



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 915**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

**C12N 11/14** (2006.01)

**C12Q 1/42** (2006.01)

**A61K 38/43** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97937017 .8**

86 Fecha de presentación : **24.07.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0918867**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.1999**

54 Título: **Proteína tirosina fosfatasas de captura de sustrato.**

30 Prioridad: **25.07.1996 US 685992**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.10.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.10.2007**

73 Titular/es: **COLD SPRING HARBOR LABORATORY  
1 Bungtown Road  
Cold Spring Harbor, New York 11724, US**

72 Inventor/es: **Tonks, Nicholas y  
Flint, Andrew, J.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 281 915 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

Proteína tirosina fosfatasas de captura de sustrato.

## 5 Antecedentes de la invención

La familia de enzimas denominada proteína tirosina fosfatasas (PTP) consiste en más de 500 proteínas estructuralmente diversas que tienen en común el dominio catalítico de PTP de 250 aminoácidos muy conservado, pero que presentan una variación considerable en sus segmentos no catalíticos (Charbonneau y Tonks, *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 463-493 (1992); Tonks *Semin. Cell. Biol.* 4: 373-453 (1993)). Esta diversidad estructural presumiblemente refleja la diversidad de papeles fisiológicos de los miembros individuales de la familia PTP, que en ciertos casos han demostrado tener funciones específicas en el crecimiento, desarrollo y diferenciación (Desai *et al.*, *Cell* 84: 599-609 (1996); Kishihara *et al.*, *Cell* 74: 143-156 (1993); Perkins *et al.*, *Cell* 70: 225-236 (1992); Pingel y Thomas, *Cell* 58: 1055-1065 (1989); Schultz *et al.*, *Cell* 73: 1445-1454 (1993)). Aunque ciertos estudios recientes también han generado una información considerable con respecto a la estructura, expresión y regulación de las PTP, aún no se ha determinado la naturaleza de los sustratos fosforilados en tirosina a través de los cuales las PTP ejercen sus efectos. Ciertos estudios realizados con un número limitado de sustratos fosfopeptídicos sintéticos han demostrado algunas diferencias en la selectividad por el sustrato de diferentes PTP (Cho *et al.*, *Protein Sci.* 2: 977-984 (1993); Dechert *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 231: 673-681 (1995)), y han indicado preferencias por ciertos restos aminoacídicos en posiciones particulares próximas al resto de tirosina fosforilado (Ruzzene *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 211: 289-295 (1993); Zhang *et al.*, *Biochemistry* 33: 2285-2290 (1994)). Esto indica que las PTP presentan un cierto nivel de selectividad por el sustrato *in vitro*, aunque no está clara la relevancia fisiológica de los sustratos usados en estos estudios.

Protein Science, vol. 5, nº 1, enero de 1996; 5-12 describe que se cree que en el mecanismo de reacción de las proteína tirosina fosfatasas (PTPasas) y las proteína fosfatasas de especificidad doble está implicado un resto de ácido aspártico catalítico. Se ha descrito que el ácido aspártico 383 se ha identificado como un posible candidato para el ácido catalítico en la proteína fosfatasa Cdc25A humana, usando alineamiento de secuencias, información estructural y mutagénesis de localización dirigida. Un mutante D383N presenta una reducción de 150 veces en el valor de  $K_{cat}$ , llegando el valor de  $K_m$  a más del doble. Usando análisis de homología de secuencias y basándose en el alineamiento de restos catalíticos y elementos de estructura secundaria, se presenta un modelo tridimensional de la región nuclear de Cdc25 y se propone una arquitectura general de la región nuclear de las proteína fosfatasas que incluye el motivo del bucle del sitio activo HCXXXXXR y el resto catalítico de ácido aspártico.

## Compendio de la invención

Como se describe en este documento, la especificidad por el sustrato de proteína tirosina fosfatasas (PTP) de mamífero se ha investigado usando una nueva estrategia de captura de sustrato en la que se usan formas mutantes o alteradas de la PTP de mamífero, también denominadas PTP de captura de sustrato, para unirse a (capturar) uno o más sustratos de la PTP. La unión de la PTP de captura de sustrato con un sustrato de la PTP tiene como resultado la formación de un complejo que puede observarse fácilmente y, si se desea, aislarse y caracterizarse. Las formas mutantes de las PTP tienen una actividad catalítica atenuada (no tienen actividad catalítica o tienen una actividad catalítica reducida) con respecto a la PTP de tipo silvestre, pero conservan la capacidad de unirse a uno o más sustratos fosforilados en tirosina de la PTP de tipo silvestre.

Los métodos de la presente invención se ejemplifican específicamente en este documento con respecto a las fosfatasas PTP1B y PTP-PEST; sin embargo, se entiende que la invención no se limita a estas PTP específicas, sino que es aplicable a todos los miembros de la familia PTP. Para identificar posibles sustratos de PTP1B y PTP-PEST, se generaron formas mutantes (es decir, alteradas o de captura de sustrato) de PTP1B y PTP-PEST que estaban catalíticamente atenuadas pero conservaban su capacidad de unirse a sustratos. Estas PTP mutantes se asociaron en complejos estables con proteínas que se identificaron por inmunotransferencia como p210 bcr:abl y p130<sup>cas</sup>, respectivamente. Estas asociaciones se observaron en lisados de varias líneas celulares y en células COS transfectadas, indicando que p210 bcr:abl y p130<sup>cas</sup> representan sustratos importantes y fisiológicamente relevantes para PTP1B y PTP-PEST.

Estos resultados demuestran por primera vez la existencia de PTP que tienen una especificidad por el sustrato intrínsecamente restringida *in vivo*. Los métodos usados para identificar p210 bcr:abl y p130<sup>cas</sup> como sustratos específicos para PTP1B y PTP-PEST, respectivamente, se pueden aplicar generalmente a cualquier miembro de la familia PTP, de la cual se han presentado aproximadamente 500 miembros, y pueden usarse para determinar los sustratos fisiológicos de otros miembros de la familia PTP.

Una realización de la invención se refiere a nuevas PTP mutantes en las que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima pero que tiene como resultado una reducción en el valor de  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos de 1 min<sup>-1</sup>). Estas PTP retienen la capacidad de formar un complejo con, o de unirse a sus sustratos fosforilados en tirosina, pero están catalíticamente atenuadas. En una realización, la invención se refiere a la fosfatasa PTP1B en la que el resto de aspartato constante en la posición 181 se ha reemplazado por alanina (D181A). En otra realización, la invención se refiere a la fosfatasa PTP-PEST en la que el resto de aspartato constante en la posición 199 se ha reemplazado por una alanina (D199A). Otra realización de la invención se refiere a una fosfatasa PTP-PEST en la que el resto de cisteína en la posición 231 se ha reemplazado por una serina (C231S). La invención también se refiere a otras PTP mutantes o de captura de sustrato

en las que el resto de aspartato constante se ha reemplazado o se ha cambiado por otro resto aminoacídico, tal como alanina. El resto de aspartato constante puede identificarse en otras PTP alineando la secuencia de nucleótidos de PTP con la secuencia de nucleótidos de una PTP para la que se conoce la localización del resto de aspartato constante.

La invención también se refiere a un método para identificar un sustrato fosforilado en tirosina de una proteína tirosina fosfatasa. De acuerdo con una realización de la presente invención, una proteína fosforilada en tirosina de interés se combina con una o más PTP en las que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima, pero que ocasiona una reducción en el valor de  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos de  $1 \text{ min}^{-1}$ ), y se determina la presencia o ausencia del complejo entre la proteína y la PTP. La presencia de un complejo en la combinación indica que la proteína fosforilada en tirosina es un sustrato de la PTP. El mutante PTP DA se une o forma complejos con su sustrato, pero no lo desfosforila (o lo hace muy lentamente), permitiendo de esta manera observar el complejo y, opcionalmente, su aislamiento e identificación. En una realización particular de la invención, el aspartato constante se reemplaza por un resto de alanina (una mutación o alteración PTP DA).

En una realización alternativa de la presente invención, una PTP de interés en la que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima pero que ocasiona una reducción de la  $K_{cat}$  a menos 1 por minuto (menos de  $1 \text{ min}^{-1}$ ), se combina con una o más proteínas fosforiladas en tirosina, y se determina la presencia o ausencia del complejo entre la proteína o proteínas y la PTP. La presencia de un complejo en la combinación indica que la proteína fosforilada en tirosina es un sustrato de la PTP. El mutante PTP DA se une o forma complejos con su sustrato, pero no lo desfosforila (o lo hace muy lentamente), permitiendo de esta manera la observación del complejo y, opcionalmente, su aislamiento e identificación. En una realización de la invención, el resto de aspartato constante se reemplaza por un resto de alanina (una mutación o alteración PTP DA).

La presente invención también se refiere a un método para identificar un sustrato fosforilado en tirosina de una proteína tirosina fosfatasa, donde más de una proteína fosforilada en tirosina de interés se combina con más de una PTP de interés en la que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima pero que ocasiona una reducción en la  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos de  $1 \text{ min}^{-1}$ ) (por ejemplo, el aspartato constante se reemplaza por un resto de alanina). Los complejos formados en la combinación pueden aislarse y pueden identificarse el componente PTP y el sustrato.

La invención también se refiere a un método para reducir la actividad de una proteína fosforilada en tirosina, que comprende administrar a un mamífero una PTP en la que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima pero que ocasiona una reducción en la  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos de  $1 \text{ min}^{-1}$ ) (por ejemplo, el aspartato constante se reemplaza por un resto de alanina) y que forma un complejo con la proteína fosforilada en tirosina. El mutante de PTP se une a la proteína fosforilada sin desfosforilarla, inhibiendo de esta manera la actividad de la proteína y reduciendo sus efectos corriente abajo.

Por ejemplo, la invención se refiere a un método para reducir los efectos de transformación de oncogenes asociados con  $p130^{\text{cas}}$ , un sustrato de PTP-PEST, que comprende administrar a un mamífero PTP-PEST de tipo silvestre o PTP-PEST en la que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un resto de alanina. La PTP-PEST de tipo silvestre se une y desfosforila  $p130^{\text{cas}}$ , regulando de esta manera de forma negativa sus efectos corriente abajo. Los mutantes DA de PTP-PEST se unen pero no desfosforilan  $p130^{\text{cas}}$  (o la desfosforilan a una velocidad reducida); de esta manera el sustrato se une en el complejo con la forma de captura de sustrato de PTP-PEST y no puede ejercer sus efectos corriente abajo. De manera similar, la invención se refiere a un método para reducir la formación de complejos de señalización asociados con  $p130^{\text{cas}}$ , particularmente los complejos de señalización que inducen rutas mitogénicas, que comprende administrar a un mamífero PTP-PEST de tipo silvestre o PTP-PEST donde el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un resto de alanina.

La presente invención también se refiere a ensayos para identificar agentes que alteran, por ejemplo, potencian o inhiben, la interacción entre una PTP y su sustrato fosforilado. Los agentes identificados por estos ensayos pueden ser agonistas (por ejemplo, agentes que potencian o aumentan la actividad de la PTP) o antagonistas (por ejemplo, agentes que inhiben o reducen la actividad de la PTP) de la actividad PTP. El agente puede ser una sustancia fisiológica endógena o puede ser un fármaco natural o sintético, incluyendo moléculas orgánicas pequeñas.

Por ejemplo, el sustrato fosforilado en tirosina de una PTP puede identificarse por los métodos descritos en este documento. Puede realizarse un ensayo de la actividad enzimática que utiliza la PTP de tipo silvestre en presencia de un agente a ensayar, y la cantidad resultante de actividad enzimática puede compararse con la cantidad de actividad enzimática en ausencia del agente a ensayar. Una reducción en la actividad enzimática en presencia del agente a ensayar indica que el agente inhibe la interacción entre la PTP y su sustrato. Por el contrario, un aumento en la actividad enzimática en presencia del agente a ensayar indica que el agente potencia la interacción entre la PTP y su sustrato.

Como alternativa, puede realizarse un ensayo de unión competitiva utilizando el mutante de PTP en presencia de un agente a ensayar, y el grado resultante de unión del mutante de PTP con su sustrato puede compararse con el grado de unión en ausencia del agente a ensayar. Una reducción en el grado de unión en presencia del agente a ensayar indica

que el agente inhibe la interacción entre la PTP y su sustrato. Por el contrario, un aumento en el grado de unión en presencia del agente a ensayar indica que el agente potencia la interacción entre la PTP y su sustrato.

De esta manera, las composiciones y métodos descritos en este documento son útiles para identificar los sustratos fosforilados en tirosina de miembros de la familia PTP de fosfatasa, así como para regular la actividad de los sustratos identificados. Las composiciones y métodos descritos en este documento también son útiles para identificar proteínas fosforiladas en tirosina que están relacionadas con una enfermedad o trastorno particular, y se proporcionan métodos de selección de moduladores que potencien o inhiban la interacción PTP/sustrato para uso en aplicaciones terapéuticas.

## Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1E muestran un alineamiento múltiple de secuencias de los dominios catalíticos de PTP (SEC ID N° 1-35). Las PTP eucariotas citosólicas y el dominio 1 de RPTP se combinan en un grupo, los dominios 2 de RPTP están en un segundo grupo y la PTP de *Yersinia* está en un tercer grupo. En minúsculas se muestran los restos constantes compartidos por los tres grupos. Los restos constantes y muy conservados dentro de un grupo se muestran en cursiva y en negrita, respectivamente. Dentro de la secuencia de PTP de *Yersinia*, los restos que son constantes o están muy conservados entre la secuencia citosólica y la secuencia del dominio de RPTP se muestran en cursiva y en negrita, respectivamente. La posición de los restos de PTP1B que interaccionan con el péptido se indican con una punta de flecha pequeña, y la numeración de restos en la parte inferior del alineamiento corresponde a la de PTP1B.

La Figura 2 muestra los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  de diversos mutantes de PTP1B hacia RCML.

## Descripción detallada de la invención

La familia de enzimas PTP contiene un segmento común conservado evolutivamente de aproximadamente 250 aminoácidos conocido como dominio catalítico de PTP. Dentro de este dominio conservado hay un solo motivo de secuencia característico, [I/V] HCXAGXXR[S/T]G (SEC ID N° 36), que es constante entre todas la PTP. El resto de cisteína en este motivo es constante en miembros de la familia y se sabe que es esencial para la catálisis. Funciona como un nucleófilo para atacar el resto fosfato del sustrato entrante. Si el resto de cisterna se ha alterado por mutagénesis de localización dirigida y se ha cambiado por una serina (mutantes CS) o alanina (mutantes CA), la PTP resultante está atenuada catalíticamente pero conserva su capacidad de formar complejos o de unirse a su sustrato, al menos *in vitro*. Estos resultados se han confirmado en relación con la MKP-1, un miembro de la familia PTP (Sun *et al.*, *Cell* 75: 487-493 (1993)), así como con otras PTP. Sin embargo, aunque en general estos mutantes CS pueden unirse de forma eficaz a fosfotirosil sustratos *in vitro*, en muchos casos estos complejos no pueden aislarse *in vivo*. De esta manera, los mutantes CS están limitados en su aplicabilidad y no pueden usarse para aislar todas las combinaciones de PTP y sustratos.

