Gln Phe Leu
 675 680 685
 15
 Ile Ile Ala Lys Ser Val Ser Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr Pro
 690 695 700
 20
 Gly Arg Leu Tyr Asn Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Asn Tyr Ala
 705 710 715 720
 Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Lys Gly Asn Ser Ala Asp Ile
 725 730 735
 25
 Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly
 740 745 750
 30
 Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly
 755 760 765
 35
 His His His His His His
 770
 <210> 11
 <211> 89
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Val Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala Glu Ser Lys Ala
 1 5 10 15
 45
 Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu Gly Ser Pro Cys
 20 25 30
 50
 Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly Ala Ala Leu Cys
 35 40 45
 55
 Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys Asn Leu Gln Asp
 50 55 60
 60
 Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile Ser Leu Asp Glu
 65 70 75 80
 65
 Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp
 85

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en oclusión venosa, retinopatía diabética, degeneración macular y desprendimiento crónico de retina, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la proteína tirosina fosfatasa beta humana (HPTP β), en donde el anticuerpo monoclonal aislado se une al dominio extracelular de HPTP β , en donde el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo monoclonal intacto producido por la línea celular de hibridoma ATCC Núm. PTA-7580, o una forma humanizada del mismo.
- 10 2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad es la oclusión de una vena.
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad es la retinopatía diabética.
- 15 4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad es la degeneración macular.
- 20 5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad es el desprendimiento crónico de retina.

