



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 273 338**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/50 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **95934808 .7**

(86) Fecha de presentación : **12.10.1995**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0804479**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.1997**

(54) Título: **Método para el tratamiento de la diabetes mellitus usando KFG.**

(30) Prioridad: **13.10.1994 US 323340**
13.10.1994 US 323475
07.06.1995 US 487825

(73) Titular/es: **Amgen Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

(72) Inventor/es: **Aukerman, Sharon, Lea y**
Pierce, Glenn, Francis

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 273 338 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

Método para tratar la diabetes mellitus usando KFG.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la aplicación del factor de crecimiento de queratinocitos para preparar un medicamento para tratar o prevenir la aparición de diabetes mellitus.

10 **Antecedentes de la invención**

El factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) es un factor de crecimiento específico para células epiteliales que se identificó por primera vez en medio condicionado de una línea celular de fibroblastos de pulmón embrionarios humanos. Rubin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:802-806 (1989). Se ha detectado la expresión de ARN mensajero para KGF en diversas líneas celulares de fibroblastos estromales de tejidos epiteliales en diversas fases de desarrollo. El transcripto de KGF era también evidente en ARN extraído del riñón de adultos normales y órganos del tracto gastrointestinal. Finch *et al.*, *Science* 245:752-755 (1989). La prueba de que KGF se secreta de fibroblastos en cultivo y se expresa *in vivo* en la dermis pero no en la epidermis indica que KGF puede ser un efecto paracrino normal importante de la proliferación de queratinocitos. Los estudios han mostrado que KGF es tan potente como EGF en la estimulación de la proliferación de queratinocitos humanos primarios o secundarios en cultivos de tejidos. Marchese *et al.*, *J. Cell. Phys.* 144:326-332 (1990).

25 Los estudios *ex vivo* e *in vivo* en animales adultos normales han mostrado que KGF produce cambios en la morfo-génesis del folículo piloso, en la proliferación de hepatocitos y en la proliferación de células epiteliales en el pulmón, corazón, páncreas, estómago, intestino delgado e intestino grueso. Panos *et al.*, *J. Clin. Invest.* 92:969-977 (1993); Ulich *et al.*, *Am J. Path.* 144:862-868 (1994); Yi *et al.*, *Am. J. Path.* 145:80-85 (1994); y Ulich *et al.*, *J. Clin. Invest.* 93:1298-1306 (1994). El papel de KGF en el desarrollo embrionario o neonatal no se ha estudiado con detalle; sin embargo, se ha documentado que KGF es un importante mediador del desarrollo de la vesícula seminal en el ratón recién nacido. Alarid *et al.*, *P.N.A.S.* 91:1074-1078 (1994).

30 La solicitud de patente PCT publicada WO 90/08771 describe la purificación de KGF a partir de medio condicionado de una línea celular de fibroblastos embrionarios humanos, la secuencia de aminoácidos parcial de KGF purificado, la clonación del gen y la expresión del gen en células bacterianas para producir KHG recombinante biológicamente activo. La publicación mencionada anteriormente describe que puede usarse KGF o polipéptidos similares a KGF como agentes de curación de heridas para heridas de quemaduras o para estimular tejido de córnea transplantado. De hecho, se ha demostrado que KGF aumenta la re-epitelización y aumenta el grosor del epitelio cuando se aplica KGF recombinante de forma tópica a heridas inducidas quirúrgicamente en la oreja del conejo o en la piel porcina. Pierce *et al.*, *J. Exp. Med.* 179:831-840 (1994); y Staino-Coico *et al.*, *J. Exp. Med.* 178: 865-878 (1993).

40 El documento EP 0303233 describe la proteína reg humana que es capaz de regenerar las células de los islotes B del páncreas que producen insulina. El documento British Med. Bull., Vol. 45, (1989), p. 438-452 es un análisis sobre factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) que entre otros describe el papel de FGF en la diabetes.

Sumario de la invención

45 Se ha hecho ahora el descubrimiento de que KGF es útil para tratar el trastorno médico conocido como diabetes.

La Figura 1 es un gráfico de barras que describe los efectos de KGF en ratas posteriores a la administración subcutánea diaria a una dosis de 5 miligramos por kilogramo de peso corporal (mg/kg) durante siete días. Se administró estreptozotocina (55 mg/kg) una vez de forma intravenosa dos días después del inicio del tratamiento con KGF. El grupo de ratas diabéticas tratadas con KGF se muestra en la mitad derecha de la figura, por encima de la leyenda "Estrep + KGF". Los grupos de control se representan a la izquierda y derecha de ese: tratamiento durante siete días con solución de cloruro sódico y sin inducción de diabetes ("NaCl"), tratamiento durante siete días con solución de cloruro sódico antes y después de la diabetes inducida por estreptozotocina ("Estrep"), y tratamiento durante siete días con KGF y sin inducción de diabetes ("KGF"). Se muestran los niveles de glucosa sanguínea sin ayuno en miligramos por decilitro (mg/dl) en el eje vertical, como se mide en el quinto día después de la inducción de la diabetes (es decir, el séptimo día después de que comenzase el tratamiento con KGF o cloruro sódico). Había cuatro ratas por grupo.

50 La Figura 2 es un gráfico de barras que describe el efecto de KGF en el mismo modelo de rata sobre otras medidas fisiológicas que se relacionan con la diabetes. Se muestran sobre el eje vertical, la mitad izquierda y la mitad derecha, respectivamente, los niveles de glucosa en la orina en ayunas en mg/dl y la producción de orina en ayunas en mililitros excretados en veinticuatro horas en el séptimo día del tratamiento con KGF o cloruro sódico. Las leyendas ("NaCl"), "Estrep", "Estrep + KGF" y "KGF" tienen los mismos significados que en la Figura 1. Había cuatro ratas por grupo.

55 La Figura 3 describe los niveles de glucosa sanguínea sin ayuno en mg/dl en el mismo modelo de rata de diabetes durante un periodo de ocho días posteriores a la inducción de la diabetes. Algunos animales se trataron con una dosis subcutánea diaria (3 mg/kg) de KGF comenzando en el día uno después de la inducción de la enfermedad ("Estrep + KGF"), mientras que otros se pre- y post-trataron con solución de cloruro sódico como un control ("Estrep + NACL").

Un grupo de animales no diabéticos tratados con cloruro sódico (“NaCl”) otra vez sirvió como un control adicional. Había seis ratas por grupo.

La Figura 4 describe los niveles de glucosa en orina en ayuno en mg/dl para el mismo modelo de rata durante un periodo de seis días después de la inducción de la diabetes, en este caso comenzando en el segundo día después de la inducción de la enfermedad. El tratamiento de KGF comenzó un día después de la inducción de la diabetes. Los símbolos del gráfico designan los mismos tres grupos de ensayo que en la Figura 3. Había seis ratas por grupo.

La Figura 5 muestra la producción de orina, como milímetros por periodo de veinticuatro horas, de los mismos grupos de ensayo que en las Figuras 3 y 4, medida en los días 2, 5, 20 y 8 posteriores a la inducción de la diabetes. Los símbolos del gráfico son los mismos que en las Figuras 3 y 4. Había seis ratas por grupo.

La Figura 6 muestra el consumo de agua medio para cada grupo de ratas del experimento. Se dio agua a las ratas a voluntad y se midió el consumo como el volumen bebido en milímetros en veinticuatro horas. Había seis ratas por grupo.

La Figura 7 muestra el efecto de un análogo de KGF sobre la diabetes inducida por estreptozotocina en ratas Sprague-Dawley.

La Figura 8 muestra las secuencias de nucleótidos (SEC ID Nº: 1) y aminoácidos (SEC ID Nº: 2) del KGF nativo (los nucleótidos que codifican la forma madura de KGF nativo se representan por las bases 201 a 684 de la SEC ID Nº: 1 y la forma madura de KGF se representa por los restos de aminoácidos 32 a 194 de la SEC ID Nº:2.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de KGF nativo o una mutéina del mismo que difiere por delección, sustitución y/o inserción de al menos un aminoácido del KGF nativo y que tiene sustancialmente la capacidad del KGF nativo de estimular la proliferación de células epiteliales que no son fibroblastos para preparar un medicamento para el tratamiento de la diabetes mellitus.