Recientemente se han determinado las estructuras cristalinas de PTP1B sola (Barford, *et al.*, *Science* 263: 1397-1404 (1994)) y en un complejo con un péptido que contiene fosfotirosina (Jia *et al.*, *Science* 268: 1754-1758 (1995)). Estas estructuras indicaban veintisiete restos constantes (Barford *et al.*, 1994), de los cuales uno es un resto de aspartato. Este resto de aspartato es constante a lo largo de los dominios catalíticos de los miembros de la familia PTP. Es decir, si las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia PTP están alineadas, el resto de aspartato está presente en todas las PTP en una localización correspondiente, aunque los números de posición pueden ser diferentes debido a los cambios requeridos para maximizar el alineamiento (véase en la Figura (de Barford *et al.*, *Nature Struc. Biol.* 2: 1043-1053 (1995)) un alineamiento de diversas secuencias de PTP). Las secuencias para las que aún no se ha publicado el alineamiento pueden alinearse fácilmente con otras secuencias de PTP conocidas, por ejemplo, utilizando un software informático disponible tal como GENEWORKS.

De esta manera, pueden obtenerse fácilmente PTP mutantes distintas de las descritas específicamente en este documento alineando la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de PTP con las descritas en este documento, identificando el resto de aspartato constante y cambiando el resto por mutagénesis de localización dirigida. Aunque los ejemplos específicos de mutantes de PTP descritos en este documento son mutantes de aspartato a alanina (mutantes DA), se entiende que la invención no se limita a cambios de aspartato por alanina. El resto de aspartato constante puede cambiarse, por ejemplo, por mutagénesis de localización dirigida, por cualquier aminoácido que no produzca una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima pero que ocasione una reducción en la  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos de  $1 \text{ min}^{-1}$ ). Por ejemplo, el resto de aspartato constante puede cambiarse o mutarse por una alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, lisina, arginina o histidina.

Como se describe en este documento, se usaron células tratadas con pervanadato como una fuente abundante de proteínas fosforiladas en tirosina para investigar la especificidad por el sustrato de PTP-PEST. PTP-PEST es una PTP citosólica de 88 kDa (Charest *et al.*, *Biochem. J.* 308: 425-432 (1995); den Hertog *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 1241-1249 (1992); Takekawa *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1223-1230 (1992); Yang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 6622-6628 (1993); Yang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 17650 (1993)) que se expresa de forma ubicua en los tejidos de mamífero (Yi *et al.*, *Blood* 78: 2222-2228 (1991)) y que presenta una alta actividad específica cuando se ensaya *in vitro* usando sustratos fosforilados en tirosina artificiales (Garton y Tonks, *EMBO J.* 13: 3763-3771 (1994)). Previamente se ha demostrado que PTP-PEST está sometida a una regulación por la fosforilación de Ser39 *in vitro* e *in vivo*. Esta modificación se cataliza tanto por la proteína quinasa C (PKC) como por la proteína

quinasa (PKA) y tiene como resultado una reducción de la actividad enzimática como consecuencia de un aumento en la  $K_m$  de la reacción de desfosforilación (Garton y Tonks, *EMBO J.* 13: 3763-3771 (1994)). Parece probable que exista un mecanismo regulador adicional para PTP-PEST, ya que sería de esperar que esta enzima ejerciera una influencia negativa considerable sobre el estado de fosforilación de tirosina de sustratos citosólicos de tirosina quinasas. Una posibilidad es que esta influencia pueda limitarse por la especificidad por el sustrato de PTP-PEST.

La especificidad por el sustrato de PTP1B se investigó utilizando los mismos métodos indicados para PTP-PEST, con la excepción de que las células no se trataron con pervanadato. Se usó una combinación de experimentos de desfosforilación *in vitro* y experimentos de captura de sustrato para estudiar las interacciones de sustratos de PTP1B y PTP-PEST. Los métodos de captura de sustrato indicados en este documento se pueden aplicar en general a cualquier PTP gracias a su resto de aspartato constante compartido, y por lo tanto debe resultar útil para delinear la preferencia de sustrato de otros miembros de la familia PTP. En particular, el uso de PTP mutantes impedidas catalíticamente para capturar, y de esta manera aislar, posibles sustratos facilitará en gran medida la identificación de sustratos fisiológicamente importantes para PTP individuales, mejorando la comprensión de los papeles de estas enzimas en la regulación de procesos celulares.

Una realización de la invención se refiere a nuevas PTP en las que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima, pero que ocasiona una reducción en la  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos de  $1 \text{ min}^{-1}$ ). Estas PTP conservan la capacidad de formar un complejo con, o de unirse a sus sustratos fosforilados en tirosina, pero están catalíticamente atenuadas. Como se define en este documento, se entiende que la actividad "atenuada" significa que la fosfatasa conserva una  $K_m$  similar a la de la fosfatasa de tipo silvestre, pero tiene un valor de  $V_{max}$  que está reducido en un factor de al menos  $10^4$  con respecto a la enzima de tipo silvestre. Esto incluye la actividad catalítica que se ha reducido o anulado con respecto a la PTP de tipo silvestre. Por ejemplo, el resto de aspartato constante puede cambiarse o mutarse a una alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, lisina, arginina o histidina.

Las nuevas PTP descritas en este documento, en las que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima pero que ocasiona una reducción en la  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos de  $1 \text{ min}^{-1}$ ), también pueden comprender otras mutaciones, particularmente las que ayudan a estabilizar el complejo PTP/sustrato. Por ejemplo, una mutación del resto [serina/treonina] en el motivo característico por un resto de alanina cambia la etapa determinante de la velocidad de la reacción de desfosforilación desde la formación del estado de transición hasta la descomposición del estado de transición, estabilizando de esta manera el complejo PTP/sustrato. Estas mutaciones pueden combinarse de forma valiosa con el reemplazo del resto de aspartato constante, particularmente ayudando a estabilizar el complejo y facilitando la observación y aislamiento del complejo.

Las PTP adecuadas para uso en la invención incluyen cualquier PTP que tenga un resto de aspartato constante en una posición correspondiente. Como se define en este documento, una fosfatasa es un miembro de la familia PTP si contiene el motivo característico  $[I/V] \text{HCXAGXXR}[S/T]G$  (SEC ID N° 36). También son adecuadas para uso en la invención PTP de especificidad doble, es decir, PTP que desfosforilan tanto la tirosina fosforilada como la serina o treonina fosforiladas. Las PTP apropiadas incluyen, pero sin limitación, PTP1B, PTP-PEST, PTP<sub>γ</sub>, MKP-1, DEP-1, PTP<sub>μ</sub>, PTPX1, PTPX10 y PTPH1.

En una realización, la invención se refiere a la fosfatasa PTP1B en la que el resto de aspartato en la posición 181 se ha reemplazado por alanina (D181A). En otra realización, la invención se refiere a la fosfatasa PTP-PEST en la que el resto de aspartato constante en la posición 199 se ha reemplazado por una alanina (D199A). Otra realización de la invención se refiere a una fosfatasa PTP-PEST en la que el resto de cisteína en la posición 231 se ha reemplazado por una serina (C231S).

La invención también se refiere a un método para identificar una proteína fosforilada en tirosina que es un sustrato de una proteína tirosina fosfatasa particular. De acuerdo con una realización de la presente invención, una proteína fosforilada en tirosina de interés se combina con al menos una PTP en la que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima pero que ocasiona una reducción en la  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos de  $1 \text{ min}^{-1}$ ) (por ejemplo, un resto de alanina), y se determina la presencia o ausencia del complejo entre la proteína y la PTP. La presencia de un complejo en la combinación indica que la proteína fosforilada en tirosina es un sustrato de la PTP. El mutante PTP DA (mutante de captura de sustrato) se une o forma complejos con su sustrato pero no lo desfosforila (o lo hace muy lentamente), permitiendo de esta manera el aislamiento e identificación del complejo.

El complejo proteína fosforilada/PTP puede aislarse por técnicas de aislamiento convencionales como las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 5.352.660 de Pawson, incluyendo desplazamiento salino, cromatografía, electroforesis, filtración en gel, fraccionamiento, absorción, electroforesis en gel de poliacrilamida, aglutinación o combinaciones de las mismas. Además, para facilitar la determinación de la presencia del complejo proteína/PTP, pueden usarse anticuerpos contra la PTP o la proteína fosforilada, así como PTP marcadas y/o sustratos fosforilados marcados. La PTP o la proteína fosforilada puede marcarse con diversas enzimas, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, biotina, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa y acetilcolinesterasa. Los ejemplos de materiales fluo-

rescentes adecuados incluyen, pero sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina.

Los materiales luminiscentes apropiados incluyen luminol y los materiales radiactivos adecuados incluyen fósforo radiactivo  $^{32}\text{P}$ , yodo  $\text{I}^{125}$ ,  $\text{I}^{131}$  o tritio.

Como alternativa, la invención se refiere a un método para identificar una proteína fosforilada en tirosina que es un sustrato de una PTP, que comprende combinar una PTP de interés en la que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima pero que ocasiona una reducción en la  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos de  $1 \text{ min}^{-1}$ ) (por ejemplo, un resto de alanina), con al menos una proteína fosforilada en tirosina, produciendo de esta manera una combinación; y determinar la presencia o ausencia de un complejo en la combinación, donde la presencia de un complejo en la combinación entre una proteína fosforilada en tirosina y la PTP indica que la proteína fosforilada en tirosina es un sustrato de la PTP.

Las PTP de captura de sustrato de la presente invención también pueden usarse en lugar de las PTP de tipo silvestre para seleccionar en bibliotecas de fosfotirosil péptidos los péptidos que se unen a la PTP como se describe en Songyang *et al.*, (*Nature* 373: 536-539 (1995); *Cell* 72: 767-778 (1993)). Los péptidos identificados a partir de tales bibliotecas peptídicas pueden evaluarse para determinar si las proteínas fosforiladas en tirosina que contienen estos péptidos existen de forma natural.

Cualquier proteína fosforilada en tirosina es adecuada como posible sustrato en la presente invención. Las proteínas fosforiladas en tirosina son bien conocidas en la técnica. Los ejemplos específicos de sustratos apropiados incluyen, sin limitación,  $\text{p130}^{\text{cas}}$ , el receptor de EGF, p210 bcr:abl, MAP quinasa y el receptor de la insulina. Tienen un interés particular proteínas fosforiladas en tirosina que se han implicado en una enfermedad o trastorno de mamífero.

La invención también se refiere a un método para reducir la actividad de una proteína fosforilada en tirosina, que comprende administrar a un mamífero una PTP en la que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima, pero que ocasiona una reducción en la  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos de  $1 \text{ min}^{-1}$ ) (por ejemplo, un resto de alanina) y que forma un complejo con la proteína fosforilada en tirosina. El mutante PTP DA se une a la proteína fosforilada sin desfosforilarla (o causando una desfosforilación a una velocidad muy reducida), inhibiendo de esta manera la actividad de la proteína y reduciendo sus efectos corriente abajo. Como se usa en este documento, "reducción" incluye tanto la reducción como la anulación completa, por ejemplo, de una o más actividades o funciones de la proteína fosforilada.

Por ejemplo, la invención se refiere a un método para reducir los efectos de transformación de oncogenes asociados con  $\text{p130}^{\text{cas}}$ , un sustrato de PTP-PEST, que comprende administrar a un mamífero PTP-PEST de tipo silvestre o PTP-PEST donde el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un resto de alanina. La PTP-PEST de tipo silvestre se une y desfosforila  $\text{p130}^{\text{cas}}$ , regulando de esta manera de forma negativa sus efectos corriente abajo. Los mutantes DA de PTP-PEST se unen pero no desfosforilan  $\text{p130}^{\text{cas}}$  (o lo hacen a una velocidad muy reducida); de esta manera el sustrato se une en el complejo con la forma de captura de sustrato de PTP-PEST y no puede ejercer sus efectos corriente abajo. De manera similar, la invención se refiere a un método para reducir la formación de complejos de señalización asociados con  $\text{p130}^{\text{cas}}$ , particularmente los complejos de señalización que inducen rutas mitogénicas, que comprende administrar a un mamífero PTP-PEST de tipo silvestre o PTP-PEST donde el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un resto de alanina. La PTP se une y/o desfosforila  $\text{p130}^{\text{cas}}$ , regulando de esta manera de forma negativa los efectos corriente abajo de  $\text{p130}^{\text{cas}}$  y reduciendo la formación de complejos de señalización asociados con  $\text{p130}^{\text{cas}}$ .

Las PTP mutantes de captura de sustrato de la presente invención pueden usarse prácticamente en cualquier aplicación en lugar o además de la PTP de tipo silvestre correspondiente. Las ventajas de esta utilidad se basan en la capacidad de la PTP mutante de imitar la función de la enzima de tipo silvestre, por ejemplo, reducir la actividad de su sustrato fosforilado en tirosina, sin inducir los efectos citotóxicos perjudiciales observados comúnmente con la administración o sobreexpresión de la PTP de tipo silvestre. De esta manera, la invención también se refiere a un método para reducir los efectos citotóxicos asociados con la administración o sobreexpresión de PTP de tipo silvestre. Por ejemplo, se ha demostrado que los mutantes CS de MKP-1 tienen el mismo efecto funcional que la MKP-1 de tipo silvestre sin la inducción de efectos secundarios potencialmente perjudiciales. De esta manera, las PTP descritas en este documento, en las que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima pero que ocasiona una reducción en la  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos  $1 \text{ min}^{-1}$ ) (por ejemplo, un resto de alanina), pueden usarse en muchas aplicaciones en lugar de la enzima de tipo silvestre correspondiente. Como se usa en este documento, una enzima "correspondiente" es una que es igual que la PTP mutante (por ejemplo, PTP-PEST y PTP-PEST D199A) o una que es diferente de la PTP mutante pero reconoce el mismo sustrato que la PTP mutante.

Las PTP mutantes descritas en este documento también pueden usarse terapéuticamente para reducir la actividad de una proteína fosforilada en tirosina, tal como por medio un método de terapia génica en el que la PTP mutante descrita en este documento, o una parte funcional de la misma que retiene la capacidad de unirse a su sustrato fosforilado en tirosina, se introduce en un sujeto en el cual se expresa la PTP mutante. La PTP mutante reemplaza, parcial o totalmente, la enzima de tipo silvestre que se produce normalmente o compete con la PTP de tipo silvestre por la unión al sustrato. Por ejemplo, puede identificarse una proteína fosforilada en tirosina específica que esté implicada

en una enfermedad o trastorno particular (tal como una proteína tirosina quinasa). Por los métodos descritos en este documento puede identificarse al menos una PTP que actúa desfosforilando la proteína fosforilada en tirosina seleccionada de la presente invención. El tipo silvestre o la forma mutante de la PTP puede administrarse a un sujeto que necesite tratamiento para ligarse o unirse al sustrato fosforilado en tirosina, inhibiendo o reduciendo de esta manera la función de la proteína fosforilada. En una realización preferida, la PTP mutante se administra en lugar de la enzima de tipo silvestre para reducir los efectos citotóxicos asociados con la sobreexpresión de la enzima de tipo silvestre. En la técnica se conocen procedimientos para terapia génica (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.399.346 de Anderson *et al.*) y pueden modificarse por métodos conocidos en la técnica para expresar de manera apropiada las PTP mutantes específicas y de tipo silvestre de la presente invención.