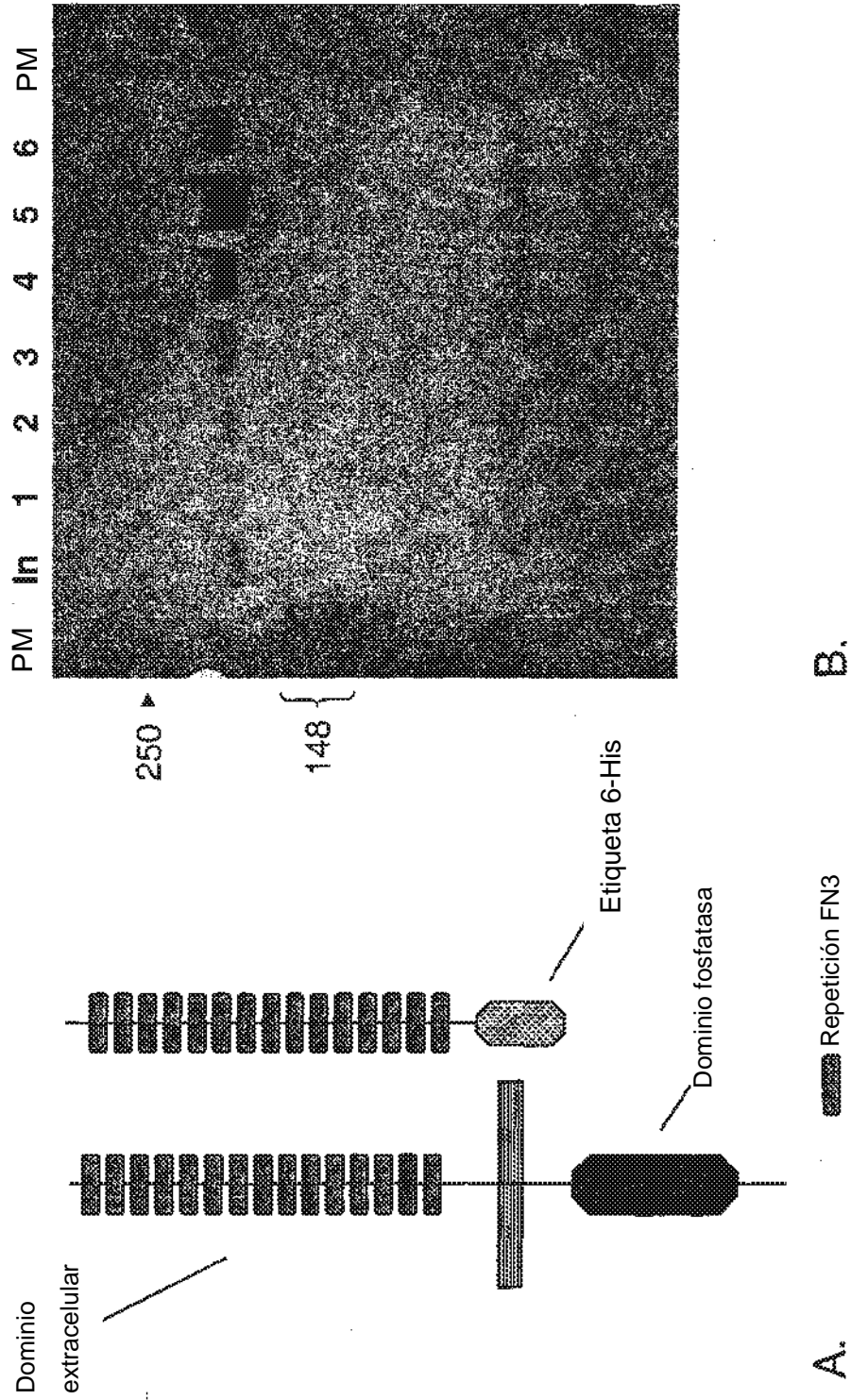


FIGURA 1.

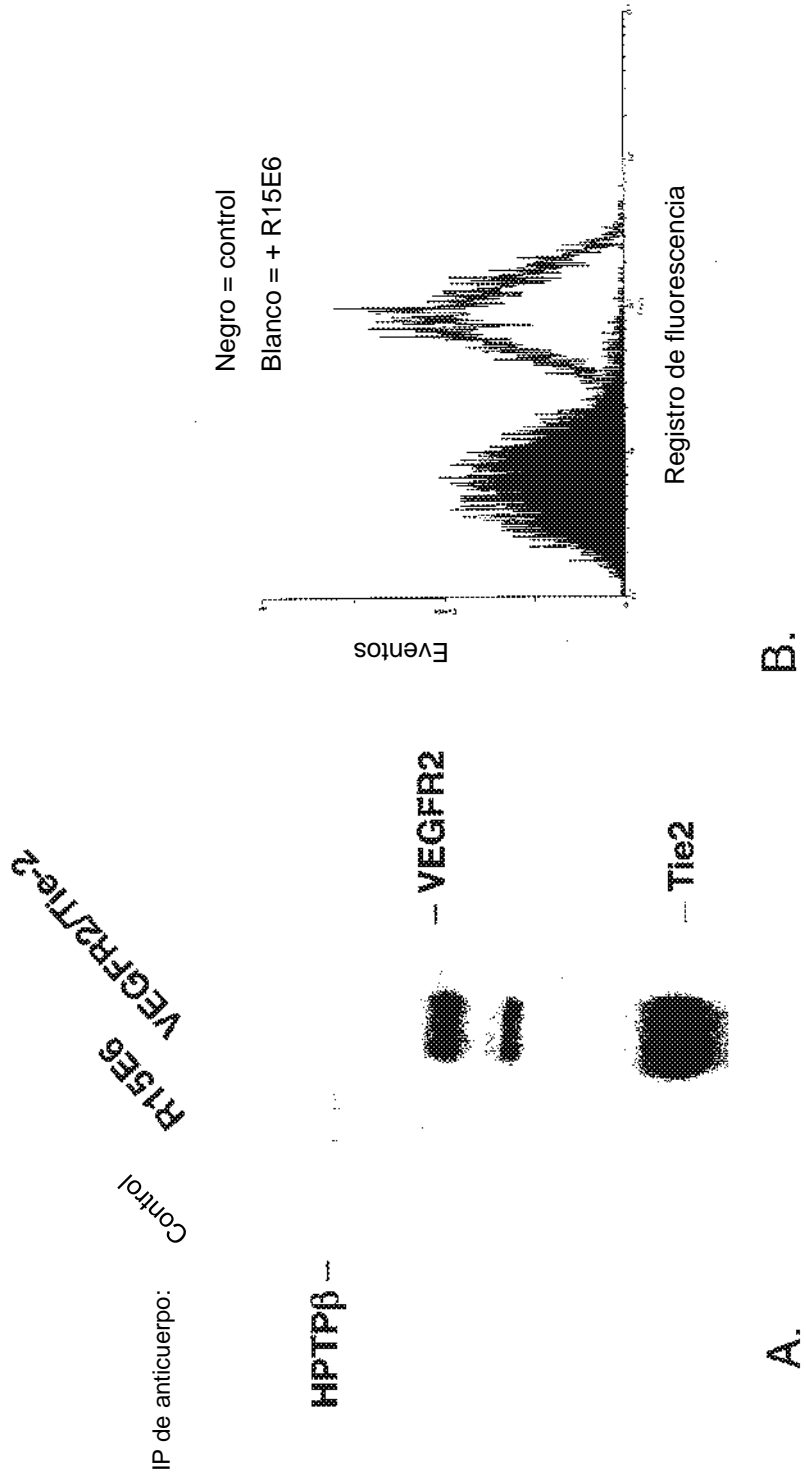


FIGURA 2.