El uso de la invención puede practicarse usando cualquier forma del factor de crecimiento de queratinocitos como se ha definido anteriormente que tenga alguna o todas de las propiedades biológicas del polipéptido que se encuentra de forma natural como se ha definido anteriormente. Tales formas incluyen las que se aíslan y se purifican a partir de fluidos biológicos, células y tejidos, o que derivan por síntesis química o por medios recombinantes por expresión en células hospedadoras heterólogas que se han transformado con el ADN o ARN codificante. Se describe un proceso recombinante para la producción del factor de crecimiento de queratinocitos en el documento previamente mencionado WO 90/08771. Pueden adaptarse otros procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica para el mismo propósito.

A modo de ilustración, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína KGF, o una porción de la misma, puede insertarse dentro de un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia que codifica la proteína insertada. Pueden suministrarse también las señales de transcripción y traducción necesarias con el gen de KGF nativo y/o sus regiones flanqueantes. Pueden utilizarse una diversidad de sistemas hospedador-vector para expresar la secuencia codificante de la proteína. Estos incluyen pero sin limitación sistemas de células de mamíferos infectadas con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas de células de insectos infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus), microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levaduras, o bacterias transformadas con ADN de bacteriófagos, ADN de plásmidos o ADN de cósmidos. Los elementos de expresión de estos vectores varían en sus resistencias y especificidades. Dependiendo del sistema hospedador-vector utilizado, puede usarse uno cualquiera de una variedad de elementos de transcripción y traducción adecuados.

Puede usarse cualquiera de los métodos descritos previamente para la inserción de fragmentos nucleotídicos dentro de un vector para construir vectores de expresión que contengan un gen químerico compuesto por señales de control transcripcional/traduccional apropiadas y las secuencias que codifican la proteína. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante *in vitro* y sintéticas y recombinaciones *in vivo* (recombinación genética). La expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína KGF o un fragmento peptídico puede regularse con una segunda secuencia de ácidos nucleicos de forma que la proteína KGF o el péptido se expresen en un hospedador transformado con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, puede controlarse la expresión de KGF por cualquier elemento promotor/potenciador conocido en la técnica. Los promotores que pueden usarse para controlar la expresión de KGF incluyen, pero sin limitación, la región promotora temprana de SV40, el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous, el promotor de la timidina quinasa del herpes, las secuencias reguladoras del gene de la metalotienina, vectores de expresión procarióticos tales como el promotor de la β -lactamasa, o el promotor tac, vectores de expresión de plantas que comprenden la región promotora de la nopalina sintetasa Herrera-Estrella *et al.*, o el promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor, y el promotor para la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa, elementos promotores de levaduras y otros hongos tales como el promotor de Gal 4, el promotor de ADC (alcohol deshidrogenasa), el promotor de PGK (fosfoglicerol quinasa), el promotor de la fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control transcripcional animal, que muestran especificidad de tejido y que se han utilizado en animales transgénicos: región de control del gen de la elastasa I que es activo

en células acinares pancreáticas, región de control del gen de la insulina que es activo en células pancreáticas beta, región de control del gen de la inmunoglobulina que es activo en células linfoides Grosschedl *et al.*, región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activo en testículos, mamas, células linfoides y mastocitos Leder *et al.*, región de control del gen de la albúmina que es activo en hígado, región de control del gen de la fetoproteína alfa que es activo en el hígado, región de control del gen de la 1-antitripsina alfa que es activo en el hígado, región de control del gen de la beta-globina que es activo en células mieloídes, región de control del gen de la proteína básica de la mielina que es activo en células oligodendrocíticas del cerebro, región de control del gen de la cadena-2 ligera de la miosina que es activo en el músculo esquelético, y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que es activo en el hipotálamo.

10 Los vectores de expresión que contienen insertos del gen de KGF pueden identificarse por hibridación ADN-ADN, presencia o ausencia de funciones del gen “marcador”, y expresión de las secuencias insertadas, como será evidente y será familiar para los especialistas en la técnica.

15 Pueden usarse varios métodos conocidos en la técnica para propagar el gen KGF. Una vez que se establece un sistema de hospedador adecuado y condiciones de crecimiento adecuadas, pueden propagarse y prepararse en cantidad los vectores de expresión recombinantes.

20 Además, puede elegirse una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. Puede elevarse la expresión de ciertos promotores en presencia de ciertos inductores. Por lo tanto, puede controlarse la expresión de la proteína KGF modificada genéticamente. Además, las células hospedadoras diferentes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento traduccional y postraduccional y para la modificación de proteínas (por ejemplo, glicosilación, gamma carboxilación de restos de ácido glutámico, escisión proteolítica). Pueden elegirse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento deseados de las proteínas extrañas expresadas.

25 Debe entenderse que las expresiones “factor de crecimiento de queratinocitos” y “KGF” como se emplean en esta descripción pretenden incluir y significar de manera intercambiable, a menos que se indique otra cosa, proteínas de KGF nativas y análogas a KGF (o “mutéinas”) caracterizadas por una secuencia peptídica sustancialmente igual que la secuencia peptídica del KGF nativo y porque mantienen la misma o toda la actividad biológica del KGF nativo, particularmente la proliferación de células epiteliales que no son fibroblastos (por ejemplo, mostrando al menos aproximadamente estimulación 500 veces mayor de células de queratinocitos BALB/MK que la de células de fibroblastos NIH/3T3, y estimulación al menos aproximadamente 50 veces mayor de células de queratinocitos BALB/MK que para células epiteliales BS/589 o para células epiteliales CC1208, como se determina por incorporación de H-timidina). Por 30 “caracterizado por una secuencia peptídica sustancialmente igual que la secuencia peptídica de KGF nativa” se quiere decir una secuencia peptídica que está codificada por una secuencia de ADN capaz de hibridar con los nucleótidos 201 a 684 de la SEC ID N°: 1, preferiblemente en condiciones de hibridación rigurosas.

40 La determinación de una posición de un aminoácido correspondiente entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse alineando las dos secuencias para maximizar los emparejamientos de restos, incluyendo cambio de los extremos amino y/o carboxilo, introducción de huecos como se requiera y/o delección de restos presentes como insertos en el candidato. Pueden realizarse búsquedas en bases de datos, análisis de secuencias y manipulaciones usando uno de los programas de algoritmos de detección de la homología/identidad de secuencia bien conocidos y usados de manera rutinaria (por ejemplo, Pearson y Lipman (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:2444-2448; Altschul *et al.* (1990), *J. Mol. Biol.*, 215:403-410; Lipman y Pearson (1985), *Science*, 222:1435 o Devereux *et al.* (1984), *Nuc. Acids Res.*, 12:387-395).

55 Las condiciones rigurosas, en el contexto de hibridación, serán condiciones combinadas rigurosas de sal, temperatura, disolventes orgánicos y otros parámetros típicamente controlados en reacciones de hibridación. Son condiciones de hibridación rigurosas ejemplares hibridación en SSC 4x a 62-67°C., seguido por lavado en SSC 0,1x a 62-67°C. durante aproximadamente una hora. Como alternativa, son condiciones de hibridación rigurosas ejemplares hibridación en formamida al 45-55%, SSC 4x a 40-45°C [Véase, el documento de T. Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning* (A Laboratory Manual); Cold Spring Harbor Laboratory (1982), páginas 387 a 389].

60 Por lo tanto, las proteínas incluyen variaciones alélicas, o delección o delecciones, sustitución o sustituciones o inserción o inserciones de aminoácidos, incluyendo fragmentos, moléculas químéricas o híbridas de KGF nativo. Un ejemplo de KGF incluye proteínas que tienen restos correspondientes a Cys¹ y Cys¹⁵ como se denominan en la reivindicación 5 reemplazados o delecionados, teniendo la molécula resultante estabilidad mejorada comparada con la molécula de origen. Otro ejemplo de KGF incluye polipéptidos de cambio de carga en los que uno o más de los restos de aminoácidos 41-154 del KGF nativo (preferiblemente los restos Arg⁴¹, Gln⁴³, Lys⁵⁵, Lys⁹⁵, Lys¹²⁸, Asn¹³⁷, Gln¹³⁸, Lys¹³⁹, Arg¹⁴⁴, Lys¹⁴⁷, Gln¹⁵², Lys¹⁵³ o Thr¹⁵⁴) están delecionados o sustituidos con un resto neutro o un resto cargado de forma negativa para lograr una proteína con una carga positiva reducida. Un ejemplo adicional más de KGF incluye proteínas generadas sustituyendo al menos un aminoácido que tiene un potencial de formación de bucles más alto por al menos un aminoácido dentro de una región que forma bucles de Asn¹¹⁵-His¹¹⁶-Tyr¹¹⁷-Asn¹¹⁸-Thr¹¹⁹ del KGF nativo. Un ejemplo adicional más incluye proteínas que tienen una o más sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos dentro de una región de 123-133 (aminoácidos 154-164 de la SEC ID N°: 2) del KGF nativo; estas proteínas tienen una actividad agonística o antagonística.