La presente invención también se refiere a ensayos para identificar agentes que alteran, por ejemplo, potencian o inhiben, la interacción entre una PTP y su sustrato fosforilado. Los agentes identificados por estos ensayos pueden ser agonistas (por ejemplo, agentes que potencian o aumentan la actividad de la PTP) o antagonistas (por ejemplo, agentes que inhiben o reducen la actividad de la PTP) de la actividad PTP. El agente puede ser una sustancia fisiológica endógena o puede ser un fármaco natural o sintético, incluyendo moléculas orgánicas pequeñas.

Por ejemplo, el sustrato fosforilado en tirosina de una PTP puede identificarse por los métodos descritos en este documento. Puede realizarse un ensayo de la actividad enzimática que utiliza la PTP de tipo silvestre en presencia de un agente a ensayar, y la cantidad resultante de actividad enzimática puede compararse con la cantidad de actividad enzimática en ausencia del agente a ensayar. En la técnica se conocen ensayos de la actividad enzimática; por ejemplo, se describen ensayos de la actividad PTP usando un sustrato marcado con  $^{32}\text{P}$  y fosforilado en tirosina en Flint *et al.* (*EMBO J.* 12: 1937-1946 (1993)). Una reducción en la actividad enzimática en presencia del agente a ensayar indica que el agente inhibe la interacción entre la PTP y su sustrato. Por el contrario, un aumento en la actividad enzimática en presencia del agente a ensayar indica que el agente potencia la interacción entre la PTP y su sustrato.

Como alternativa, puede realizarse un ensayo de unión competitiva utilizando la PTP mutante en presencia de un agente a ensayar, y el grado resultante de unión de la PTP mutante a su sustrato puede compararse con el grado de unión en ausencia del agente a ensayar. En la técnica se conocen ensayos de unión competitiva; por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.352.660 de Pawson describe métodos adecuados para uso en esta invención. Una reducción en el grado de unión en presencia del agente a ensayar indica que el agente inhibe la interacción entre la PTP y su sustrato. Por el contrario, un aumento en el grado de unión en presencia del agente a ensayar indica que el agente aumenta la interacción entre la PTP y su sustrato.

De acuerdo con la presente invención, en este documento pueden usarse péptidos fosforilados en tirosina identificados con PTP mutantes a partir de bibliotecas peptídicas por los métodos de Songyang *et al.* (*Nature* 373: 536-539 (1995); *Cell* 72: 767-778 (1993)) en lugar de la proteína fosforilada en tirosina completa en ensayos de unión competitiva.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una PTP en la que el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que no produce una alteración significativa de la  $K_m$  de la enzima pero que ocasiona una reducción en la  $K_{cat}$  a menos de 1 por minuto (menos de  $1 \text{ min}^{-1}$ ) (por ejemplo, un resto de alanina). Por ejemplo, la PTP de la presente invención puede formularse con un medio fisiológicamente aceptable para preparar una composición farmacéutica. El medio fisiológico particular puede incluir, pero sin limitación, agua, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa. La concentración óptima del ingrediente o ingredientes activos en el medio elegido puede determinarse empíricamente, de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los especialistas en química medicinal, y dependerá de la formulación farmacéutica final deseada. Los métodos de introducción de PTP exógenas en el sitio de tratamiento incluyen, pero sin limitación, la vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral e intranasal. Otros métodos de introducción adecuados también pueden incluir dispositivos recargables o biodegradables y dispositivos poliméricos de liberación lenta. Las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden administrarse como parte de una terapia combinatoria con otros agentes.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la presente invención y no deben considerarse limitantes del alcance de esta invención. Las enseñanzas de todas las referencias citadas en este documento se incorporan como referencia en su totalidad.

## Ejemplos

### Materiales y Métodos

A continuación se proporciona una descripción de los materiales y métodos usados en el trabajo descrito en este documento.

### Generación, Expresión y Purificación de Proteínas PTP Mutantes

Se produjeron mutaciones puntuales dentro de los dominios catalíticos de PTP-PEST (D199A, C231S) y PTP1B (D181A, C215S) por mutagénesis de localización dirigida usando el kit de mutagénesis *in vitro* Muta-Gene™ (BioRad, Richmond, CA). Después se cambiaron regiones que contenían la mutación puntual requerida por las secuencias

de tipo silvestre dentro de vectores de expresión apropiados, y las regiones mutantes reemplazadas se secuenciaron en su totalidad para verificar la ausencia de mutaciones adicionales.

Se expresaron proteínas PTP-PEST de longitud completa (proteínas de tipo silvestre y mutantes, que contenían mutaciones de Asp199 a Ala o Cys231 a Ser) y el dominio catalítico de PTP-PEST de tipo silvestre (aminoácidos 1-305) en células Sf9 usando baculovirus recombinante (BaculoGold™, Pharmingen, San Diego, CA) y se purificaron como se describe en Garton y Tonks (*EMBO J.* 13: 3763-3771 (1994)). También se expresaron formas truncadas de las proteínas PTP-PEST de tipo silvestre y mutante, que comprendían los restos aminoacídicos 1-305 de PTP-PEST en *E. coli* como proteínas de fusión con GST después de la subclonación del ADN de PTP-PEST en fase cadena abajo de GST en vectores pGEX (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Suecia). Veinticinco ml de células *E. coli* transformadas con el vector apropiado se dejaron crecer hasta la fase logarítmica ( $DO_{600}$  aproximadamente 0,5). Después se indujo la expresión de la proteína de fusión por la adición de isopropil-1-tio-b-D-galactopiranosido 0,2 mM, y las células se cultivaron durante 2-4 horas a 30°C. Las células se recogieron por centrifugación, se incubaron con 50 mg/ml de lisozima en 3 ml de tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, 5 mg/ml de leupeptina, 5 mg/ml de aprotinina, Triton X-100 al 0,1% y NaCl 150 mM, y después se lisaron por sonicación (3 x 10 s). Después de retirar el material insoluble por centrifugación (20 minutos a 300.000 x g), las proteínas de fusión se aislaron por incubación durante 30 min a 4°C con 100 ml de perlas de glutatión-Sepharose (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Suecia), y las perlas después se recogieron por centrifugación y se lavaron tres veces con tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM, benzamidina 1 mM, 1 mg/ml de leupeptina, 1 mg/ml de aprotinina, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1% y NaCl 100 mM). Este procedimiento produjo una proteína de fusión esencialmente homogénea a una concentración de 1 mg de proteína/ml de perlas de glutatión-Sepharose. Se expresaron proteínas PTP1B (tipo silvestre y formas mutantes) que comprendían los aminoácidos 1-321 en *E. coli* y se purificaron hasta la homogeneidad como se describe en Barford *et al.* (*J. Mol. Biol.* 239: 726-730 (1994)).

#### 25 Cultivo Celular, Transfección, Preparación de Lisados y Fraccionamiento

Se cultivaron células HeLa y COS en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 5%; se cultivaron células Wi38, C2C12 y MvLu en DMEM que contenía FBS al 10%; se cultivaron células 293 en DMEM que contenía suero bovino al 10%; se cultivaron células MCF10A en DMEM al 50%, F-12 de Ham al 50% que contenía suero de caballo al 5%, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 10 mg/ml de insulina, 0,5 mg/ml de hidrocortisona y 0,25 mg/ml de fungizona. Todos los medios también contenían penicilina y estreptomycin a 100 U/ml y 100 mg/ml respectivamente, y todas las células se cultivaron a 37°C. Se usó transfección mediada por fosfato cálcico para introducir ADNc que codificaba las proteínas PTP-PEST de tipo silvestre y mutante en células COS. Estas proteínas se codificaban por ADNc de PTP-PEST subclonado en el plásmido PMT2, a partir del cual se dirigió la expresión por un promotor tardío principal de adenovirus; se usaron 20 mg de ADN para la transfección de cada placa de 10 cm de células. El nivel de expresión de las construcciones PTP-PEST fue similar en todos los casos.

Antes de la lisis de las células, se trataron cultivos de células con una confluencia de 70-90% durante 30 minutos con pervanadato 0,1 mM (20 ml de una solución reciente que contenía metavanadato sódico ( $NaVO_3$ ) 50 mM y  $H_2O_2$  50 mM a 10 ml de medio). El tratamiento de las células con  $H_2O_2$  y vanadato conduce a un aumento sinérgico en los niveles de fosfotirosina, supuestamente debido a la inhibición de las PTP intracelulares por vanadato. Previamente se ha sugerido que la sinergia entre  $H_2O_2$  y vanadato se debe a la mejor acumulación del vanadato oxidado resultante (pervanadato) dentro de las células en comparación con el propio vanadato (Heffetz *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 2896-2902 (1990)). Es importante indicar que durante la preparación de los lisados celulares, se produce dilución de tal forma que se pierde el efecto inhibidor del vanadato sobre la acción de la PTP. El tratamiento con pervanadato ocasionó la aparición de al menos 50 bandas proteicas de fosfotirosina prominentes en todos los tipos celulares, mientras que las células no tratadas contenían niveles prácticamente indetectables de fosfotirosina (datos no mostrados).

Las células se lisaron en tampón A que contenía ácido yodoacético 5 mM, que se incluyó para inhibir irreversiblemente las PTP celulares. Después de la incubación a 4°C durante 30 minutos, se añadió DTT 10 mM para inactivar todo el ácido yodoacético que no había reaccionado. El material insoluble después se retiró por centrifugación durante 20 minutos a 300.000 x g. Los lisados resultantes fueron estables con respecto a su contenido de fosfotirosina durante el almacenamiento a largo plazo (durante varios meses) a -70°C y durante una incubación prolongada (de al menos 20 horas) a 4°C, en ausencia de PTP exógenas añadidas.

El lisado de células HeLa tratado con pervanadato se fraccionó por cromatografía de intercambio aniónico usando una columna de FPLC Mono Q (Pharmacia). La muestra (50 mg de proteína total a 3 mg/ml en tampón A) se diluyó en tres volúmenes de tampón B (tris-HCl 20 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, benzamidina 1 mM, 1 mg/ml de leupeptina, 1 mg/ml de aprotinina y Triton X-100 al 0,1%) antes de la carga. Las proteínas se eluyeron a un caudal de 1 ml/min con un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M en tampón B en 20 fracciones (volumen de la fracción 1 ml), seguido de un segundo gradiente de NaCl 0,5-1,0 M en tampón B durante 5 fracciones. Se detectaron proteínas que contenían fosfotirosina dentro de las fracciones 7-21 de acuerdo con la inmunotransferencia anti-fosfotirosina. Se siguieron los mismos procedimientos para PTP1B, con la excepción de que las células no se trataron con pervanadato.



### Reacciones de Desfosforilación

Se incubaron en hielo lisados de células HeLa tratadas con pervanadato (1-2 mg de proteína/ml) que contenían proteínas fosforiladas en tirosina en ausencia o presencia de PTP activas purificadas a una concentración de 2 nM. La desfosforilación se terminó por la eliminación de alícuotas (30 mg de proteína) en un tampón de muestra de SDS-PAGE y el grado de desfosforilación se determinó por inmunotransferencia usando el anticuerpo monoclonal G104. Los ensayos de actividad PTP usando RCM-lisozima marcada con <sup>32</sup>P fosforilada en tirosina como sustrato se realizaron como se describe en Flint *et al.* (*EMBO J.* 12: 1937-1946 (1993)).

### Anticuerpos e Inmunotransferencia

El anticuerpo monoclonal PTP-PEST AG25 se indujo contra PTP-PEST de longitud completa purificada y expresada en baculovirus. El anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina G104 se generó usando como antígeno fosfotirosina, alanina y glicina en una relación 1:1:1, polimerizada en presencia de hemocianina de lapa californiana con 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida, un método descrito originalmente en Kamps y Sefton (*Oncogene* 2: 305-315 (1988)). El anticuerpo monoclonal p130<sup>cas</sup> procedía de Transduction Laboratories (Lexington, Ky). El anticuerpo monoclonal FG6 contra PTP1B se proporcionó por Dr David Hill (Calbiochem Oncogene Research Products, Cambridge, MA). La visualización de las proteínas por inmunotransferencia se consiguió aumentando la quimioluminiscencia (ECL) usando anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL) y el sistema de sustrato CL-HRP SuperSignal<sup>TM</sup> (Pierce, Rockford, IL).

### Inmunoprecipitación y Captura de Sustrato

La inmunoprecipitación de PTP-PEST a partir de células COS transfectadas se realizó después del acoplamiento covalente del anticuerpo monoclonal AG25 a perlas de proteína A-Sepharose (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Suecia) usando el agente de entrecruzamiento químico pimelimidato de dimetilo (Schneider *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 10766-10769 (1982)). Primero se unió el anticuerpo a proteína A-Sepharose a una concentración de 1 mg/ml de volumen de perlas, y después se retiró el material no unido por tres lavados con borato sódico 0,2 M, pH 9. El acoplamiento covalente se consiguió por incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos en presencia de pimelimidato de dimetilo 20 mM en borato sódico 0,2 M, pH 9. Después, las perlas se incubaron durante 1 hora con un exceso de etanolamina 0,2 M, pH 8, para bloquear todo el agente de entrecruzamiento que no había reaccionado, y se lavaron tres veces con PBS antes del almacenamiento a 4°C. Se usaron 10 ml de perlas AG25 para precipitar la PTP-PEST introducida por transfección de los lisados que contenían aproximadamente 0,375 mg de proteína.

La captura del sustrato se realizó usando varias matrices de afinidad de PTP. La matriz de PTP-PEST de longitud completa utilizó perlas AG25-proteína A-Sepharose acopladas covalentemente a las que se había unido proteína PTP-PEST expresada en baculovirus purificada. Se incubaron alícuotas (10 ml) de perlas AG25 durante 2 horas a 4°C en 100 ml de tampón A en presencia de 5 mg de PTP-PEST purificada (formas de tipo silvestre o mutantes); y después se retiró la PTP-PEST no unida lavando tres veces con 1 ml de tampón A. Las perlas de PTP-PEST-AG25-proteína A-Sepharose resultantes contenían aproximadamente 2 mg de PTP-PEST por alícuota de 10 ml. La captura de sustrato también se realizó con perlas de glutatión-Sepharose unidas a proteínas de fusión de GST expresadas en bacterias que contenían el dominio catalítico de PTP-PEST.