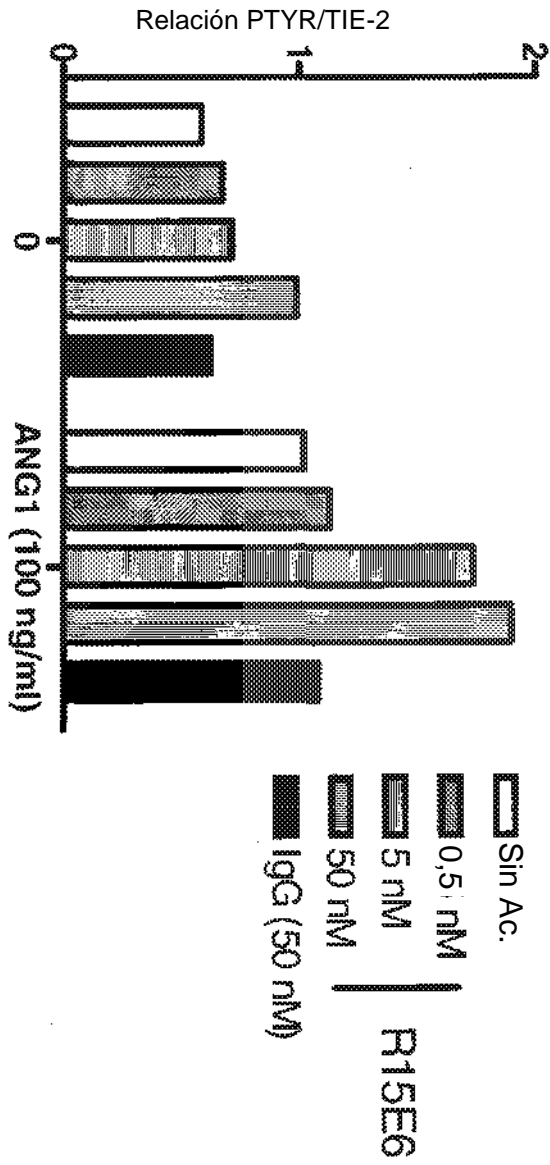


FIGURA 3.

Kevin G. Peters y otros
Antibodies That Bind Human Protein Tyrosine Phosphatase
beta (HP1Pbeta) and Uses Thereof
Caso 10365