ES 2 273 338 T3

Las proteínas específicamente descritas incluyen las siguientes moléculas de KGF (denominadas por el resto encontrado en esa posición en la proteína madura (secuencia de señal negativa) expuesta en la SEC ID N° 2, seguido por esa posición de aminoácido en paréntesis y después el resto sustituido o “-” para designar una delección): C(1, 15)S, ΔN15-ΔN24, ΔN3/C(15)S, ΔN3/C(15)-, ΔN8/C(15)S, ΔN8/C(15)-, C(1,15)S/R(144)E, C(1, 15)S/R(144)Q, ΔN23/R (144)Q, C(1, 15, 40)S, C(1, 15, 102)S, C(1, 15, 102, 106)S, ΔN23/N(137)E, ΔN23/K(139)E, ΔN23/K(139)Q, ΔN23/R (144)A, ΔN23/R(144)E, ΔN23/R(144)L, Δ23/K(147)E, ΔN23/K(147)Q, ΔN23/K(153)E, ΔN23/K(153)Q, ΔN23/Q (152)E/K(153)E; R(144)Q y H(116)G.

Para aplicación práctica en tratamiento terapéutico, puede formularse KGF en composiciones farmacéuticas para administración por cualquier medio convencional, incluyendo pero sin limitación administración parenteral, tal como inyección subcutánea, intravenosa o intramuscular. Estas formulaciones convencionales incluirían más probablemente sales tampón adecuadas, agentes conservantes y estabilizantes para una formulación líquida o sales tampón adecuadas, agentes estabilizantes, agentes conservantes y de masa típicos para una formulación liofilizada. Es también posible que KGF pueda administrarse en una forma de liberación lenta, por depósito intradérmico, subcutáneo o intra-abdominal. Estas formas de liberación lenta de KGF pueden formularse usando métodos convencionales dentro de la habilidad de los entendidos en la técnica. Los regímenes de administración más prácticos para KGF puede utilizarlos el paciente en casa usando inyección subcutánea o administración intradérmica, o el médico usando una formulación de liberación lenta a largo plazo implantada de manera subcutánea o en la cavidad peritoneal.

El régimen de dosificación para KGF puede determinarse empíricamente por el practicante especialista. En general, se anticipa que KGF será efectivo en cantidades de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 miligramos por kilogramo de peso corporal (del paciente) por día, y preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 mg/kg/día. El régimen terapéutico puede incluir inyecciones únicas o repetidas, o una dosis baja de KGF liberada lentamente de forma continua, dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad de cada paciente. El curso terapéutico del tratamiento con KGF debe producir suficiente función de la célula beta pancreática para normalizar los niveles de glucosa sanguínea durante las demandas metabólicas variables, evitando además la hipoglucemia frecuente o profunda.

El objetivo es reponer la función de las células de los islotes de pacientes de diabetes Tipo I diagnosticada para evitar la necesidad de requerimientos de insulina exógena constantes. Los pacientes con diabetes Tipo I recién diagnosticada, en los cuales se mantiene la función de las células de los islotes, serían candidatos para la terapia con KGF. Puede usarse KGF para mantener la función de los islotes de tales pacientes para mejorar, retrasar o evitar la manifestación permanente de la enfermedad. Se cree que la diabetes Tipo I es una enfermedad autoinmune y se usa terapia inmunosupresora para su tratamiento. Puede usarse la terapia con KGF de acuerdo con esta invención junto o en combinación con inmunosupresores para el tratamiento de la enfermedad, incluyendo como un accesorio en el marco de transplante de células de los islotes. La invención se ilustra además con referencia a la siguiente solicitud.

Materiales

Los materiales de ensayo usados en los siguientes estudios *in vivo* fueron, como se ha indicado específicamente para KGF de secuencia nativa (que se encuentra de manera natural), un análogo de KGF en el que los restos de cisteína en las posiciones 1-15 de la secuencia de aminoácidos nativa se habían reemplazado por serina usando técnicas convencionales de mutagénesis dirigida al sitio (es decir, C(1, 15)S) y un análogo de KGF que tiene una delección de los primeros 23 aminoácidos del N-terminal de KGF nativo usando técnicas convencionales (es decir, ΔN23). Todas las proteínas se produjeron por expresión recombinante en *E. coli* y se purificaron hasta la homogeneidad, y cada una de ellas contenía un resto de metionina (Met⁻¹) en el N-terminal. Cada proteína se administró como una formulación subcutánea. Los experimentos previos demostraron que estas proteínas tenían actividades comparables en ratas adultas cuando se administraban sistemáticamente. El KGF de secuencia nativa y los análogos tenían cada uno actividades comparables en las ratas diabéticas y no diabéticas usadas en los siguientes estudios.

Modelo de diabetes in vivo

Se han usado clásicamente modelos de diabetes mellitus inducida químicamente en diversas especies animales para estudiar la enfermedad y su tratamiento. La estreptozotocina induce la diabetes en el ratón, rata, hámster, perro y mono aunque se han utilizado más los estudios en ratas y ratones. Junod *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Med.* **126**:210.205 (1967); Rerup, *Pharm. Rev.* **22**:485-518 (1970); Rossini *et al.*, *P.N.A.S.* **74**:2485-2489 (19977); y Ar'Rajab y Ahren, *Pancreas* **8**:50-57 (1993). En ratas, dosis de estreptozotocina de 45 a 70 mg/kg como una dosis intravenosa única inducen la enfermedad estacionaria. Las dosis por debajo de 45 mg/kg inducen un estado de enfermedad transitorio que es reversible. Dentro de un día de la inyección de estreptozotocina, se induce el estado hiperglucémico. Los niveles de insulina sanguínea se mantienen esencialmente sin cambios comparados con ratas normales; sin embargo, el contenido total de insulina y péptido C en el páncreas disminuye seriamente. Las ratas manifiestan los signos y síntomas clásicos de diabetes en humanos: niveles de glucosa sanguínea aumentados (hiperglucemia), glucosa en orina (glucosuria), sed aumentada (polidipsia), micción aumentada (poliuria), apetito aumentado (hiperfagia).

Los estudios descritos en esta descripción se realizaron con el modelo de diabetes inducida por estreptozotocina en ratas Sprague-Dawley. Se usaron ratas macho que pesaban 200-260 gramos en el inicio del estudio. Se indujo la diabetes con una inyección intravenosa única de estreptozotocina a 50 mg de estreptozotocina en tampón de citrato

sódico por kg de peso corporal. Las ratas de control no diabéticas recibieron una inyección intravenosa única de tampón de citrato sódico para propósitos de control. Se administró KGF diariamente como una inyección subcutánea. La dosis de KGF era de 3 ó 5 mg/kg/día, dependiendo del experimento. En el primer experimento, la terapia con KGF se inició dos días antes de que se indujera la diabetes y continuó después de la inducción de la diabetes durante un total de ocho inyecciones. En el segundo y tercer experimento, se inició la terapia con KGF administrado de forma subcutánea un día después de la inducción de la diabetes con estreptozotocina. En el cuarto experimento se inició un curso de 7 días de terapia con KGF 7 días después del tratamiento con estreptozotocina y se siguió a los animales después durante 12 semanas adicionales. En todos los experimentos, excepto para el cuarto experimento, se usaron los niveles de glucosa sanguínea, los niveles de glucosa en la orina y el volumen de orina como criterios de valoración para el análisis. Adicionalmente, se midieron el consumo de agua, los niveles de péptido C en la orina o el contenido en insulina y en péptido C pancreático total en algunos experimentos. En el cuarto experimento, el único criterio de valoración valorado fue la glucosa sanguínea.