En los experimentos de captura de sustrato también se usó PTP1B. En este caso, el anticuerpo monoclonal FG6 se preacopló a proteína A-Sepharose en ausencia de agente de entrecruzamiento (2 mg de anticuerpo/10 ml de perlas), después se añadieron proteínas PTP1B purificadas en exceso y se incubaron a 4°C durante 2 horas. Después de retirar la PTP1B no unida, 10 ml de perlas contenían aproximadamente 2 mg de PTP1B.

Como fuente de proteínas que contenían fosfotirosina para los experimentos de captura de sustrato se usaron lisados celulares, o fracciones de columna, tratados con pervanadato. En general, se incubaron lisados que contenían 0,25-0,5 mg de proteína en 0,5 ml de tampón A (que incluía ácido yodoacético 5 mM, DTT 10 mM) a 4°C durante 2 horas en presencia de 10 ml de matriz de afinidad que contenía aproximadamente 2 mg de la proteína PTP apropiada. Después se retiraron las proteínas no unidas de las muestras lavando tres veces con 1 ml de tampón A, y el material unido se recogió por la adición de 50 ml de tampón de muestra SDS-PAGE seguido de calentamiento a 95°C durante 5 minutos; las proteínas unidas a las perlas después se analizaron por SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia.

### Resultados

A continuación se proporcionan detalles de los resultados del trabajo descrito en este documento realizado como se ha descrito anteriormente.

### PTP1B y p210 bcr:abl

La leucemia mielógena crónica (CML) es un trastorno clonal de las células madre hematopoyéticas que se caracteriza por el cromosoma Philadelphia, en el que el proto-oncogén c-Abl en el cromosoma 9, que codifica una PTK, se une al gen bcr del cromosoma 22. Esto tiene como resultado la generación de una proteína de fusión bcr:abl, p210 bcr:abl, en la que la actividad PTK está potenciada con respecto a la de c-Abl. Los datos actuales indican que esta anomalía citogenética es el acontecimiento causante principal y único de la CML. La expresión de p210 bcr:abl produce

patrones anormales de fosforilación en tirosina que tienen como resultado la maduración aberrante de la célula madre hematopoyética que es característica de la CML.

La expresión del ARNm y de la proteína PTP1B está aumentada como consecuencia de la expresión de p210 bcr:abl en células Rat1, Mo7 y BaF3. También se observaron cambios en la actividad de PTP1B, que correspondían al cambio en la proteína enzimática. Estos cambios son específicos para PTP1B y no se ven en el homólogo muy relacionado TC-PTP (con una identidad de 65%) o en otras PTP ensayadas, incluyendo SHP-1, SHP-2 y PTP-PEST. También se observó el aumento de expresión de PTP1B en células linfoides B Ph+ procedentes de un paciente con CML con respecto a las células Ph del mismo paciente.

Los cambios en los niveles de PTP1B se indujeron específicamente por p210 bcr:abl y no se observaron en células que expresaban otras PTK incluyendo v-abl, v-src u otras oncoproteínas tales como myc. La actividad PTK de p210 bcr:abl fue esencial para el aumento en la expresión de PTP1B, ya que la expresión de una lisina inactiva a una forma mutante de arginina de p210 bcr:abl en células Rat1 no alteraba los niveles de PTP1B. El aumento de los niveles de PTP1B es una respuesta rápida a la inducción de p210 bcr:abl. Cuando se cambiaron células BaF3 que expresaban una forma mutante sensible a la temperatura de p210 bcr:abl a la temperatura permisiva para la PTK, se observó que los niveles de PTP1B aumentaban en 12-24 horas, lo cual coincidía con la aparición de la forma activa de la PTK. Estos datos indican que la alteración en los niveles de PTP1B es una respuesta relativamente rápida a la aparición de p210 bcr:abl, en lugar de una respuesta adaptativa a largo plazo de las células.

En experimentos de cotransfección transitoria en células COS, PTP1B desfosforila p210 bcr:abl pero no v-abl. Cuando el mutante PTP1B D181A se expresó como una proteína de fusión de GST, se purificó y se incubó con lisados de células Mo7-p210 (que sobreexpresa p210 bcr:abl), se aisló un complejo del mutante PTP y p210 bcr:abl. Por el contrario, c-abl fosforilada en tirosina, que también estaba presente en los lisados, no se unía a la PTP mutante. La interacción entre PTP1B D181A y p210 bcr:abl se bloqueó por vanadato, lo que sugería que la interacción estaba implicada en el sitio activo de PTP.

Después de la coexpresión transitoria en células COS, PTP1B D181A formó un complejo con p210 bcr:abl. Los datos preliminares indican que la forma mutante Y177F de p210 bcr:abl no interaccionaba con PTP1B D181A, lo que sugería que este resto de tirosina es un componente del sitio de unión en la PTK. Este resto de tirosina en p210 bcr:abl se fosforila *in vivo* y se ha demostrado que sirve como sitio de acoplamiento para GRB2. La interacción directa de la pTyr en p210 bcr:abl y el dominio SH2 de GRB2 es esencial para la actividad de transformación de la PTK. La interacción de PTP1B D181A con p210 bcr:abl interfiere con la asociación de la PTK con GRB2. Considerados conjuntamente, estos datos sugieren que p210 bcr:abl es un sustrato fisiológico de PTP1B y que PTP1B puede funcionar como antagonista de la oncoproteína PTK *in vivo*. En la Figura 2 se muestran los valores de Vmax, Km y Kcat de mutantes PTP1B de 37kDa hacia RCML.

#### *PTP1B y el Receptor de EGF*

La expresión de PTP1B D181A en células COS conduce a un aumento de la fosforilación de restos de tirosilo en una proteína de 180 kDa y en proteínas de 120 y 70 kDa. Cuando una proteína de fusión GST-PTP1B D181A se expresó en células COS y se precipitó en Glutación-Sepharose, coprecipitaron la proteína de 180 kDa y cantidades más pequeñas de p120 y p70. La proteína p180 se identificó como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) por inmunotransferencia. La identidad de las proteínas p120 y p70 no está clara; sin embargo, esta última no es src, p62 o paxilina.

La expresión de PTP1B D181A en células COS induce la fosforilación de tirosina del receptor de EGF en ausencia de su ligando, EGF, indicando que la PTP mutante ejerce sus efectos en la célula intacta y no después de la lisis. El mutante D199A PTP-PEST equivalente no interacciona con el receptor de EGF, indicando la especificidad de esta interacción con el sustrato.

Se requiere la autofosforilación del receptor de EGF para la interacción con PTP1B D181A. Los mutantes del receptor con actividad quinasa inactiva o en los que se han delecionado los sitios de autofosforilación no interaccionan con PTP1B D181A. En células que expresan v-src, se observó una gran cantidad de proteínas fosforiladas en tirosina, pero no se detectó la fosforilación del receptor de EGF. En estas condiciones, PTP1B D181A se unía predominantemente a una proteína fosforilada en tirosina de 70 kDa.

Como resultado de este trabajo, parece ser que PTP1B puede modular las rutas de señalización inducidas por EGF, quizás incluyendo las rutas de muchas enfermedades, incluyendo el cáncer de mama.

#### *Desfosforilación Preferente de una Proteína de 130 kDa que Contiene Fosfotirosina por PTP-PEST*

Para investigar la especificidad de sustrato de PTP-PEST *in vitro*, se incubaron en hielo alícuotas de lisados de células HeLa tratadas con pervanadato, produciendo 50-100 proteínas que contenían fosfotirosina distintas a juzgar por la inmunotransferencia del lisado celular usando el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina G104. Después se añadieron al lisado PTP-PEST de longitud completa purificada (expresada en células Sf9 usando baculovirus recombinante), el dominio catalítico de PTP-PEST o el dominio catalítico de PTP1B (forma de 37 kDa), y se retiraron alícuotas a diversos puntos de tiempo para el análisis por SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia anti-fosfotirosina.

Sorprendentemente, una banda de fosfotirosina de 130 kDa prominente (p130) se desfosforiló selectivamente por PTP-PEST en 10 minutos, mientras que la intensidad de las demás bandas permaneció esencialmente sin cambios incluso después de 60 minutos de incubación con PTP-PEST. Las incubaciones prolongadas con mayores concentraciones de PTP-PEST (mayores de 100 veces) dieron como resultado la eliminación completa de todas las bandas de fosfotirosina del lisado. Sin embargo, en todas las condiciones ensayadas, se descubrió que p130 se desfosforilaba más rápidamente que todas las demás bandas presentes.

También se observó la desfosforilación selectiva de p130 por PTP-PEST usando una forma truncada de la fosfatasa (restos aminoacídicos 1-305) que esencialmente contiene sólo el dominio catalítico de la enzima. Este resultado sugiere que la preferencia de sustrato sorprendente presentada por PTP-PEST en este análisis es una propiedad intrínseca del dominio catalítico de la fosfatasa, mientras que los 500 restos aminoacídicos C-terminales tienen poco efecto apreciable sobre la especificidad de sustrato de la enzima.

La especificidad de la interacción entre PTP-PEST y p130 se abordó usando el dominio catalítico de PTP1B (restos aminoacídicos 1-321) en reacciones de desfosforilación. Cuando se añadió a una concentración molar similar a la usada para PTP-PEST, se descubrió que PTP1B desfosforilaba completa y rápidamente (dentro de un período de 15 minutos) la mayoría de las proteínas que contenían fosfotirosina presentes en el lisado de células HeLa tratadas con pervanadato. Además, el transcurso de tiempo de desfosforilación de p130 no fue significativamente más rápido que el de las otras bandas de fosfotirosina desfosforiladas por PTP1B. Sin embargo, debe indicarse que estos resultados de desfosforilación *in vitro* no son realmente ilustrativos de la especificidad por el sustrato de PTP1B *in vivo* por varias razones. En primer lugar, en este experimento en particular sólo se usó la subunidad catalítica aislada. Además, la especificidad por el sustrato *in vivo* puede ser bastante diferente debido a la distribución intracelular tanto de PTP como de los posibles sustratos. Es decir, los experimentos de desfosforilación *in vitro* pueden utilizar sustratos que la PTP puede desfosforilar, pero a los que no tendría acceso *in vivo*. El fenómeno de la diferente especificidad de sustrato que depende de los diferentes contextos fisiológicos se ilustra por una comparación de estos datos con el trabajo de PTP1B *in vivo* descrito anteriormente, donde PTP1B mostró especificidad sólo por tres proteínas.

#### *Identificación de Proteína p130 que Contiene Fosfotirosina como p130<sup>cas</sup> por Captura de Sustrato*

Se fraccionó lisado de células HeLa tratadas con pervanadato por cromatografía de intercambio aniónico y se analizaron alícuotas de las fracciones por SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfotirosina o anti-p130<sup>cas</sup>. Después se incubaron alícuotas de todas las muestras analizadas con una matriz de afinidad que contenía un mutante PTP-PEST de captura de sustrato, que comprendía PTP-PEST de longitud completa donde la Asp199 se había cambiado por alanina (D199A), unido a perlas de proteína A-Sepharose/anticuerpo (AG25) acopladas covalentemente. Las proteínas asociadas con PTP-PEST después se analizaron por SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfotirosina o anti-p130<sup>cas</sup>.

La inmunotransferencia anti-fosfotirosina de las fracciones de columna demostró que la banda de fosfotirosina p130 eluía como un solo pico en las fracciones 11-14 (NaCl aproximadamente 0,3 M). En vista de la abundancia de p130 fosforilada en tirosina en los lisados de células HeLa, parecía probable que p130 representara una proteína de 130 kDa que contenía fosfotirosina identificada previamente. En la bibliografía se identificaron varios posibles candidatos, incluyendo la quinasa de adhesión focal p125<sup>FAK</sup>, ras-GAP, gp130 y p130<sup>cas</sup>. De estos candidatos, p130<sup>cas</sup> se ha identificado como una banda de fosfotirosina particularmente prominente en una amplia diversidad de sistemas, incluyendo fibroblastos transformados con v-crk (Mayer y Hanafusa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2638-2642 (1990); Mayer *et al.*, *Nature* 332: 272-275 (1988)) y src (Kanner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3328-3332 (1990); Reynolds *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9: 3951-3958 (1989)), adhesión celular mediada por integrina (Nojima *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 15398-15402 (1995); Petch *et al.*, *J. Cell Science* 108: 1371-1379 (1995); Vuori y Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* 270: 22259-22262 (1995)) y células 3T3 estimuladas con PDGF (Rankin y Rozengurt, *J. Biol. Chem.* 269: 704-710 (1994)).

Por lo tanto, la posibilidad de que la banda de fosfotirosina p130 corresponda a p130<sup>cas</sup> se ensayó por inmunotransferencia de las fracciones de Mono Q usando un anticuerpo contra p130<sup>cas</sup>. La banda de 130 kDa correspondiente a p130<sup>cas</sup> eluyó en las mismas fracciones que la banda fosforilada en tirosina de p130 y presentó un peso molecular aparente similar, sugiriendo que las dos bandas podrían representar la misma proteína. Además, la p130<sup>cas</sup> inmunoprecipitada a partir de estas fracciones se consideró fosforilada en restos de tirosilo.

Se generó una forma mutante de PTP-PEST (D199A) por mutagénesis de localización dirigida, y la enzima mutante se purificó después de la expresión usando baculovirus recombinante. Cuando se ensayó usando RCM-Lisozima fosforilada en tirosina como sustrato, la enzima mutante purificada presentó una actividad específica que era aproximadamente 10.000 veces menor que la de la enzima de tipo silvestre (Garton y Tonks, datos no publicados). Esta proteína purificada se unió a una matriz de afinidad que comprendía un anticuerpo monoclonal anti-PTP-PEST (AG25) acoplado covalentemente a perlas de Proteína A-Sepharose, y después se incubó con cada una de las fracciones de Mono Q. Después de 45 minutos de incubación, se recogieron por centrifugación las proteínas que se asociaban con la PTP-PEST mutante, las perlas se lavaron y se añadió tampón de muestra de SDS-PAGE. Después se analizaron las proteínas asociadas por inmunotransferencia usando el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina G104.

Se descubrió que la proteína PTP-PEST mutante se asociaba con una sola proteína que contenía fosfotirosina, cuyo peso molecular (130 kDa) y posición de elución de Mono Q (fracciones 11-14) coincidían con las de p130<sup>cas</sup>. La inmunotransferencia de las proteínas asociadas con PTP-PEST usando el anticuerpo p130<sup>cas</sup> demostró que la proteína

fosforilada en tirosina de 130 kDa atrapada por la PTP-PEST mutante efectivamente es p130<sup>cas</sup>. Estos datos confirman adicionalmente la hipótesis de que p130<sup>cas</sup> es un posible sustrato fisiológicamente relevante para PTP-PEST.