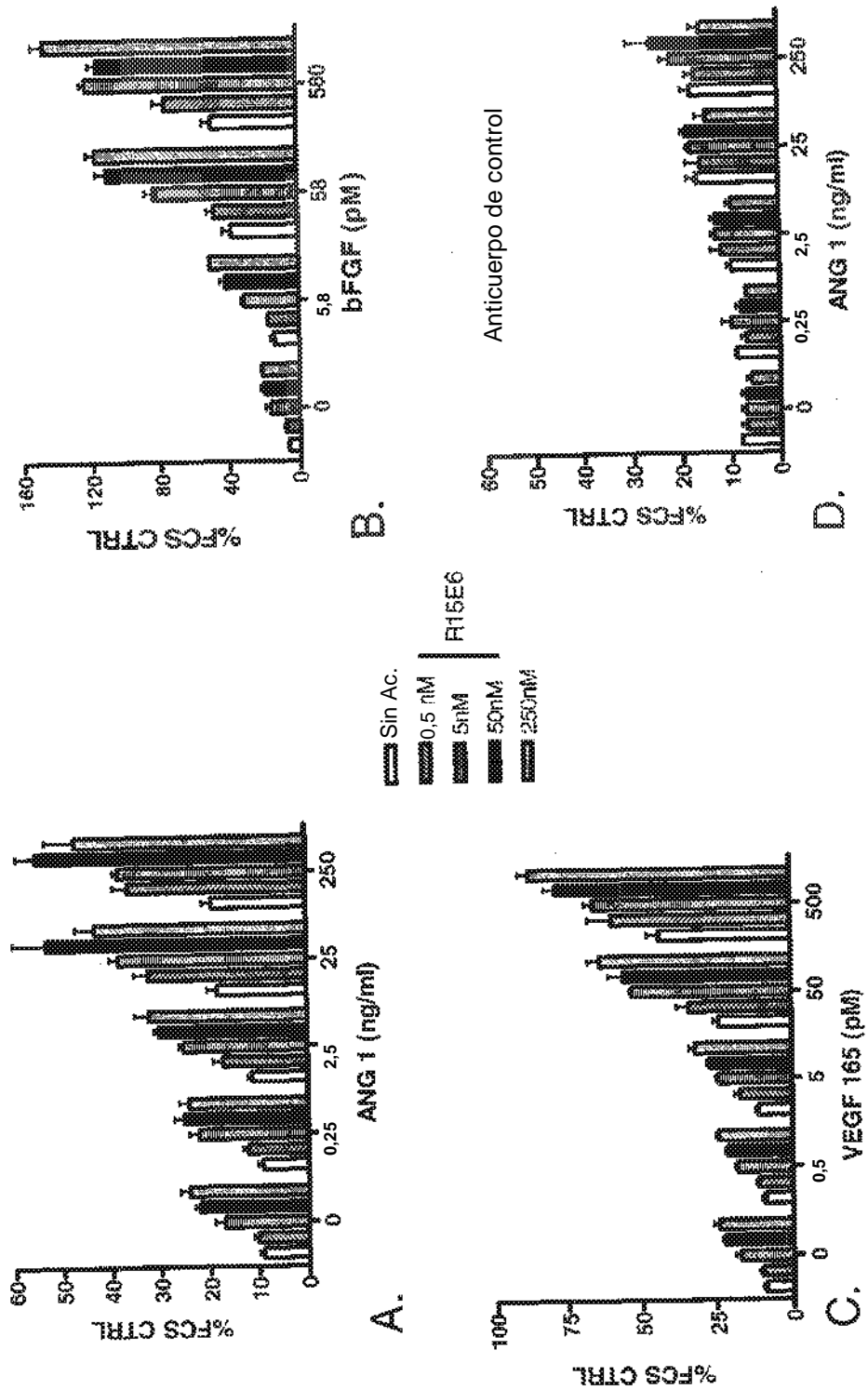


FIGURA 4.

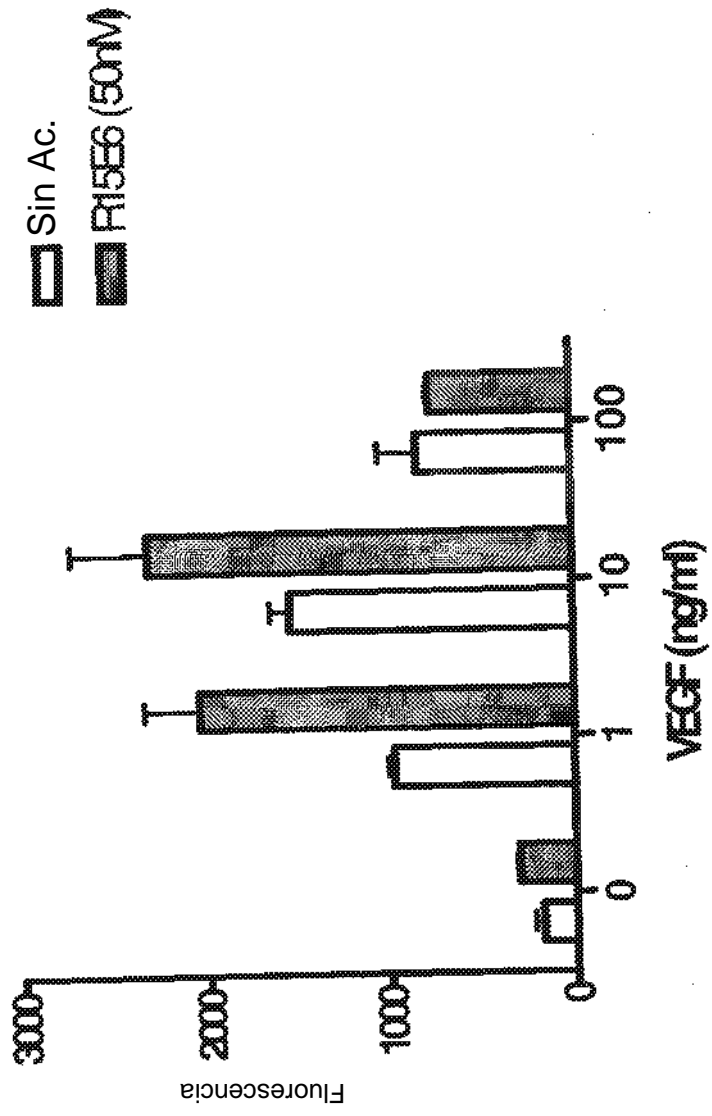


FIGURA 5.