Debido a que una gran fracción de insulina la retira el hígado de la circulación, la medida de las concentraciones de insulina periféricas reflejan los acontecimientos del metabolismo post-hepático en lugar de la secreción de insulina por el páncreas. Por lo tanto, se hacen a menudo medidas del péptido C y se usan como un marcador periférico de la secreción de insulina. El péptido C se produce por el procesamiento de pro-insulina a insulina. La insulina y el péptido C se secretan desde las células beta en cantidades equimolares, y sólo una pequeña cantidad de péptido C la extrae el hígado.

*20 Administración de KGF *in vivo**

Primer estudio: usando el modelo de diabetes descrito, se evaluó la eficacia de KGF para tratar la diabetes usando los siguientes cuatro grupos de ratas de ensayo:

- 25 1. Ratas de control (no diabéticas) pre- y post-tratadas con solución de cloruro sódico administrada de manera subcutánea, sin estreptozotocina;
- 30 2. Ratas convertidas en diabéticas con 50 mg/kg de estreptozotocina administrados de manera intravenosa, pre- y post-tratadas con solución de cloruro sódico administrada de manera subcutánea;
- 35 3. Ratas convertidas en diabéticas con 50 mg/kg de estreptozotocina administrados de manera intravenosa, pre-y post-tratadas con KGF nativo administrado de manera subcutánea; y
- 40 4. Ratas de control tratadas con KGF administrado de manera subcutánea, sin estreptozotocina.

Se administró a las ratas tratadas en todos los cuatro grupos KGF nativo a una dosis de 5 mg/kg por día o un volumen igual de solución de cloruro sódico durante un periodo de siete días. Dos días después del comienzo de la administración de KGF o cloruro sódico, se les dio a las ratas de los grupos 2 y 3 una dosis única de 55 mg/kg de estreptozotocina, administrada de manera intravenosa. Se sabe que esta dosis causa diabetes moderada en ratas. Se controló en todas las ratas el nivel de glucosa sanguíneo sin ayuno, el peso corporal, el nivel de glucosa en la orina en ayuno y la producción de orina. Siete días después de la administración de estreptozotocina a los grupos 2 y 3 (es decir, nueve días después del comienzo del estudio), las ratas de todos los grupos se dejaron en ayunas durante toda la noche, se sacrificaron y después se les hizo la necropsia. En cada caso, se preservó el páncreas en formalina de cinc, se embebió y después se procesó para histopatología de rutina.

El nivel de glucosa sanguínea sin ayuno en el quinto día después de la administración de estreptozotocina aumentó de forma significativa en las ratas de control diabéticas (grupo 2) en comparación con las ratas de control no diabéticas (grupo 1), como se ve en la Figura 1. Las ratas diabéticas que se habían pre-tratado con KGF antes de la administración de estreptozotocina y que se post-trataron con KGF (grupo 3) tenían un nivel de glucosa sanguínea sin ayuno más bajo de forma significativa que los controles diabéticos no tratados con KGF (grupo 2), pero todavía elevado en relación al control no diabético (grupo 1); véase la Figura 1. El nivel de glucosa en orina en ayuno y el volumen de orina de las ratas de control diabéticas del grupo 2 se elevó de forma significativa en el séptimo día del estudio (es decir, cinco días después de la inyección con estreptozotocina), como se ve en la Figura 2. Este estado se debe a la destrucción de las células beta productoras de insulina de los islotes pancreáticos y a la desregulación grave del metabolismo de la glucosa que produce excreción de glucosa en la orina. Al contrario que esto, las ratas diabéticas del grupo 3, que se pre- y post-trataron con KGF, mostraron una elevación menor de forma significativa en la glucosa en orina en ayuno que el control diabético (grupo 2). La producción de orina para el grupo tratado con KGF era también menor de forma significativa que para el grupo de control diabético, véase la Figura 2.

60 Estos resultados son consistentes con la inducción de un estado moderado de diabetes en la rata usando estreptozotocina como el agente inductor. Las ratas diabéticas que se trataron con KGF previamente a la inducción de la diabetes, y para las que se continuó también administrando KGF después de la inducción, mostraron síntomas indicativos de una forma más moderada de diabetes. Por lo tanto, puede concluirse que la terapia con KGF previno parcialmente la inducción de la enfermedad o restauró las células de los islotes productoras de insulina después de la destrucción de las células beta inducida por estreptozotocina. Para distinguir entre estas posibilidades, se estudió a continuación la terapia con KGF que comienza después de la inducción de la enfermedad.

ES 2 273 338 T3

Segundo estudio: Usando el mismo modelo de diabetes previamente descrito, se evaluó además la eficacia de KGF para tratar la diabetes utilizando los siguientes tres grupos de ratas de ensayo:

1. Ratas de control tratadas con solución de cloruro sódico administrada de forma subcutánea, sin estreptozotocina;
- 5 2. Ratas convertidas en diabéticas con estreptozotocina administrada de manera intravenosa, y post-tratadas con solución de cloruro sódico administrada de forma subcutánea; y
- 10 3. Ratas convertidas en diabéticas con estreptozotocina administrada de forma subcutánea, después post-tratadas con C(1, 15)S administrado de forma subcutánea.

Se administró a las ratas de ensayo una dosis de 3 mg/kg por día o una solución de cloruro sódico durante un periodo de trece días comenzando en el día uno después de la inducción de la diabetes. Se controlaron el nivel de glucosa sanguínea, el nivel de glucosa en la orina, el volumen de producción de orina y el agua bebida cada uno en 15 condiciones de ayuno y sin ayuno durante todo el periodo de ensayo. Las ratas se convirtieron en diabéticas en los grupos 2 y 3 dentro de un día de administración de estreptozotocina (Figura 3). La terapia con KGF comenzó en el grupo 3 a las veinticuatro horas después de la estreptozotocina y se continuó diariamente a partir de entonces. Se midió la glucosa sanguínea sin ayuno en los días 1, 2, 4, 5 y 8. Como demuestra la Figura 3, la terapia con KGF en el grupo 3 fue capaz de disminuir el nivel de glucosa sanguínea circulante a casi el de las ratas de control (grupo 1) 20 en el día 4, y esto continuó hasta el día 8. Se midió también la excreción urinaria de glucosa sin ayuno en los días 2, 5 y 8. La Figura 4 demuestra que la terapia con KGF disminuyó los niveles de glucosa urinaria por encima de 8 veces. De forma similar, la producción de orina en las ratas diabéticas tratadas con KGF estaba también normalizada cuando se midió en el día 5 y el día 8 (Figura 5). El consumo de agua, en milímetros por periodo de veinticuatro horas, no aumentó en las ratas diabéticas tratadas con KGF como hizo en las ratas diabéticas que recibieron solución 25 de cloruro sódico como un control (Figura 6). Las ratas se dejaron en ayuno durante toda la noche en el día 8 y los niveles de glucosa sanguínea en ayuno en el día 9 no eran diferentes entre estos tres grupos. El consumo de agua en ayunas y la producción de orina eran menores de forma significativa en las ratas diabéticas tratadas con KGF cuando se compararon con las ratas diabéticas en el día 9, lo que es además indicativo del mejoramiento del estado de la enfermedad.

30 Tercer estudio: El tercer estudio fue una repetición del segundo estudio y confirmó los datos presentados en las Figuras 3-6. Adicionalmente, en este experimento, cuando se realizó la necropsia a las ratas, se retiró el páncreas completo de cada rata y se extrajo y se cuantificó la insulina y el péptido C. La Tabla 1, a continuación, muestra la cantidad media de insulina o péptido C extraíble del páncreas en cada uno de los tres grupos. La terapia con KGF fue 35 capaz de aumentar el contenido total de insulina y péptido C en el páncreas de ratas diabéticas cuando se comparó con ratas diabéticas tratadas con solución de cloruro sódico.