#### *Determinación de Características Estructurales de PTP-PEST Implicadas en la Interacción Específica con p130<sup>cas</sup> Fosforilada en Tirosina*

La interacción entre p130<sup>cas</sup> y PTP-PEST se investigó adicionalmente en experimentos de captura de sustrato usando diversas formas mutantes purificadas de PTP-PEST para precipitar proteínas a partir de lisados de células HeLa tratadas con pervanadato. Se incubaron varias matrices de afinidad con lisado de células HeLa tratadas con pervanadato y las proteínas asociadas con las perlas se analizaron por SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfotirosina o anti-p130<sup>cas</sup>.

Se descubrió que la fosfatasa de longitud completa de tipo silvestre no podía asociarse de manera estable con p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina, mientras que tanto la proteína mutante PTP-PEST (D199A) como un mutante que carecía del resto de cisteína del sitio activo (C231S) precipitaban específicamente p130<sup>cas</sup> a partir del lisado. La incapacidad de la fosfatasa de tipo silvestre de precipitar p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina supuestamente refleja la naturaleza transitoria de la interacción normal entre PTP-PEST y p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina, que probablemente concluirá en cuanto p130<sup>cas</sup> se desfosforile por PTP-PEST.

Como los 500 aminoácidos C-terminales de PTP-PEST contienen varias regiones ricas en prolina que se parecen a secuencias que se unen al dominio de homología src de tipo 3 (src homology-3) (SH3), parece plausible que la especificidad de la interacción entre PTP-PEST y p130<sup>cas</sup> dependa en alguna medida de la asociación de estos segmentos con el dominio SH3 de p130<sup>cas</sup>. Por lo tanto, la posible contribución del segmento C-terminal de PTP-PEST en la interacción específica observada de PTP-PEST con p130<sup>cas</sup> se abordó en experimentos de captura de sustrato adicionales usando proteínas de fusión de GST que contenían el dominio catalítico de PTP-PEST solo, tanto en la forma de tipo silvestre como en la forma mutante (D199A). Se descubrió que el dominio catalítico mutante de PTP-PEST fusionado a GST precipitaba la banda de fosfotirosina de p130<sup>cas</sup> específicamente, mientras que tanto la proteína de fusión de tipo silvestre como la GST sola no podían precipitar p130<sup>cas</sup>. Por lo tanto, la interacción específica entre PTP-PEST y p130<sup>cas</sup> observada en estos experimentos parece ser una propiedad intrínseca del dominio catalítico de PTP-PEST, emulando la preferencia observada del dominio catalítico de la PTP-PEST activa para la desfosforilación de p130<sup>cas</sup> *in vitro*.

#### *Especificidad de la Interacción entre PTP-PEST Mutante y p130<sup>cas</sup> Fosforilada en Tirosina*

En vista de la abundancia relativa de p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina en el lisado de células HeLa tratadas con pervanadato, se consideró la posibilidad de que la unión selectiva observada de proteínas mutantes inactivas PTP-PEST a p130<sup>cas</sup> estuviera dirigida por el sustrato (reflejando la abundancia de este sustrato potencial con respecto a las otras proteínas que contienen fosfotirosina presentes en el lisado) en lugar de dirigido por la enzima (reflejando una preferencia de sustrato genuina de PTP-PEST); esta posibilidad se trató de dos maneras. En primer lugar, se usaron formas mutantes inactivas del dominio catalítico de PTP1B para capturar posibles sustratos para esta enzima a partir de los lisados de células HeLa tratadas con pervanadato. De nuevo, se descubrió que la fosfatasa de tipo silvestre no podía interaccionar de forma estable con ninguna proteína que contenía fosfotirosina, mientras que las variantes mutantes del dominio fosfatasa de PTP1B (que comprendían mutaciones en Cys o Asp análogas a las descritas anteriormente para PTP-PEST) se asociaban con muchas proteínas fosforiladas en tirosina. Esto fue especialmente evidente para el mutante de ácido aspártico de PTP1B (D181A), que parecía precipitar esencialmente todas las proteínas que contenían fosfotirosina a partir del lisado con una eficacia similar. Estos datos subrayan la naturaleza específica de la interacción entre PTP-PEST y p130<sup>cas</sup>, que parece ser una propiedad peculiar para el dominio catalítico de PTP-PEST, en lugar de una característica compartida por todos los dominios catalíticos de PTP.

La especificidad de la interacción entre PTP-PEST y p130<sup>cas</sup> se abordó adicionalmente después del tratamiento con pervanadato de varias líneas celulares diferentes (Wi38, 293, COS, MCF10A, C2C12, MvLu), produciendo una serie diferente de proteínas fosforiladas en tirosina en cada caso; los lisados resultantes se analizaron por SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia anti-fosfotirosina. Se incubaron alícuotas con una matriz de afinidad con PTP-PEST (D199A) o una matriz de control, y las proteínas fosforiladas en tirosina que se asociaban con PTP-PEST se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfotirosina o anti-p130<sup>cas</sup> como se ha descrito anteriormente.

En cualquier caso, la proteína PTP-PEST mutante de D199A precipitaba una sola banda de fosfotirosina ancha con un peso molecular aparente comprendido entre 120 y 150 kDa en diferentes líneas celulares, mientras que la matriz de afinidad sola no precipitaba ninguna proteína que contuviera fosfotirosina. La inmunotransferencia de los precipitados con un anticuerpo p130<sup>cas</sup> reveló que la proteína precipitada a partir de todos los lisados celulares correspondía a p130<sup>cas</sup>; la variación observada de peso molecular entre las diferentes líneas celulares supuestamente refleja diferencias de especie en el peso molecular de p130<sup>cas</sup> o la expresión de diferentes formas unidas de forma alternativa (Sakai *et al.*, *EMBO J.* 13: 3748-3756 (1994)).

La abundancia relativa de p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina en los precipitados de PTP-PEST parecía estar relacionada de manera general con la abundancia de proteína p130<sup>cas</sup> en los lisados (datos no mostrados). Sorprendentemente, independientemente de la abundancia de p130<sup>cas</sup> fosforilada en los lisados, p130<sup>cas</sup> era invariablemente la única proteína

que contenía fosfotirosina en los precipitados, incluso en lisados de células 293 que contenían muy poca proteína p130<sup>cas</sup> pero que presentaban una amplia diversidad de otras proteínas fosforiladas en tirosina de manera abundante. De forma similar, cuando se incubaron lisados de células 293 tratadas con pervanadato (que contenían p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina en cantidades que son indetectables por inmunotransferencia anti-fosfotirosina del lisado) con PTP-PEST activa, no se produjo ninguna desfosforilación visible de ninguna banda de fosfotirosina (Garton y Tonks, datos no publicados). Estos resultados indican que la afinidad de PTP-PEST por p130<sup>cas</sup> es sustancialmente mayor que para cualquier otro sustrato presente, y subraya adicionalmente la extraordinaria selectividad de sustrato de PTP-PEST por p130<sup>cas</sup>.

#### 10 *Inhibición por Vanadato de la Asociación de p130<sup>cas</sup> Fosforilada en Tirosina con PTP-PEST Mutante*

Una observación consecuente de este trabajo fue que, a diferencia de la PTP-PEST mutante inactiva, la enzima de tipo silvestre no podía asociarse en un complejo estable con p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina, lo que sugería que la asociación observada está dirigida al sitio activo. Para investigar esta posibilidad, se incubó PTP-PEST mutante (D199A) con el inhibidor de PTP vanadato a diversas concentraciones antes de la adición del lisado de células HeLa tratadas con pervanadato. Después se analizó el grado de asociación de p130<sup>cas</sup> con PTP-PEST. Se incubó una matriz de afinidad de PTP-PEST, que comprendía PTP-PEST (D199A) de longitud completa unida a perlas de proteína A-Sepharose/anticuerpo (AG25) acopladas covalentemente, durante 10 minutos en hielo en presencia de concentraciones variables de ortovanadato sódico. Las muestras después se incubaron con alícuotas de lisado de células HeLa tratadas con pervanadato; las proteínas asociadas se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfotirosina o anti-p130<sup>cas</sup>. La actividad de PTP-PEST de tipo silvestre también se determinó en las mismas condiciones, usando RCM-lisozima marcada con <sup>32</sup>P fosforilada en tirosina como sustrato.

Se descubrió que la asociación se interrumpía de manera potente por vanadato, con una dependencia de la concentración similar a la de la inhibición por vanadato de la PTP-PEST de tipo silvestre, y observándose la interrupción completa a una concentración 10 mM de vanadato. Como la inhibición de PTP por vanadato supuestamente se debe a una interacción directa del vanadato con el resto de cisteína del sitio activo de la enzima (Denu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2493-2498 (1996)), este resultado confirma la hipótesis de que la asociación estable de la PTP-PEST mutante con p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina está mediada por interacciones directas entre restos del sitio activo dentro de PTP-PEST, en particular el resto de cisteína del sitio activo, y restos de fosfotirosina dentro de p130<sup>cas</sup>.

#### *Asociación de p130<sup>cas</sup> Endógena con PTP-PEST Mutante Transfectada en Células COS*

El trabajo descrito anteriormente sugiere claramente que p130<sup>cas</sup> representa un sustrato potencial fisiológicamente significativo para PTP-PEST. Para evaluar si PTP-PEST interacciona con p130<sup>cas</sup> en células intactas, se transfectaron células COS con plásmidos que codificaban el tipo silvestre o formas mutantes de PTP-PEST (D199A o C215S). Las células se trataron con pervanadato 30 minutos antes de la lisis, las proteínas PTP-PEST se inmunoprecipitaron y las proteínas fosforiladas en tirosina asociadas se analizaron por inmunotransferencia anti-fosfotirosina de los precipitados resultantes. Los lisados también se incubaron con perlas de proteína A-Sepharose/anti-PTP-PEST (AG25) acopladas covalentemente y las proteínas asociadas se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpo anti-fosfotirosina.

En estas condiciones, la banda que contenía fosfotirosina correspondiente a p130<sup>cas</sup> de nuevo era única en su capacidad de asociarse con la proteína PTP-PEST C231S, indicando que p130<sup>cas</sup> puede seleccionarse específicamente por PTP-PEST como sustrato en un contexto intracelular en presencia de un gran número de sustratos posibles alternativos. Ni la forma de tipo silvestre ni la forma D199A de PTP-PEST era capaz de presentar una interacción estable con p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina en células COS tratadas con pervanadato.

Lo más probable es que la unión de PTP-PEST de tipo silvestre y D199A a p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina en estas condiciones se prohíba por la presencia de pervanadato unido al resto de cisteína del sitio activo de PTP-PEST (Denu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2493-2498 (1996)), que excluye eficazmente la unión de restos de fosfotirosina de p130<sup>cas</sup>. La capacidad del mutante de PTP-PEST C231S de asociarse en un complejo estable con p130<sup>cas</sup> en presencia de pervanadato sugiere que esta proteína mutante apenas se vea afectada por el pervanadato, lo que indica que el modo normal de inhibición de PTP por iones vanadato depende de forma crítica de las interacciones directas entre el vanadato y el anión tiolato del resto de cisteína del sitio activo de PTP. Por lo tanto, estas observaciones confirman adicionalmente la existencia de una interacción exclusiva entre PTP-PEST y p130<sup>cas</sup> que parece estar totalmente dirigida al sitio activo, y por lo tanto refleja la preferencia de sustrato genuina, intrínseca y muy restringida de PTP-PEST por p130<sup>cas</sup>.

Los resultados descritos aquí implican a p130<sup>cas</sup> como un sustrato fisiológicamente relevante para PTP-PEST. Además, la rigurosidad observada y la exclusividad de la interacción entre PTP-PEST y p130<sup>cas</sup> en una amplia diversidad de líneas celulares sugiere que p130<sup>cas</sup> puede ser un sustrato de alta afinidad único para PTP-PEST, aunque en el momento actual no puede excluirse la posibilidad de que existan otros sustratos de PTP-PEST significativos. En particular, no está claro si las células tratadas con pervanadato presentan un espectro completo de todas las proteínas fosforiladas en tirosina posibles; de hecho, esto parece poco probable ya que el tratamiento con pervanadato supuestamente produce únicamente un aumento en la fosforilación en tirosina de proteínas que en alguna medida están fosforiladas constitutivamente, pero que normalmente se desfosforilan de forma rápida dentro de la célula. Por lo tanto, los posibles sustratos ausentes en células tratadas con pervanadato supuestamente incluyen sustratos de proteína tirosina quinasas

(PTK) que normalmente están presentes en un estado inactivo, tales como PTK de receptores estimulados por ligando, y la quinasa regulada por calcio descrita recientemente PYK2 (Lev *et al.*, *Nature* 376: 737-745 (1995)). Independientemente de estas consideraciones, la capacidad de PTP-PEST de seleccionar p130<sup>cas</sup> exclusivamente como sustrato a partir de lisados de varias líneas celulares diferentes, que contienen una combinación total de al menos cien sustratos potenciales diferentes (muchos de los cuales supuestamente contienen múltiples sitios de fosforilación), demuestra claramente que la especificidad de sustrato de PTP-PEST está muy restringida.

Muchas PTP intracelulares están limitadas en su disponibilidad de sustrato debido a la reclusión estricta dentro de una localización subcelular particular; los ejemplos incluyen PTP1B, que está localizada en la cara citoplásmica del retículo endoplásmico (Frangioni *et al.*, *Cell* 68: 545-560 (1992)) y TCPTP que es nuclear (Tillmann *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 14: 3030-3040 (1994)) o está localizada en el retículo endoplásmico, dependiendo de la forma de empalme alternativa que se exprese (Lorenzen *et al.*, *J. Cell. Biol.* 131: 631-643 (1995)). Como alternativa, ciertas PTP parecen estar muy reguladas, requiriendo la activación antes de poder demostrar una actividad apreciable. Por ejemplo, las PTP que contienen el dominio SH2, SHP1 y SHP2, presentan una actividad relativamente baja *in vitro*, pero pueden activarse considerablemente por varios mecanismos incluyendo el truncamiento C-terminal (Zhao *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 2816-2820 (1993)), la adición de ciertos fosfolípidos (Zhao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4251-4255 (1993)), o la unión mediada por el dominio SH2 de péptidos que contienen fosfotirosina apropiados (Lechleider *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 21478-21481 (1993)).

Sin embargo, PTP-PEST presenta una alta actividad específica *in vitro* (35.000 U/mg), y es una PTP predominantemente (90-95%) soluble dentro de las células (Garton y Tonks, datos no publicados); por lo tanto, en principio puede actuar de forma potente sobre cualquier sustrato accesible al citoplasma. Esta accesibilidad puede sustentar parcialmente la necesidad de que PTP-PEST posea una especificidad de sustrato limitada intrínsecamente. La demostración de que la PTP-PEST mutante puede asociarse exclusivamente con p130<sup>cas</sup> en un contexto intracelular en presencia de muchas otras proteínas fosforiladas en tirosina, es una indicación de que la estrecha especificidad de sustrato de la enzima puede dar como resultado una PTP-PEST que tenga una influencia insignificante sobre el estado de fosforilación de la mayoría de las proteínas fosforiladas en tirosina dentro de la célula, aunque esos sustratos sean muy accesibles para la PTP-PEST.