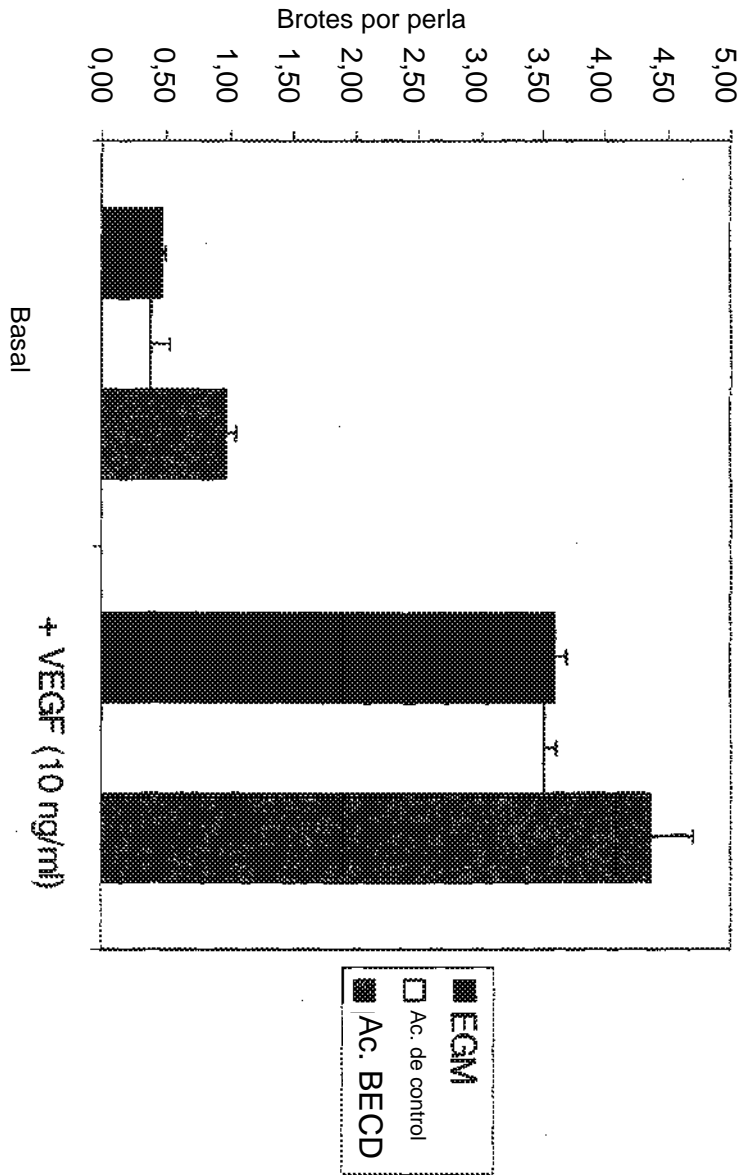


FIGURA 6.

Kevin G. Peters y otros
Antibodies That Bind Human Protein Tyrosine Phosphatase (HP/PTbeta) and Uses Thereof
Caso 10365