TABLA 1

40	45	50	Contenido pancreático total de		
			Grupo	Insulina (μ g)	Péptido C (μ mol)
			Control	83,7 \pm 6,7	3,5 \pm 0,1
			Diabéticas más terapia con NaCl	6,4 \pm 3,3	0,4 \pm 0,1
			Diabéticas más terapia con KGF	18,9 \pm 7,4	1,0 \pm 0,3

1 n=3-4 ratas por grupo

2 Media \pm S.E.

55 El cuarto estudio investigó el efecto de KGF sobre la diabetes inducida por estreptozotocina en ratas Sprague-Dawley. En el día 0, se expusieron los grupos de ratas a 45 o 50 mg/kg de estreptozotocina (STZ). Posteriormente a estos tratamientos, se controlaron diariamente los niveles de glucosa sanguínea sin ayuno para valorar la gravedad de la lesión de los islotes. En el día 5, los animales tratados con STZ se colocaron en uno de los dos grupos (20/grupo) dependiendo de la magnitud de la hiperglucemia. El punto de división se estableció a un nivel de glucosa sanguínea de 300 mg/dl. Un grupo de animales no tratados con STZ sirvió como control. En el día 7, se dio a 10 animales de cada grupo hiperglucémico AN23 (3 mg/kg/día) o PBS por inyección subcutánea durante 7 días. Se controlaron después diariamente los niveles de glucosa sanguínea, todos los días o semanalmente y se exponen en la Figura 7. Se apunta que 60 los animales tratados con STZ de ambos grupos que recibieron KGF tenían disminuciones significativas en la glucosa sanguínea durante el periodo de dosificación de KGF. De forma importante, la bajada de la media de la glucosa sanguínea experimentada por los animales tratados con STZ del grupo de glucosa sanguínea que comienza por <300 mg/dl se estabilizó a aproximadamente 150 mg/dl mientras que la bajada en la glucosa sanguínea vista en el grupo de 65 glucosa sanguínea que comienza por >300 mg/dl fue sólo transitoria. Se apunta que la escala diaria no es lineal.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de KGF nativo o una muteína del mismo que difiere por delección, sustitución y/o inserción de al menos un aminoácido del KGF nativo y que tiene sustancialmente la capacidad del KGF nativo de estimular la proliferación de células epiteliales que no son fibroblastos para preparar un medicamento para el tratamiento de la diabetes mellitus.

10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el KGF nativo o la muteína del mismo es un factor de crecimiento de queratinocitos producido de manera recombinante.

15 3. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el KGF nativo o la muteína del mismo está codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por:

15 (i) la secuencia de ADN como se representa por las bases 201 a 684 de la SEC ID N°: 1 o una porción codificante de la misma;

(ii) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el pólipéptido KGF de SEC ID N°: 2; y

20 (iii) una secuencia que híbrida con una secuencia complementaria de (i) o (ii).

25 4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el KGF nativo o la muteína del mismo comprende una secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento de queratinocitos maduro (como se representa por los restos de aminoácidos 32-194 de la SEC ID N° 2) o un fragmento del mismo, o un análogo del mismo.

30 5. El uso de acuerdo a la reivindicación 4, en el que el KGF nativo o la muteína del mismo se selecciona entre los siguientes: C(1, 15)S, ΔN15, ΔN16, ΔN17, ΔN18, ΔN19, ΔN20, ΔN21, ΔN22, ΔN23, ΔN24, ΔN3/C(15)S, ΔN3/C(15)-, ΔN8/C(15)S, ΔN8/C(15)-, C(1,15)S/R(144)E, C(1, 15)S/R(144)Q, ΔN23/R(144)Q, C(1, 15, 40)S, C(1, 15, 102)S, C(1, 15, 102, 106)S, ΔN23/N(137)E, ΔN23/K(139)E, ΔN23/K(139)Q, ΔN23/R(144)A, ΔN23/R(144)E, ΔN23/R(144)L, Δ23/K(147)E, ΔN23/K(147)Q, ΔN23/K(153)E, ΔN23/K(153)Q, ΔN23/Q(152)E/K(153)E; R(144)Q o H(116)G, estando cada molécula designada como referencia al residuo encontrado en esa posición en el factor de crecimiento de queratinocitos maduro, como se describe por los restos de aminoácidos 32-194 de la SEQ ID N°: 2.

35 6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el KGF nativo o la muteína del mismo se produce de manera recombinante en células bacterianas.

7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que dicho KGF nativo o muteína del mismo tiene una metionina amino-terminal.

40 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el KGF nativo o muteína del mismo se produce en *E. coli*.

9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el KGF nativo o muteína del mismo se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable es una formulación de liberación a largo plazo, lenta.

50 11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el KGF nativo o la muteína del mismo se administra por inyección parenteral, tal como inyección subcutánea, intravenosa o intramuscular.

12. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el KGF nativo o muteína del mismo se administra en una cantidad de 0,001 miligramos a 10 miligramos por kilogramo de peso corporal por día.

55 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la cantidad de KGF nativo o muteína del mismo es de 0,05 miligramos a 5 miligramos por kilogramo por día.

14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el paciente es un ser humano.