El papel de p130<sup>cas</sup> en la transformación celular por los oncogenes v-crk y v-src no está clara, aunque hay una correlación general entre el nivel de fosforilación en tirosina de p130<sup>cas</sup> y el grado de transformación en células que expresan diferentes formas de crk o src (Kanner *et al.*, *EMBO J.* 10: 1689-1698 (1991); Mayer y Hanafusa, *J. Virol.* 64: 3581-3589 (1990)). Además, también se ha observado una fosforilación en tirosina potenciada de p130<sup>cas</sup> en células transformadas por c-Ha-ras y por la sobreexpresión de ornitina descarboxilasa (Auvinen *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 15: 6513-6525 (1995)). La expresión de ADNc antisentido que codifica p130<sup>cas</sup> en estas células produce una reversión parcial del fenotipo transformado. Estas observaciones sugieren que la fosforilación en tirosina aberrante de p130<sup>cas</sup> es una característica común de células transformadas por varios mecanismos dispares y que p130<sup>cas</sup> puede requerirse para la manifestación completa del estado transformado. Por lo tanto, la desfosforilación de p130<sup>cas</sup> por PTP-PEST es un mecanismo regulador potencialmente importante para contrarrestar los efectos de transformación de diversos oncogenes.

Se ha observado la fosforilación en tirosina de p130<sup>cas</sup> en fibroblastos después de la adhesión celular mediada por integrina a proteínas de la matriz extracelular (Nojima *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 15398-15402 (1995); Petch *et al.*, *J. Cell Science* 108: 1371-1379 (1995); Vuorl y Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* 270: 22259-22262 (1995)). En estas condiciones, usando un anticuerpo (4F4) que reconoce predominantemente p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina (Kanner *et al.*, *EMBO J.* 10: 1689-1698 (1991), Petch *et al.*, *J. Cell Science* 108: 1371-1379 (1995)), se demostró que p130<sup>cas</sup> fosforilada está localizada en adhesiones focales (Petch *et al.*, *J. Cell. Science* 108: 1371-1379 (1995)), mientras que los estudios de fraccionamiento han demostrado que la localización celular normal de la mayor parte de p130<sup>cas</sup> no fosforilada es el citosol (Sakai *et al.*, *EMBO J.* 13: 3748-3756 (1994)). Además, en fibroblastos transformados con crk, sólo se detecta p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina en fracciones insolubles (Sakai *et al.*, *EMBO J.* 13: 3748-3756 (1994)), lo que sugiere que tanto la fosforilación mediada por la adhesión celular como la fosforilación mediada por transformación de p130<sup>cas</sup> están asociados con la redistribución de la proteína desde el citosol a las adhesiones focales.

Es plausible que la redistribución de p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina pueda dirigirse por su asociación con FAK, que está asociada constitutivamente con adhesiones focales debido a su dominio de dirección a adhesiones focales C-terminal (Hildebrand *et al.*, *J. Cell Biol.* 123: 993-1005 (1993); Schaller *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5192-5196 (1992)). El secuestro de p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina en adhesiones focales tanto en las células transformadas como después de la adhesión celular mediada por integrina, sugiere claramente un papel para p130<sup>cas</sup> en sucesos de señalización en esta región de la célula. Probablemente, una consecuencia de la redistribución de p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina es que, además de la localización de p130<sup>cas</sup> en una región de la célula que contiene abundante actividad proteína tirosina quinasa, la proteína fosforilada será relativamente inaccesible a la fosfatasa citosólica PTP-PEST. Esto plantea la posibilidad de que el papel de PTP-PEST en la desfosforilación de p130<sup>cas</sup> sea prevenir la fosforilación en tirosina inapropiada de las reservas citosólicas de p130<sup>cas</sup>, previniendo de esta manera la formación de complejos de señalización ensamblados alrededor de p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina en localizaciones celulares inapropiadas.

Varios factores mitogénicos estimulan de manera potente la fosforilación en tirosina de p130<sup>cas</sup>. Éstos incluyen agentes que actúan a través de receptores acoplados a proteína G heterotriméricos tales como ácido lisofosfatídico (Seufferlein y Rozengurt, *J. Biol. Chem.* **269**: 9345-9351 (1994)), bradicinina (Leeb-Lundberg *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 24328-24344 (1994)) y bombesina (Zachary *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**: 19031-19034 (1992)), así como factores de crecimiento que activan tirosina quinasas de receptores, particularmente PDGF (Rankin y Rozengurt, *J. Biol. Chem.* **269**: 704-710 (1994)), EGF y NGF (Ribon y Saltiel, *J. Biol. Chem.* **271**: 7375-7380 (1996)). Estas observaciones sugieren papeles para p130<sup>cas</sup> en la regulación de rutas de señalización mitogénicas, que supuestamente implican el ensamblaje de complejos de señalización basados en p130<sup>cas</sup> fosforilada en tirosina. Las identidades de las proteínas implicadas en estos complejos no se han establecido, pero probablemente incluyen proteínas adaptadoras que contienen el dominio SH2 tales como crk (Ribon y Saltiel, *J. Biol. Chem.* **271**: 7375-7380 (1996)), y sus proteínas asociadas (Feller *et al.*, *Oncogene* **10**: 1465-1473 (1995); Hasegawa *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1770-1776 (1996); Knudsen *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 32781-32787 (1994); Matsuda *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5495-5500 (1994); Tanaka *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3443-3447 (1994)). Por lo tanto, la fosforilación y desfosforilación en tirosina de p130<sup>cas</sup> puede jugar un papel importante en la regulación de la formación de estos complejos, influyendo de esta manera en sucesos posteriores en la señalización mitogénica.

# REIVINDICACIONES

1. Una proteína tirosina fosfatasa mutante donde el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un aminoácido que:

a) atenúa la actividad catalítica de la fosfatasa y reduce el valor de Kcat a menos de 1 por minuto; y

b) se selecciona entre el grupo consistente en: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, glutamina, lisina, arginina e histidina,

donde la fosfatasa mutante retiene la capacidad de unirse a un sustrato fosforilado en tirosina, y donde el resto de aspartato constante a reemplazar se identifica por (i) alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de fosfatasa de dicha fosfatasa con la secuencia de aminoácidos de al menos un dominio catalítico de proteína tirosina fosfatasa en las Figuras 1A a 1E, y (ii) localización del resto de aspartato constante de la fosfatasa en una posición correspondiente a la posición del resto de aspartato constante en al menos un dominio catalítico de proteína tirosina fosfatasa en las Figuras 1A a 1E.

2. Una proteína tirosina fosfatasa mutante de acuerdo con la reivindicación 1, que:

(I) se selecciona entre: PTP1B, donde el resto de aspartato constante está localizado en la posición 181; PTP-PEST, donde el resto de aspartato constante está localizado en la posición 199; PTP $\gamma$ ; MKP-1; DEP-1; PTP $\mu$ ; PTPX1; PTPX10; y PTPH1; o

(II) una fosfatasa PTP-PEST, donde el resto de aspartato constante está localizado en la posición 199, y donde el aminoácido en la posición 231 se ha reemplazado por un resto de serina.

3. La proteína tirosina fosfatasa mutante de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde el resto de aspartato constante se ha reemplazado por un resto de alanina.

4. Un método para identificar una proteína fosforilada en tirosina que es un sustrato de una proteína tirosina fosfatasa, que comprende las etapas de:

a) combinar al menos una proteína fosforilada en tirosina con al menos una proteína tirosina fosfatasa mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre la proteína fosforilada en tirosina y la proteína tirosina fosfatasa mutante, produciendo de esta manera una combinación;

b) determinar la presencia o ausencia de un complejo en la combinación, donde la presencia de un complejo en la combinación indica que la proteína fosforilada en tirosina es un sustrato de la proteína tirosina fosfatasa.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde la proteína fosforilada en tirosina se selecciona entre: p130<sup>cas</sup>, el receptor de EGF, p210 bcr:abl, MAP quinasa y el receptor de la insulina.

6. Un kit para identificar un sustrato de proteína fosforilada en tirosina de una proteína tirosina fosfatasa, que comprende:

a) al menos una proteína tirosina fosfatasa mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

b) reactivos auxiliares adecuados para uso en la detección de la presencia o ausencia de un complejo entre la proteína tirosina fosfatasa mutante y una proteína fosforilada en tirosina.

7. Un método para identificar un agente que altera la interacción entre una proteína tirosina fosfatasa y una proteína fosforilada en tirosina, que comprende las etapas de:

a) identificar de acuerdo con el método de la reivindicación 4 ó 5, una proteína fosforilada en tirosina que es un sustrato de una proteína tirosina fosfatasa;

b) combinar la proteína fosforilada en tirosina y la proteína tirosina fosfatasa de tipo silvestre y un agente a ensayar en condiciones adecuadas para la interacción entre la proteína fosforilada en tirosina y la proteína tirosina fosfatasa de tipo silvestre, formando de esta manera una combinación;

c) determinar la cantidad de actividad enzimática en la combinación; y

d) comparar la cantidad de actividad enzimática determinada en (c) con la cantidad de actividad enzimática en ausencia del agente a ensayar, en condiciones adecuadas para la interacción entre la proteína fosforilada en tirosina y la proteína tirosina fosfatasa de tipo silvestre,



## ES 2 281 915 T3

donde una diferencia en la actividad enzimática indica que el agente altera la interacción entre la proteína tirosina fosfatasa de tipo silvestre y la proteína fosforilada en tirosina.

5 8. Un método para identificar un agente que altera la interacción entre una proteína tirosina fosfatasa y una proteína fosforilada en tirosina que es un sustrato de la proteína tirosina fosfatasa, que comprende las etapas de:

a) identificar de acuerdo con el método de la reivindicación 4 ó 5, una proteína fosforilada en tirosina que es un sustrato de una proteína tirosina fosfatasa;

10 b) combinar la proteína fosforilada en tirosina, una proteína tirosina fosfatasa mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un agente a ensayar en condiciones adecuadas para la interacción entre la proteína fosforilada en tirosina y la proteína tirosina fosfatasa mutante, formando de esta manera una combinación;

15 c) determinar el grado de unión entre la proteína fosforilada en tirosina y la proteína tirosina fosfatasa mutante en la combinación; y

d) comparar el grado de unión determinado en (c) con el grado de unión en ausencia del agente a ensayar, en condiciones adecuadas para la interacción entre la proteína fosforilada en tirosina y la proteína tirosina fosfatasa mutante,

20 donde una diferencia en el grado de unión indica que el agente altera la interacción entre la proteína tirosina fosfatasa y la proteína fosforilada en tirosina

25 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, donde si la cantidad de actividad enzimática o el grado de unión, respectivamente, es:

a) mayor en presencia del agente a ensayar que en ausencia del agente, el agente potencia la interacción entre la proteína tirosina fosfatasa y la proteína fosforilada en tirosina; o

30 b) menor en presencia del agente a ensayar que en ausencia del agente, el agente inhibe la interacción entre la proteína tirosina fosfatasa y la proteína fosforilada en tirosina.

35 10. Una proteína tirosina fosfatasa mutante como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en terapia, profilaxis o diagnóstico.

11. Una proteína tirosina fosfatasa mutante de acuerdo con la reivindicación 10, para uso en uno cualquiera de los siguientes objetivos:

40 a) reducir la actividad de una proteína fosforilada en tirosina que es un sustrato de la proteína tirosina fosfatasa; y/o

45 b) un método para reducir la actividad de una proteína fosforilada en tirosina que es un sustrato de la proteína tirosina fosfatasa, que comprende administrar a un mamífero una proteína tirosina fosfatasa mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, con lo que la formación de un complejo entre la proteína fosforilada en tirosina y la proteína tirosina fosfatasa mutante reduce la actividad de la proteína fosforilada en tirosina; y/o

c) reducir los efectos de transformación de oncogenes asociados con la fosforilación de p130<sup>cas</sup>; y/o

50 d) un método para reducir los efectos de transformación de oncogenes asociados con la fosforilación de p130<sup>cas</sup> que comprende administrar a un mamífero una proteína tirosina fosfatasa (PTP) que es PTP-PEST o PTP-PEST mutante de acuerdo con la reivindicación 2, con lo que la PTP se une y/o desfosforila p130<sup>cas</sup>, reduciendo los efectos de transformación de oncogenes asociados con la fosforilación de p130<sup>cas</sup>; y/o

55 e) el tratamiento, terapia, diagnóstico o profilaxis de cánceres, incluyendo cánceres asociados con la fosforilación de p130<sup>cas</sup>; y/o

f) la reducción de la formación de complejos de señalización asociados con p130<sup>cas</sup>; y/o

60 g) un método para reducir la formación de complejos de señalización asociados con p130<sup>cas</sup> que comprende administrar a un mamífero una proteína tirosina fosfatasa (PTP) que es PTP-PEST o PTP-PEST mutante de acuerdo con la reivindicación 2, con lo que la PTP se une y/o desfosforila p130<sup>cas</sup>, reduciendo la formación de complejos de señalización asociados con p130<sup>cas</sup> y/o

65 h) la prevención de la inducción de rutas mitogénicas; y/o

i) la reducción de los efectos citotóxicos asociados con la administración o una sobreexpresión de proteína tirosina fosfatasa; y/o

j) un método para reducir los efectos citotóxicos asociados con la administración o una sobreexpresión de proteína tirosina fosfatasa que comprende administrar a un mamífero una proteína tirosina fosfatasa mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en lugar de una proteína tirosina fosfatasa de tipo silvestre correspondiente.

5 12. Uso de una proteína tirosina fosfatasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, profilaxis o diagnóstico.

13. El uso de la reivindicación 12 para el tratamiento de un cáncer, donde el tratamiento:

10 (a) comprende administrar a un mamífero una proteína tirosina fosfatasa mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, con lo que la formación de un complejo entre la proteína tirosina fosfatasa mutante y una proteína fosforilada en tirosina que es un sustrato de la proteína tirosina fosfatasa reduce la actividad de la proteína fosforilada en tirosina; o

15 (b) reduce los efectos de transformación de oncogenes asociados con la fosforilación de p130<sup>cas</sup>, que comprende administrar a un mamífero una proteína tirosina fosfatasa (PTP) que es PTP-PEST o PTP-PEST mutante de acuerdo con la reivindicación 2, con lo que la PTP se une y/o desfosforila p130<sup>cas</sup>, regulando de esta manera negativamente los efectos corriente abajo de p130<sup>cas</sup> y reduciendo los efectos de transformación de oncogenes asociados con la fosforilación de p130<sup>cas</sup>; o

20 (c) reduce la formación de complejos de señalización asociados con p130<sup>cas</sup>, que comprende administrar a un mamífero una proteína tirosina fosfatasa (PTP) que es PTP-PEST o PTP-PEST mutante de acuerdo con la reivindicación 2, con lo que la PTP se une y/o desfosforila p130<sup>cas</sup>, regulando de esta manera negativamente los efectos corriente abajo de p130<sup>cas</sup> y reduciendo la formación de complejos de señalización asociados con p130<sup>cas</sup>; o

25 (d) reduce los efectos citotóxicos asociados con la administración o sobreexpresión de proteína tirosina fosfatasa, que comprende administrar a un mamífero una proteína tirosina fosfatasa mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en lugar de una proteína tirosina fosfatasa de tipo silvestre correspondiente.