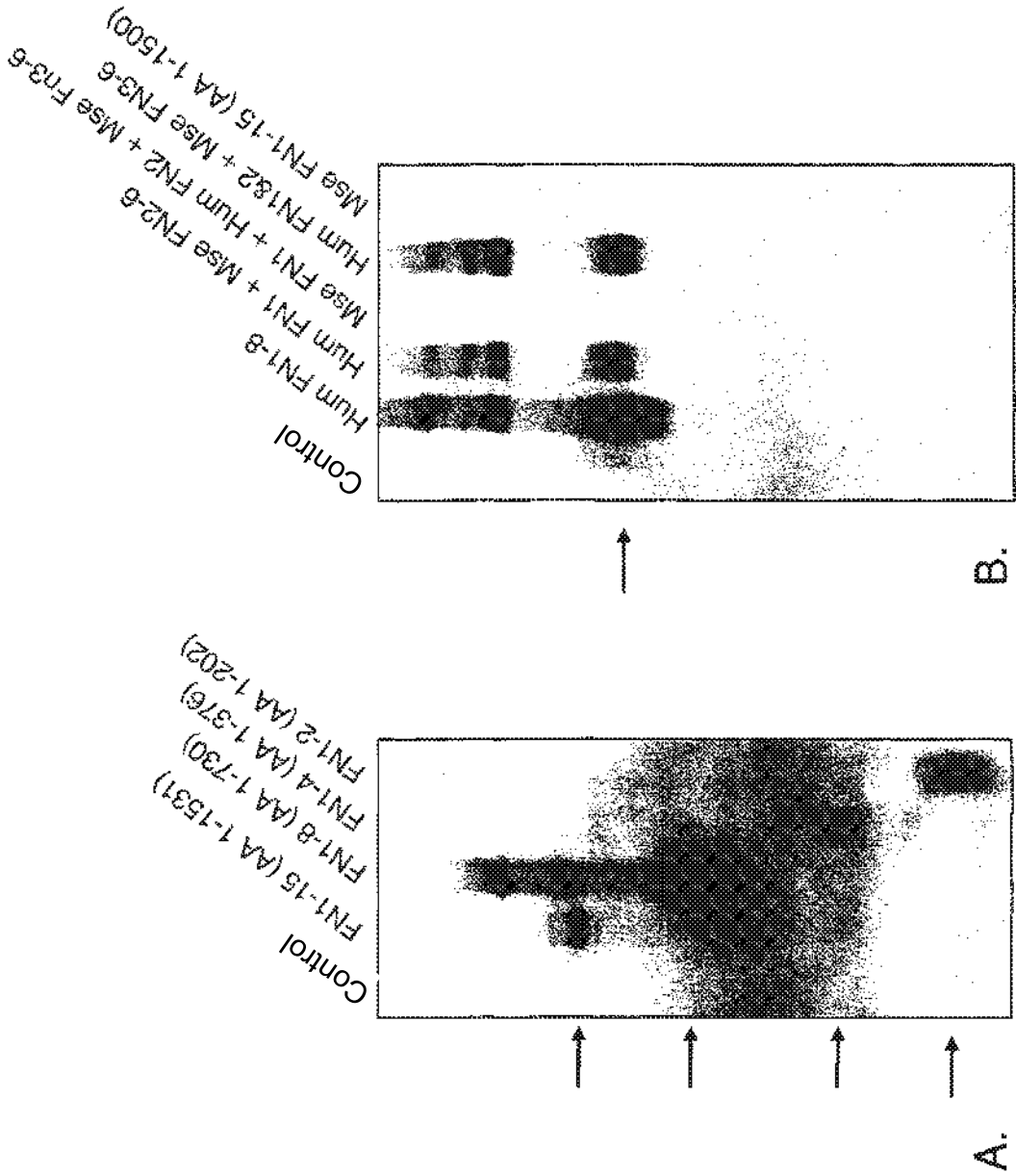


FIGURA 7.

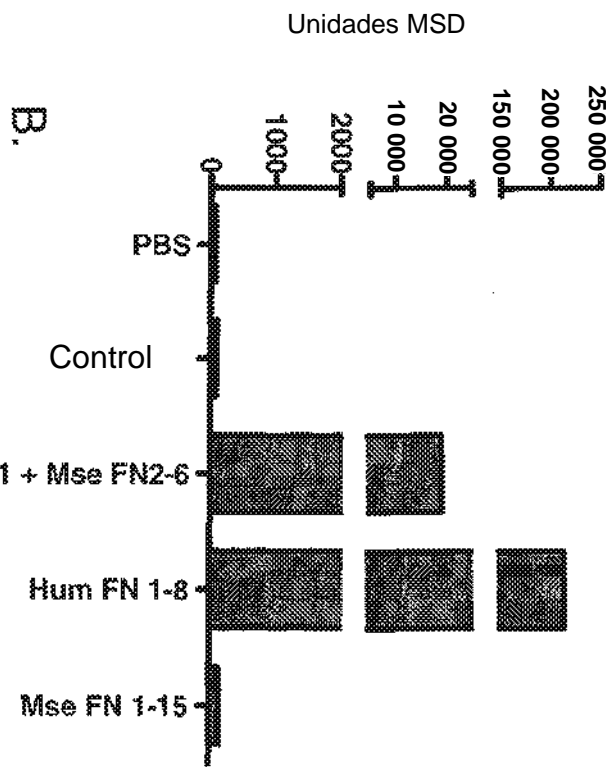
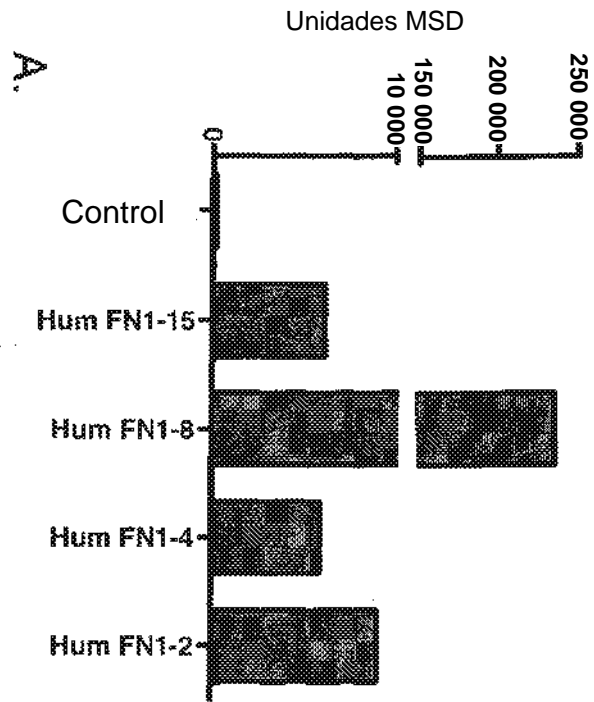


FIGURA 8.