60

65

FIGURA 1

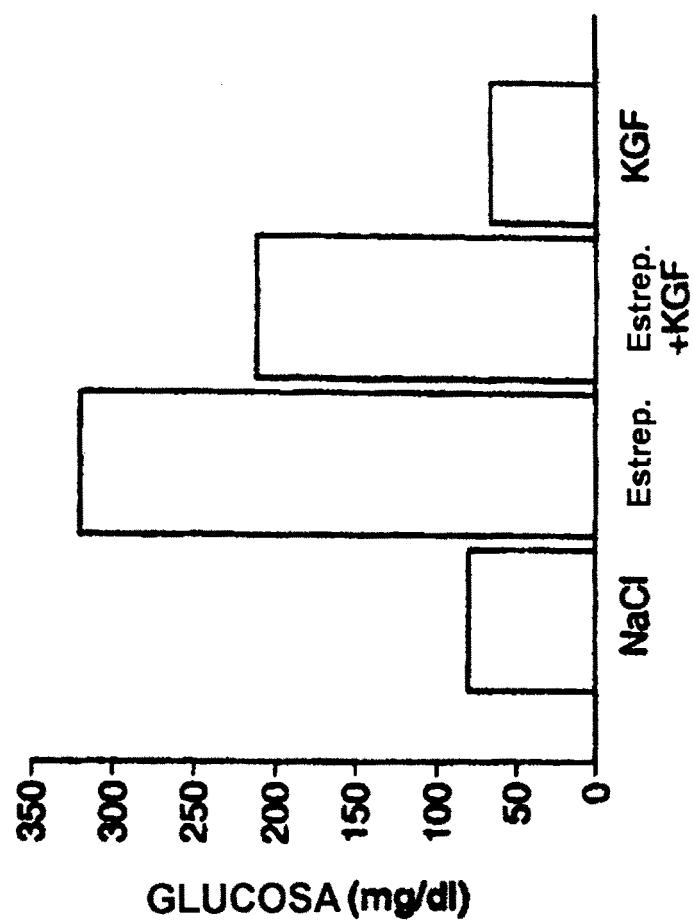


FIGURA 2

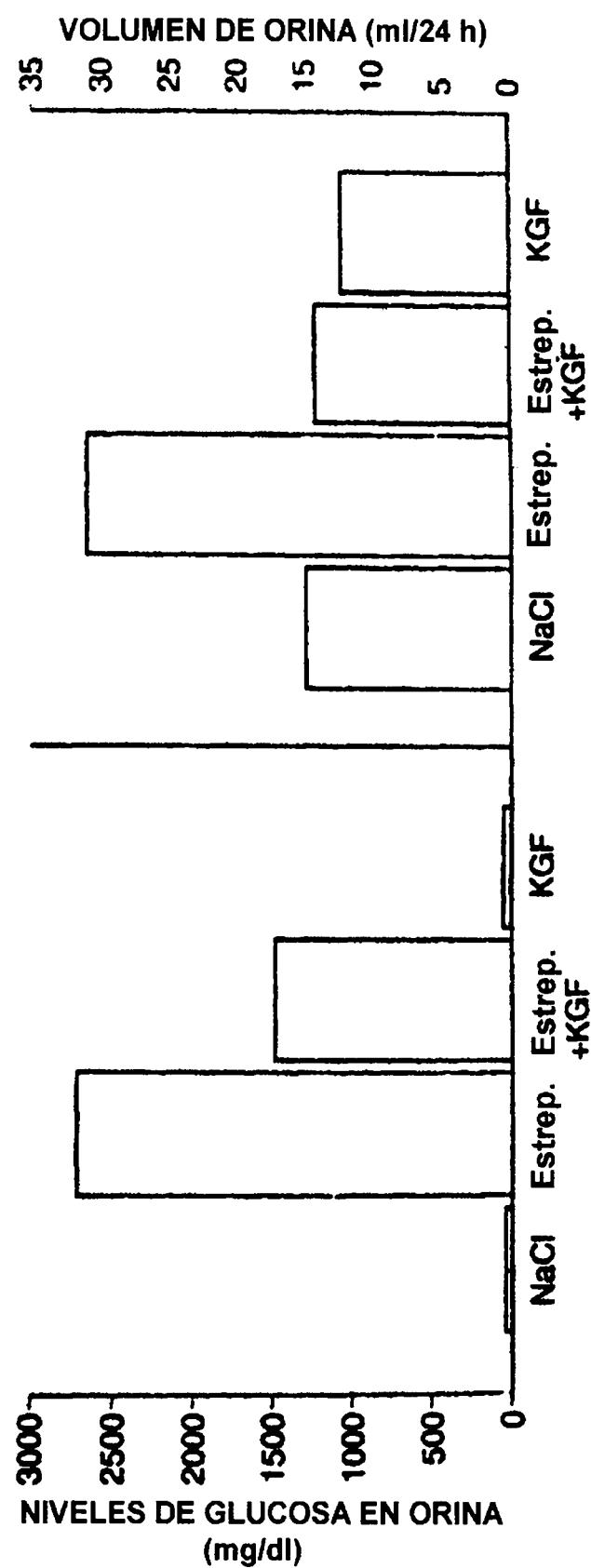


FIGURA 3

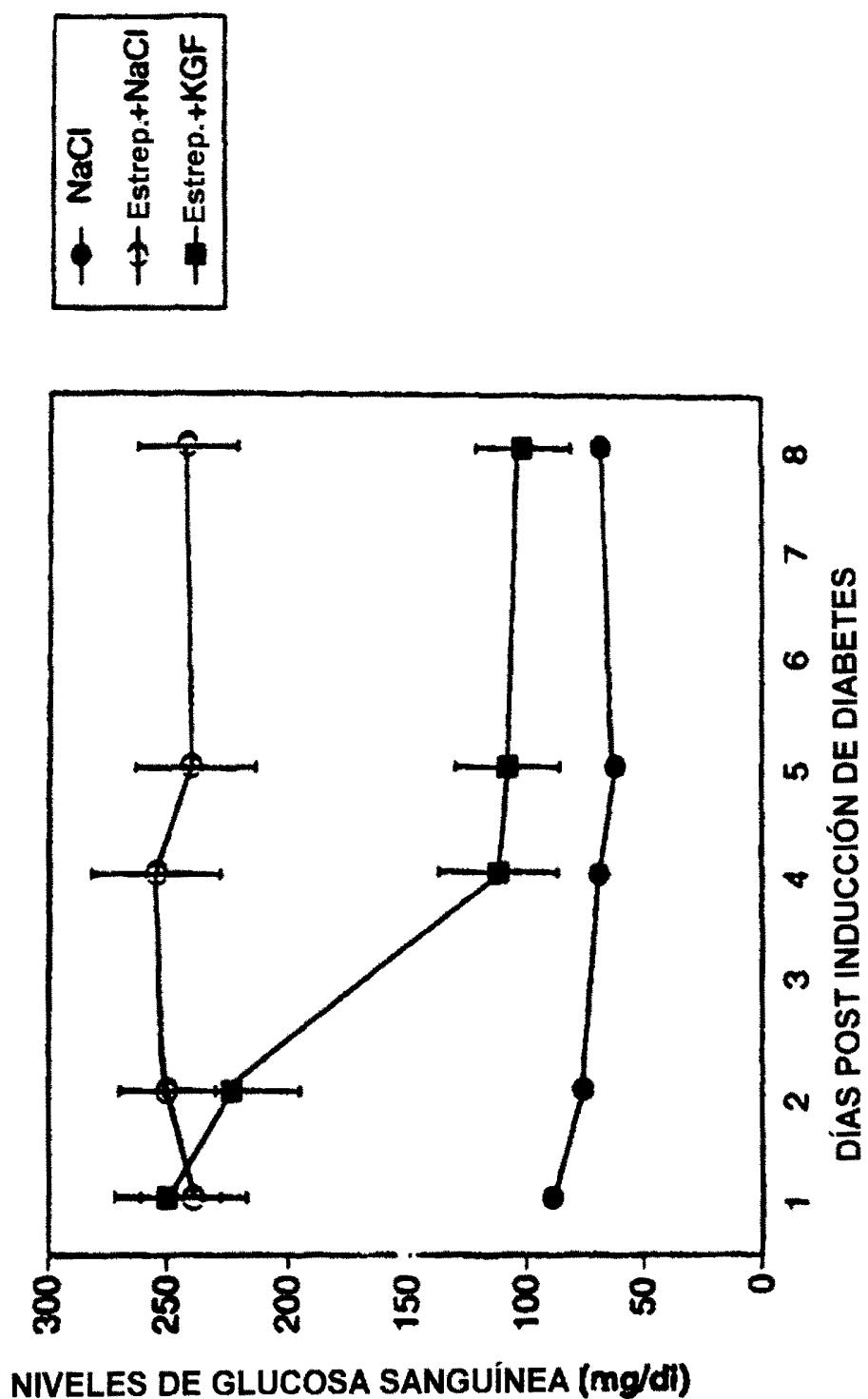


FIGURA 4

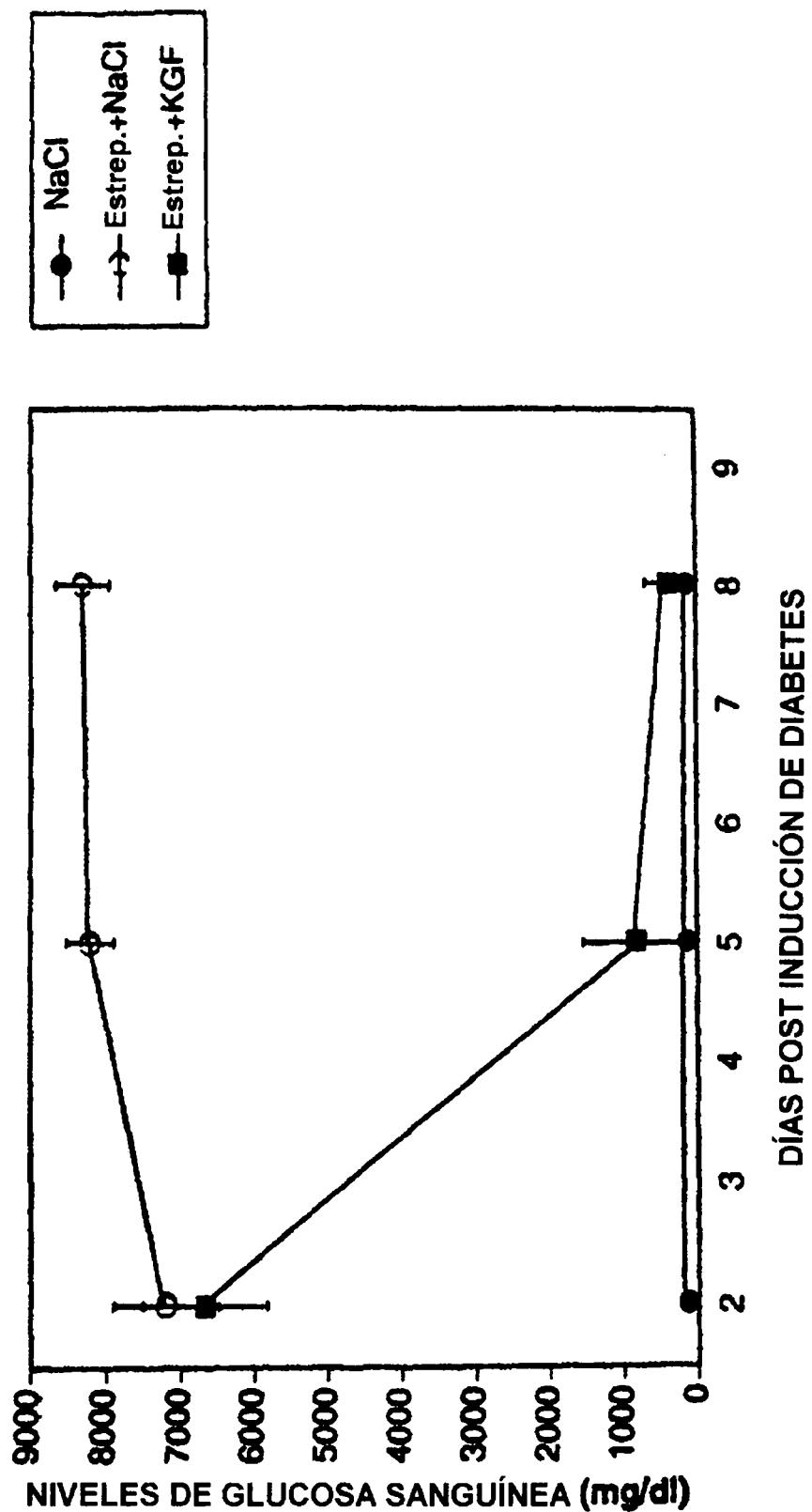


FIGURA 5

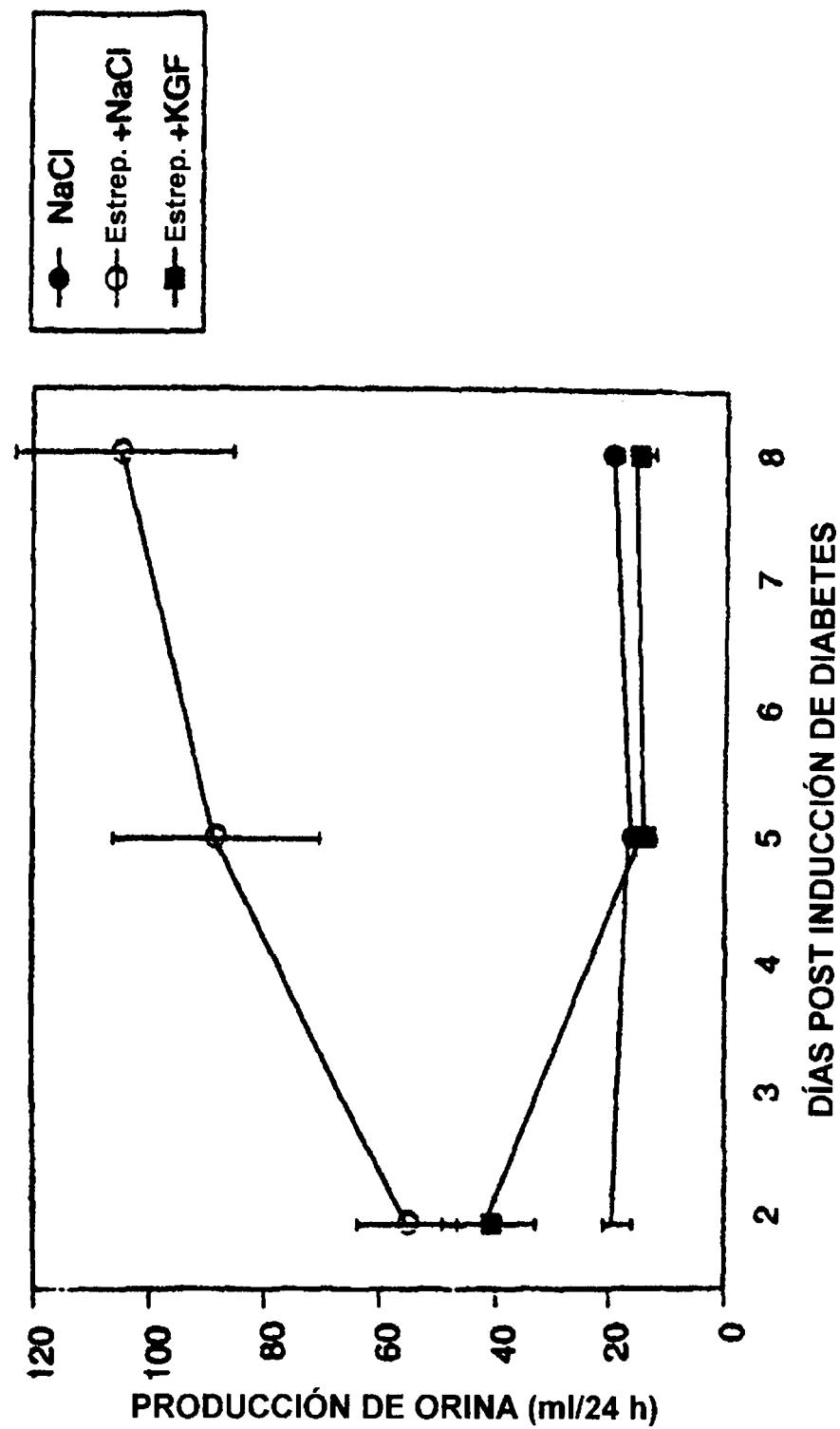


FIGURA 6

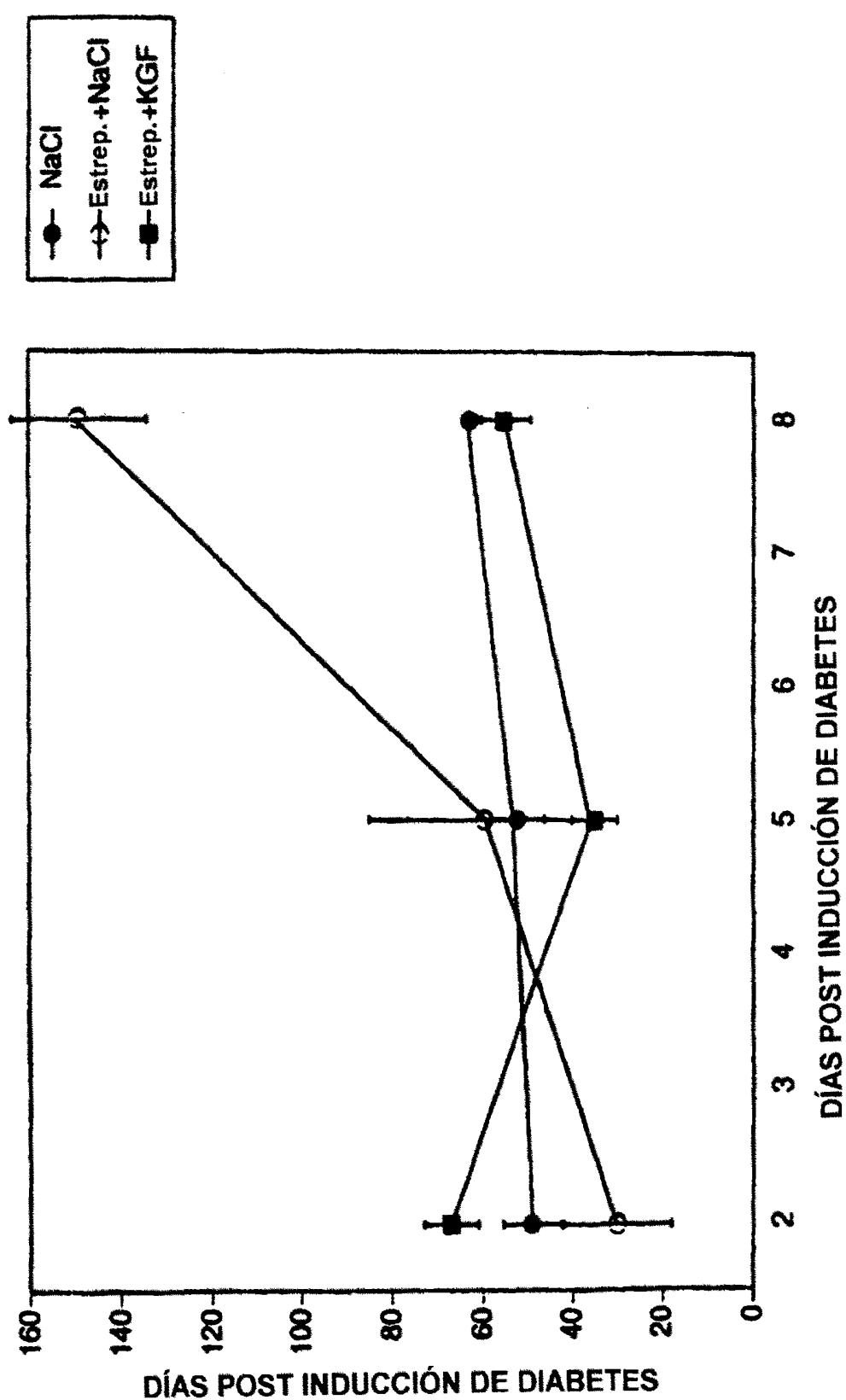


FIGURA 7

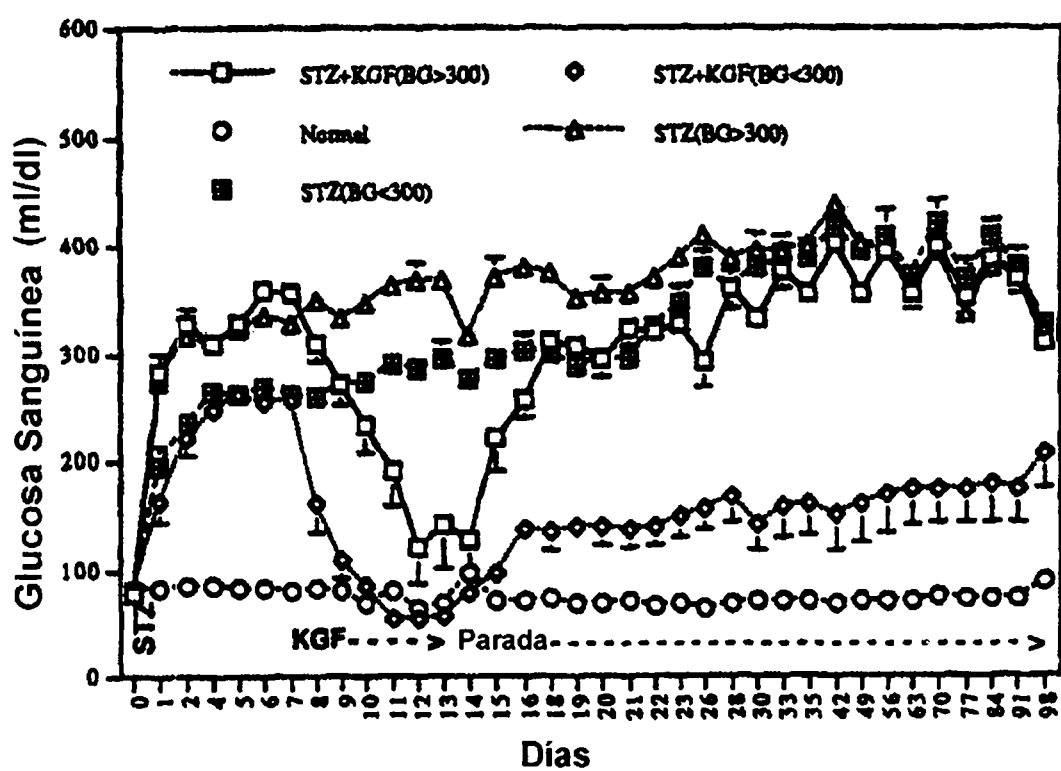


Figura 8

KGF humano (+ secuencia señal)

5' CAATCTACAATTCACAGATAGGAAGAGGTCAATGACCTAGGAGTAACAATCAACTCAAGA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 -TTCATTTCAATTATGTTATTCATGAACACCCGGAGCACTACACTATAATGCACAAATGGA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 M H K W I
 -TACTGACATGGATCCTGCCAACTTGCTCTACAGATCATGCTTCACATTATCTGTCTAG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 L T W I L P T L L Y R S C F H I I C L V
 -TGGGTACTATATCTTAGCTTGCATGACATGACTCCAGAGCAAATGGCTACAAATGTGA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 G T I S L A C N D M T P E Q M A T N V N
 -ACTGTTCCAGCCCTGAGCGACACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGGAGGGATATAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 C S S P E R H T R S Y D Y M E G G D I R
 -GAGTGAGAAGACTCTTCTGCGAACACAGTGGTACCTGAGGATCGATAAAAGAGGCAAAG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 V R R I F C R T Q W Y L R I D K R G X V
 -TAAAAGGGACCCAAAGAGATGAAGATAATTACAATATCATGAAATCAGGACAGTGGCAG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 K G T Q E M K N N Y N I M E I R T V A V
 -TTGGAATTGTGGCAATCAAAGGGGTGGAAAGTGAATTCTATCTTGCATGAAACAAGGAAG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 G I V A I K G V E S E F Y L A M N K E G