30 14. El uso de la reivindicación 13(a) donde la proteína fosforilada en tirosina se selecciona entre el grupo consistente en: p130<sup>cas</sup>, el receptor de EGF, p210 bcr:abl; MAP quinasa, y el receptor de la insulina, y/o la proteína tirosina fosfatasa se selecciona entre el grupo consistente en: PTP1B, PTP-PEST, PTP $\gamma$ , MKP-1, DEP-1, PTP $\mu$ , PTPX1, PTPX10 y PTPH1.

35 15. El uso de la reivindicación 13(b), donde el oncogén se selecciona entre el grupo consistente en: v-crk, v-src y c-Ha-ras.

16. El uso de la reivindicación 13(c), donde el tratamiento previene la inducción de rutas mitogénicas.

40 17. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 13 a 16, donde el mamífero es un ser humano.

45

50

55

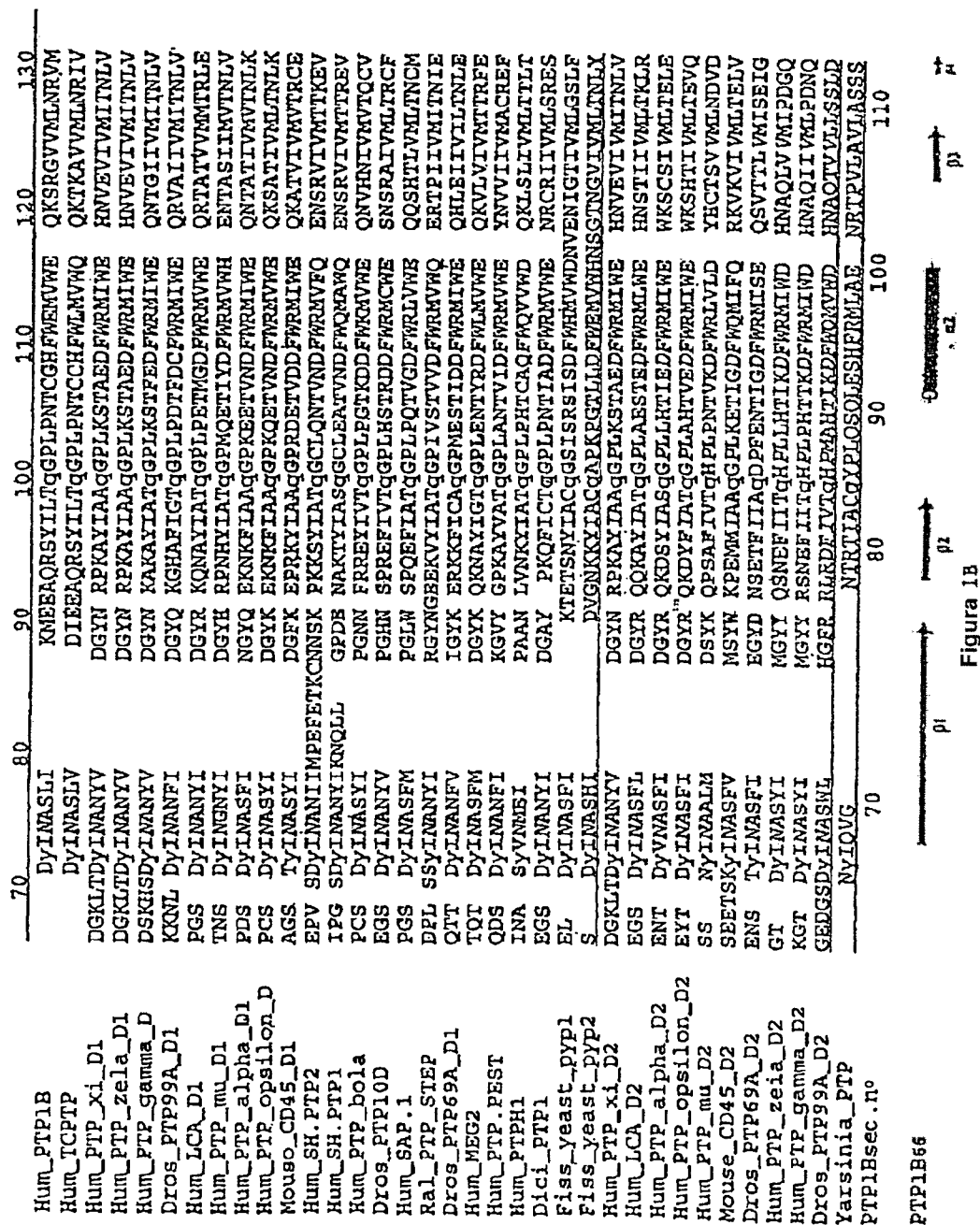
60

65

	1	10	20	30	40	50	60
Hum_PTP1B	DFPCRVAKL	PNKQ	RMYRDSVP	DHSRIKLHQE			DN
Hum_TCPTP	DYFHRVAKF	PNRN	RMYRDSVP	DHSRV LQNA			EN
Hum_PTP_xi_D1	GITADSSNH	PDNKH	KRYINIVAY	DHSRVKLAQL			AEK
Hum_PTP_zeta_D1	GITADSSNH	PDNKH	KRYINIVAY	DHSRVKLAQL			AEK
Hum_PTP_gamma_D	NITAEHSNH	PNKH	KRYINILAY	DHSRVKLRPL			PGK
Dros_PTP99A_D1	DLPCEHSQH	PNKR	KRYINITAY	DHSRVHLHPT			PGQ
Hum_LCA_D1	QFTWNSNLE	VNKP	KRYANV IAY	DHSRVILTSI			DGV
Hum_PTP_mu_D1	SAPWDSAK	XDENRM	KRYGNI IAY	DHSRVRLQTI			EGD
Hum_PTP_alpha_D1	QATCEARS	KEENKE	KRYVNI LPY	DHSRVHLTPV			EGV
Hum_PTP_opailon_b	QGTFFELAN	KEENRB	KRYPNILP	DHSRVILSOL			DGI
Mouso_CD45_D1	KFP I KDAR	KPHNQ	KRYVDILP	DYDNRVLSI			NGD
Hum_SH_PTP2	LYSRKEGQ	RQENKN	KRYKNILP	FDHTRVVLDHG			DPN
Hum_SH_PTP1	LHQRLEGQ	RPNKG	KRYKNILP	FDHSRVILQGR			DSN
Hum_PTP_bola	NQSCDIAL	LPENRG	KRYNNILP	DATRVKLSNV			DDD
Dros_PTP10D	DQPCTFAD	PCNRP	KRYTNILP	DHSRVKLPQV			DDD
Hum_SAP.1	SQSQMVAS	SENNA	KRYNVLPY	DWSRVPLKPI			HEE
Ral_PTP_STEP	FVDPKEYD	IPGLVR	KRYKTILP	NPDSRVRLTSP			DPE
Dros_PTP69A_D1	DRITKNSD	LKENAC	KRYPDIKAY	DQTRVKLAVI			NGL
Hum_MEG2	VGTFHCSM	SEGNLS	KRYGEVPC	LDQTRVKLTKR			SGH
Hum_PTPH1	IYPTATGE	KEENVK	KRYKDLIP	FDHSRVKZTLK			TPS
Hum_PTP1	GLAITFAK	LPQNL	KRYKQVLP	YDTTRVLLQGN			EDY
F1asg_yeast_pyp1	PSETSEGD	KKHNTS	KRYTNILP	VNHTRVQLCKI			QDK
F1asg_yeast_pyp2	QWSTVDSL	SNTSYK	KRYTDIVP	YNCTRVLLKRT			SPS
Hum_PTP_xi_D2	WCCLASSR	STISIR	KRYTDAVP	YDKTRVLAVP			KGC
Hum_LCA_D2	GITADSSNH	PDNKH	KRYINIVAY	DHSRVKLAQL			AEK
Hum_PTP_alpha_D2	TSRFISAN	LPCKF	KRYVNI LPY	ELTRVCLQPI			RGV
Hum_PTP_opsilon_D2	NDKMRITG	NLPANMK	KRYVLIPI	YEFNRTVLPVK			RGE
Hum_PTP_mu_D2	KENMRTON	DPANMK	KRYVLIPI	YDFNRTVLSMK			RGQ
Hum_CD45_D2	VEDCSIAL	LPNHE	KRYCMLPP	DRCLPFLITI			DGE
Dros_PTP69A_D2	WRTQHIGN	QENKK	KRYNSVVPY	DFNRPVPLKHELEMSKESEPESESSDDSD			PMR
Hum_PTP_zeta_D2	SKSCSVGE	NEENNM	KRYSELTPY	DRNRVLLTPL			SGE
Hum_PTP_gamma_D2	QSDYSAAK	QCNRZ	KRYTSLIP	VERSRLGLSSL			PGM
Hum_PTP99A_D2	VECFSAQK	ECNKE	KRYNSVVP	SERARVGLAPL			PGM
Yarbina_PTP	ETNLMAEQ	VEELKNC	TPYLEOQKX	ITIOFORKDJIHISAMKQVNSIKURCAIFPIEGSRVHLTPKP			
PTP1Bsec.n°	TNDPRYLQ	ACGGEKI	LNRFEDIO	CCROTAVRAD			
	30	40	50	60			

PTP1B66  
  
 ci

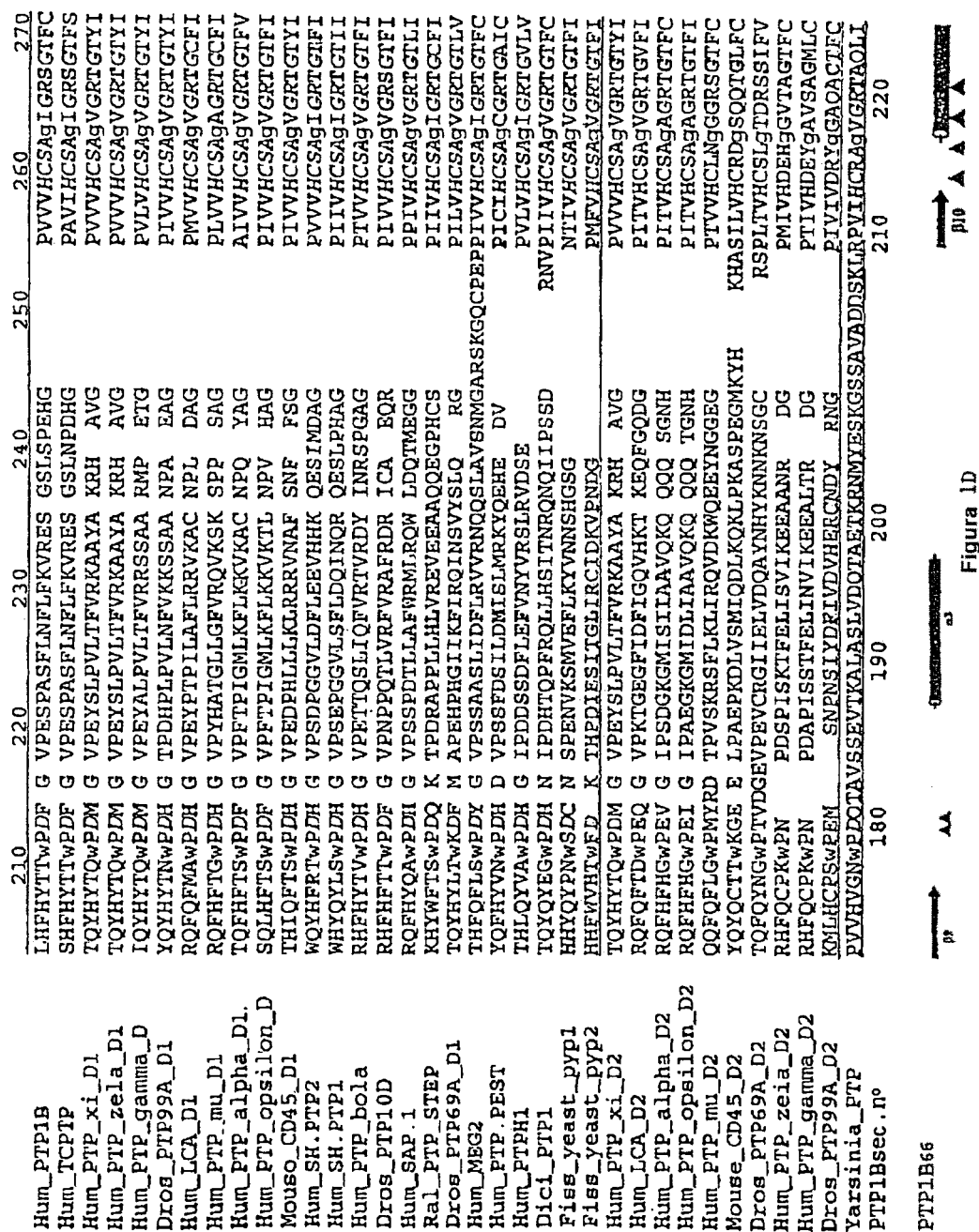
AAAA Figura 1A



Hum_PTP1B	140	150	160	170	180	190	200
Hum_TCPTP	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_xi_D1	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_zeta_D1	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_gamma_D	140	150	160	170	180	190	200
Dros_PTP99A_D1	140	150	160	170	180	190	200
Hum_LCA_D1	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_mu_D1	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_alpha_D1	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_omega_D1	140	150	160	170	180	190	200
Mouso_CD45_D1	140	150	160	170	180	190	200
Hum_SH_PTP1	140	150	160	170	180	190	200
Hum_SH_PTP2	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_bola	140	150	160	170	180	190	200
Dros_PTP10D	140	150	160	170	180	190	200
Hum_SAP.1	140	150	160	170	180	190	200
Pal_PTP_STEP	140	150	160	170	180	190	200
Dros_PTP69A_D1	140	150	160	170	180	190	200
Hum_MEG2	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP.PEST	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTPH1	140	150	160	170	180	190	200
Dici_PTP1	140	150	160	170	180	190	200
Fiss_yeast_pyp1	140	150	160	170	180	190	200
Fiss_yeast_pyp2	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_xi_D2	140	150	160	170	180	190	200
Hum_LCA_D2	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_alpha_D2	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_omega_D2	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_mu_D2	140	150	160	170	180	190	200
Mouse_CD45_D2	140	150	160	170	180	190	200
Dros_PTP69A_D2	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_zeta_D2	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP_gamma_D2	140	150	160	170	180	190	200
Dros_PTP99A_D2	140	150	160	170	180	190	200
Yarsinia_PTP	140	150	160	170	180	190	200
PTP1Bsec.n°	140	150	160	170	180	190	200