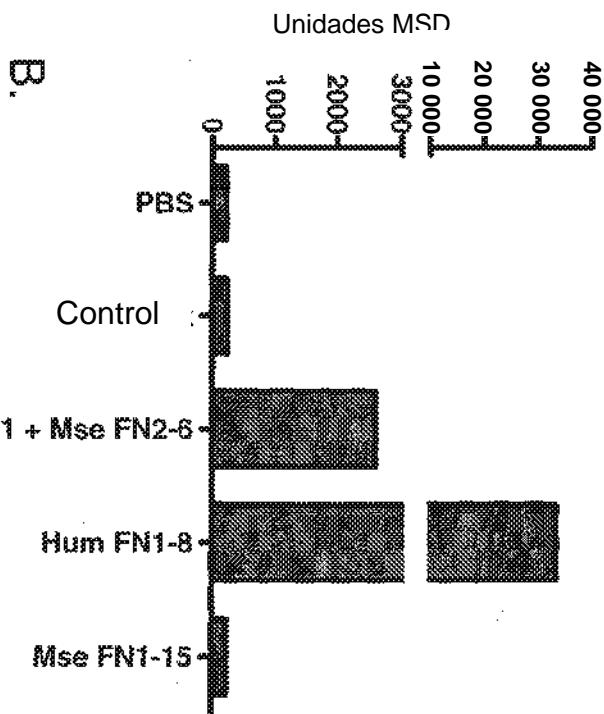
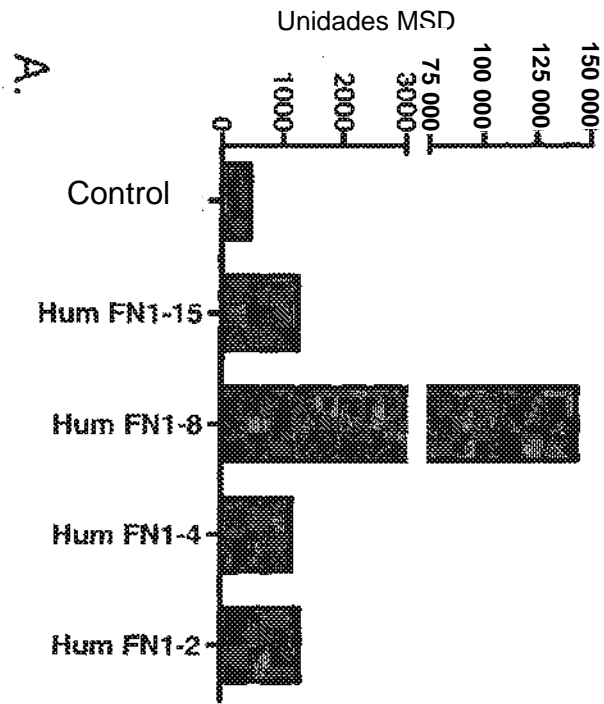


FIGURA 9.