 -GAAAACCTATGCAAAGAAAGAATGCAATGAAGATTGTAACCTCAAAGAACTAATTCTGG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 K L Y A K K E C N E Q C N F K E L I L E
 -AAAACCATTACACACATATGCATCAGCTAAATGGACACACAACGGAGGGAAATGTTG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 N H Y N T Y A S A K W T H N G G E M F V
 -TTGCCTTAAATCAAAGGGATTCTGTAAGAGGAAAAAAACGAAGAAAGAACAAAAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 A L N Q K G I P V R G K K T K K E Q X T
 -CAGCCCACCTTCTTCTATGGCAATAACTTAATTGCATATGGTATATAAGAACCCAGTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 A H F L P M A I T *

Figura 8
(continuación)

-CCAGCAGGGAGATTCTTAAAGTGACTGTTTCTTCTCAAAATTCTTCTTCCTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780

-TATTTTTAGTAATCAAGAAAGGCTGGAAAAACTACTGAAAAACTGATCAAGCTGGACTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840

-GTGCATTATGTTGTTAAG 3'
-----+-----+-----+ 862

LISTA DE SECUENCIAS

1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Amgen Inc.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Método para tratar la Diabetes Mellitus usando KGF
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Amgen Inc.
- (B) CALLE: 1840 DeHavilland Drive
- 15 (C) CIUDAD: Thousand Oaks
- (D) ESTADO: California
- (E) PAÍS: USA
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 91320-1789
- 20 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
- (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release Nº 1.0, Versión Nº 1.30
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US PCT/IB 95/00992
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 12-OCT-1995
- (C) CLASIFICACIÓN:

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 40 (A) LONGITUD: 862 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- 45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1:

50

55

60

65

5	CAACTACAA TTCACAGATA GGAAGAGGTC AATGACCTAG GAGTAAACAT CAACTCAAGA	60
	TTCAATTTCAT TTATGTTATT CATGAAACACC CGGAGCACTA CAACTATAATG CACAAATGGA	120
	TACTGACATG GATCCTGCCA ACITTCCTCT ACAGATCATG CTTTCMCAATT ATCTGCTCTAG	180
10	TGGGACTAT ATCTTTAGCT TGCATTCACA TGACTCCAGA GCAAAATGCTT ACAAAATGTGA	240
	ACTGTTCCAG CCCTGAGGAA CACACAGAA GTTATGATTA CATGGAAGGA CGGGATATTA	300
	GAGTAAAGAG ACTCTTCCTGT CGAACMAGT GGTACCTGAG GATGATTAAG AGGCGCAG	360
15	TAAGGGGC CCAAGGAGT ACAGATAATT ACATATATCAT GGAATCAGG ACAGTGGCAG	420
	TGGAAATTGT GGCATTCATA CGGGGGAAA GTGAAATTCTA TCTTCIAGG AACIAGGGAG	480
	GAATCTCTA TGCAAAAGAAA GAATGCAATG AGATTTGTAA CTTCAAAAGAA CTAATTCTGG	540
20	AAACCCATTA CAAACACATAAT GCAATCAGCTA AATGGACACAA CAAAGGAGG GAAATGTTG	600
	TTGCTTTAA TCAAAAGGGG ATTCCTGTAA GGGGAAAGAA AACGAGAAA GAACTAAAAAA	660
	CAACCCACTT TCTTCIAGG GCAATTAACCTT AATTCATAT GGTATATAAA GAAACCCAGTT	720
25	CCACGAGGCA GATTTCTTTA AGTGGACTGT TTTCTTTCTT CTCAAAATT TCTTTCTTT	780
	TATTTTTAG TAAATCAGAA AGGCTGGAAA AACTACTGAA AAACATGATCA AGCTGGACTT	840
30	GTCATTTAT GTTGTGTTA AG	862

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 2:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 194 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - 40 (C) CADENA: desconocida
 - (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- 45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 2:

50

55

60

65

ES 2 273 338 T3

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

40

45

50

55

60

65