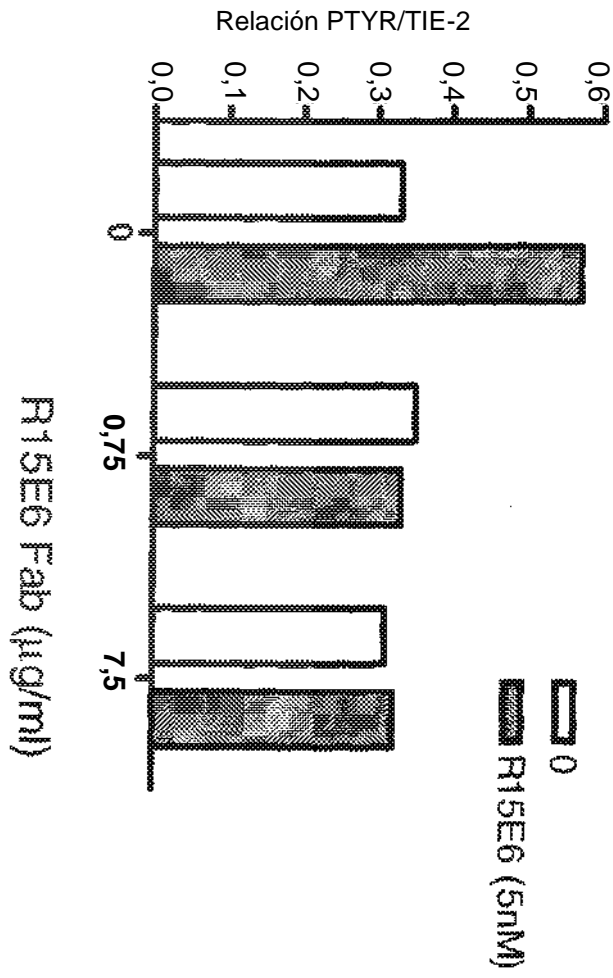
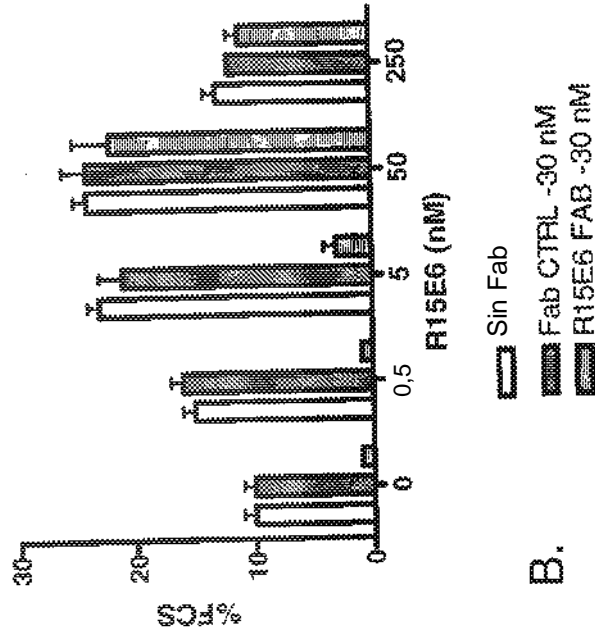
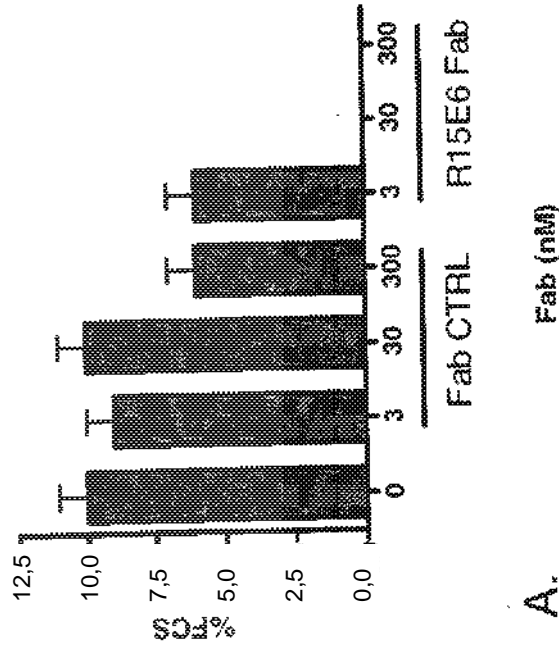


Figura 10.



B.



A.

FIGURA 11.

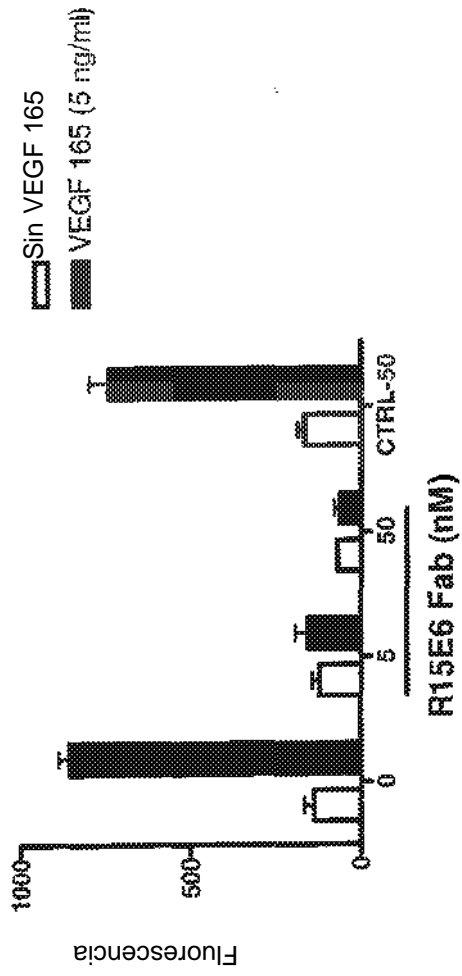


Figura 12.