Figura 1C



	280	290	300	310	320	330	340
Hum_PTP1B	LAUTCLLIMDKR	KDSSVDI	KKVLLMRKFRMG	LIQTADQLRFSYLAVIEGAKFIMGD			
Hum_TCPTP	LVDYCLVLMKGG	DD	INI	KGVLNMRKYRMG	LIQTPDQLRFSYMAIIIEGAKCIKGDSS		
Hum_PTP_xi_D1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_zeta_D1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_gamma_D	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Dros_PTP99A_D1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_LCA_D1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_mu_D1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_alpha_D1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_onsilon_D	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Mouso_CD45_D1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_SH.PTP2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_SH.PTP1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_bola	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Dros_PTP10D	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_SAP.1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Ral_PTP_STEP	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Dros_PTP69A_D1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_MEG2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP.PEST	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTPH1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Dici_PTP1	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Fiss_yeast_pypl	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Fiss_yeast_pyp2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_xi_D2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_LCA_D2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_alpha_D2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_onsilon_D2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_mu_D2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Mouse_CD45_D2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Dros_PTP69A_D2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_zeta_D2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Hum_PTP_gamma_D2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Dros_PTP99A_D2	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
Yarsinia_ptp	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		
PTP1Bsec.n°	VLDNMLQIQIHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRY	LVQTEEQYVFIIHDTLVEAILSKETEY		

PTP1B66

Figura 1E a5

**Vmax y Km de Mutantes de PTP1B de 37 kDa Hacia RCML**

Enzima	Vmax (nmol/min/mg)	Km (nM)	Kcat (min <sup>-1</sup> )
tipo silvestre	60200	102	2244
Tyr 46 → S	4120	1700	154
→ L	4160	1700	155
Glu 115 → A	5700	45	212
→ D	5900	20	220
Lys 116 → A	68600	150	2557
Lys 120 → A	19000	80	708
Asp 181 → A	0,61	≤126	0,023
→ E	97	10	3,6
His 214 → A	700	20	26
Cys 215 → S	0,026		0,00097
Arg 221 → K	11	80	0,41
→ M	3,3	1060	0,12
Gln 262 → A	720	9	27

Figura 2



LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Harbor, Cold Spring
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Proteína Tirosina Fosfatasas de captura de sustrato
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 36
- 10 (iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: HAMILTON, BROOK, SMITH & REYNOLDS, P.C.
- (B) CALLE: Two Militia Drive
- 15 (C) CIUDAD: Lexington
- (D) ESTADO: MA
- (E) PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 02173
- (v) FORMA DE LECTURA POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 30 (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: PCT/US97/13016
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 24-JULIO-1997
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Warren, Lisa
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 41,368
- 40 (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: CSHL96-03 PCT
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: (781) 861-6240
- 45 (B) TELEFAX: (781) 861-9540

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ. ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 196 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

60

65

## ES 2 281 915 T3

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

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 194 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - 55 (C) CLASE DE CADENA: sencilla
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

65

## ES 2 281 915 T3

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

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 261 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

## ES 2 281 915 T3

	Gly Ile Thr Ala Asp Ser Ser Asn His Pro Asp Asn Lys His Lys Asn	1 5 10 15
5	Arg Tyr Ile Asn Ile Val Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Lys Leu Ala	20 25 30
	Gln Leu Ala Glu Lys Asp Gly Lys Leu Thr Asp Tyr Ile Asn Ala Asn	35 40 45
10	Tyr Val Asp Gly Tyr Asn Arg Pro Lys Ala Tyr Ile Ala Ala Gln Gly	50 55 60
	Pro Leu Lys Ser Thr Ala Glu Asp Phe Trp Arg Met Ile Trp Glu His	65 70 75 80
15	Asn Val Glu Val Ile Val Met Ile Thr Asn Leu Val Glu Lys Gly Arg	85 90 95
	Arg Lys Cys Asp Gln Tyr Trp Pro Pro Ala Asp Gly Ser Glu Glu Tyr	100 105 110
20	Gly Asn Phe Leu Val Thr Gln Lys Ser Val Gln Val Leu Ala Tyr Tyr	115 120 125
25	Thr Val Phe Thr Leu Arg Asn Thr Lys Ile Lys Lys Gly Ser Gln Lys	130 135 140
	Gly Arg Pro Ser Gly Arg Val Val Thr Gln Tyr His Tyr Thr Gln Trp	145 150 155 160
30	Pro Asp Met Gly Val Pro Glu Tyr Ser Leu Pro Val Leu Thr Phe Val	165 170 175
35	Arg Lys Ala Ala Tyr Ala Lys Arg His Ala Val Gly Pro Val Val Val	180 185 190
	His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Tyr Ile Val Leu Asp	195 200 205
40	Ser Met Leu Gln Gln Ile Gln His Glu Gly Thr Val Asn Ile Phe Gly	210 215 220
45	Phe Leu Lys His Ile Arg Ser Gln Arg Asn Tyr Leu Val Gln Thr Glu	225 230 235 240
	Glu Gln Tyr Val Phe Ile His Asp Thr Leu Val Glu Ala Ile Leu Ser	245 250 255
50	Lys Glu Thr Glu Val	260

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

- 55
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido
- 60
- 65
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

## ES 2 281 915 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 263 aminoácidos

# ES 2 281 915 T3

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

10	Asn Ile Thr Ala Glu His Ser Asn His Pro Glu Asn Lys His Lys Asn	1	5	10	15
15	Arg Tyr Ile Asn Ile Leu Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Lys Leu Arg	20	25	30	
20	Pro Leu Pro Gly Lys Asp Ser Lys His Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn	35	40	45	
25	Tyr Val Asp Gly Tyr Asn Lys Ala Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly	50	55	60	
30	Pro Leu Lys Ser Thr Phe Glu Asp Phe Trp Arg Met Ile Trp Glu Gln	65	70	75	80
35	Asn Thr Gly Ile Ile Val Met Ile Thr Asn Leu Val Glu Lys Gly Arg	85	90	95	
40	Arg Lys Cys Asp Gln Tyr Trp Pro Thr Glu Asn Ser Glu Glu Tyr Gly	100	105	110	
45	Asn Ile Ile Val Thr Leu Lys Ser Thr Lys Ile His Ala Cys Tyr Thr	115	120	125	
50	Val Phe Ser Ile Arg Asn Thr Lys Val Lys Lys Gly Gln Lys Gly Asn	130	135	140	
55	Pro Lys Gly Arg Gln Asn Glu Arg Val Val Ile Gln Tyr His Tyr Thr	145	150	155	160
60	Gln Trp Pro Asp Met Gly Val Pro Glu Tyr Ala Leu Pro Val Leu Thr	165	170	175	
65	Phe Val Arg Arg Ser Ser Ala Ala Arg Met Pro Glu Thr Gly Pro Val	180	185	190	
	Leu Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Tyr Ile Val	195	200	205	
	Ile Asp Ser Met Leu Gln Gln Ile Lys Asp Lys Ser Thr Val Asn Val	210	215	220	
	Leu Gly Phe Leu Lys His Ile Arg Thr Gln Arg Asn Tyr Leu Val Gln	225	230	235	240
	Thr Glu Glu Gln Tyr Ile Phe Ile His Asp Ala Leu Leu Glu Ala Ile	245	250	255	
	Leu Gly Lys Glu Thr Glu Val	260			

## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 257 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

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

# ES 2 281 915 T3

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 250 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

```

15      Gln Phe Thr Trp Glu Asn Ser Asn Leu Glu Val Asn Lys Pro Lys Asn
      1              5              10              15

20      Arg Tyr Ala Asn Val Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Ile Leu Thr
              20              25              30

      Ser Ile Asp Gly Val Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile
              35              40              45

25      Asp Gly Tyr Arg Lys Gln Asn Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu
      50              55              60

30      Pro Glu Thr Met Gly Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Gln Arg Thr
      65              70              75              80

      Ala Thr Val Val Met Met Thr Arg Leu Glu Glu Lys Ser Arg Val Lys
              85              90              95

35      Cys Asp Gln Tyr Trp Pro Ala Arg Gly Thr Glu Thr Cys Gly Leu Ile
              100              105              110

40      Gln Val Thr Leu Leu Asp Thr Val Glu Leu Ala Thr Tyr Thr Val Phe
              115              120              125

      Ala Leu His Lys Ser Gly Ser Ser Glu Lys Arg Glu Leu Arg Gln Phe
      130              135              140

45      Gln Phe Met Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Tyr Pro Thr Pro
      145              150              155              160

50      Ile Leu Ala Phe Leu Arg Arg Val Lys Ala Cys Asn Pro Leu Asp Ala
              165              170              175

      Gly Pro Met Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Cys
              180              185              190

55      Phe Ile Val Ile Asp Ala Met Leu Glu Arg Met Lys His Glu Lys Thr
              195              200              205

      Val Asp Ile Tyr Gly His Val Thr Cys Met Arg Ser Gln Arg Asn Tyr
      210              215              220

      Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Ile His Glu Ala Leu Leu
      225              230              235              240

65      Glu Ala Ala Thr Cys Gly His Thr Glu Val
              245              250

```



## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 249 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

```

Ser Ala Pro Trp Asp Ser Ala Lys Lys Asp Glu Asn Arg Met Lys Asn
1          5          10          15

Arg Tyr Gly Asn Ile Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Arg Leu Gln
          20          25          30

Thr Ile Glu Gly Asp Thr Asn Ser Asp Tyr Ile Asn Gly Asn Tyr Ile
          35          40          45

Asp Gly Tyr His Arg Pro Asn His Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Met
          50          55          60

Gln Glu Thr Ile Tyr Asp Phe Trp Arg Met Val Trp His Glu Asn Thr
65          70          75          80

Ala Ser Ile Ile Met Val Thr Asn Leu Val Glu Val Gly Arg Val Lys
          85          90          95

Cys Cys Lys Tyr Trp Pro Asp Asp Thr Glu Ile Tyr Lys Asp Ile Lys
          100          105          110

Val Thr Leu Ile Glu Thr Glu Leu Leu Ala Glu Tyr Val Ile Phe Ala
          115          120          125

Val Glu Lys Arg Gly Val His Glu Ile Arg Glu Ile Arg Gln Phe His
          130          135          140

Phe Thr Gly Trp Pro Asp His Gly.Val Pro Tyr His Ala Thr Gly Leu
145          150          155          160

Leu Gly Phe Val Arg Gln Val Lys Ser Lys Ser Pro Pro Ser Ala Gly
          165          170          175

Pro Leu Val Val His Cys Ser Ala Gly Ala Gly Arg Thr Gly Cys Phe
          180          185          190

Ile Val Ile Asp Ile Met Leu Asp Met Ala Glu Arg Glu Gly Val Val
          195          200          205

Asp Ile Tyr Asn Cys Val Arg Glu Leu Arg Ser Arg Arg Val Asn Met
          210          215          220

Val Gln Thr Glu Glu Gln Tyr Val Phe Ile His Asp Ala Ile Leu Glu
225          230          235          240

Ala Cys Leu Cys Gly Asp Thr Ser Val
          245

```

# ES 2 281 915 T3

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 254 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

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

# ES 2 281 915 T3

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:10:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 253 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

```

Gln Gly Thr Phe Glu Leu Ala Asn Lys Glu Glu Asn Arg Glu Lys Asn
1          5          10          15

Arg Tyr Pro Asn Ile Leu Pro Asn Asp His Ser Arg Val Ile Leu Ser
20          25          30

Gln Leu Asp Gly Ile Pro Cys Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Tyr Ile
25          35          40          45

Asp Gly Tyr Lys Glu Lys Asn Lys Phe Ile Ala Ala Gln Gly Pro Lys
30          50          55          60

Gln Glu Thr Val Asn Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Gln Lys Ser
35          65          70          75          80

Ala Thr Ile Val Met Leu Thr Asn Leu Lys Glu Arg Lys Glu Glu Lys
40          85          90          95

Cys His Gln Tyr Trp Pro Asp Gln Gly Cys Trp Thr Tyr Gly Asn Ile
45          100          105          110

Arg Val Cys Val Glu Asp Cys Val Val Leu Val Asp Tyr Thr Ile Phe
50          115          120          125

Cys Ile Gln Pro Gln Leu Pro Asp Gly Cys Lys Ala Pro Arg Leu Val
55          130          135          140

Ser Gln Leu His Phe Thr Ser Trp Pro Asp Phe Gly Val Pro Phe Thr
60          145          150          155          160

Pro Ile Gly Met Leu Lys Phe Leu Lys Lys Val Lys Thr Leu Asn Pro
65          165          170          175

Val His Ala Gly Pro Ile Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg
70          180          185          190

Thr Gly Thr Phe Ile Val Ile Asp Ala Met Met Ala Met Met His Ala
75          195          200          205

Glu Gln Lys Val Asp Val Phe Glu Phe Val Ser Arg Ile Arg Asn Gln
80          210          215          220

Arg Pro Gln Met Val Gln Thr Asp Met Gln Tyr Thr Phe Ile Tyr Gln
85          225          230          235          240

Ala Leu Leu Glu Tyr Tyr Leu Tyr Gly Asp Thr Glu Leu
90          245          250

```

# ES 2 281 915 T3

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:11:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 253 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

```

Lys Phe Pro Ile Lys Asp Ala Arg Lys Pro His Asn Gln Asn Lys Asn
1           5           10           15

Arg Tyr Val Asp Ile Leu Pro Tyr Asp Tyr Asn Arg Val Glu Leu Ser
20           25           30

Glu Ile Asn Gly Asp Ala Gly Ser Thr Tyr Ile Asn Ala Ser Tyr Ile
35           40           45

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

Asp Glu Thr Val Asp Asp Phe Trp Arg Met Ile Trp Glu Gln Lys Ala
65           70           75           80

Thr Val Ile Val Met Val Thr Arg Cys Glu Glu Gly Asn Arg Asn Lys
85           90           95

Cys Ala Glu Tyr Trp Pro Ser Met Glu Glu Gly Thr Arg Ala Phe Lys
100          105          110

Asp Ile Val Val Thr Ile Asn Asp His Lys Arg Cys Pro Asp Tyr Ile
115          120          125

Ile Leu Asn Val Ala His Lys Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Glu Val
130          135          140

Thr His Ile Gln Phe Thr Ser Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Asp
145          150          155          160

Pro His Leu Leu Leu Lys Leu Arg Arg Arg Val Asn Ala Phe Ser Asp
165          170          175

Phe Phe Ser Gly Pro Ile Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg
180          185          190

Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ile Asp Ala Met Leu Glu Gly Leu Glu Ala
195          200          205

Glu Gly Lys Val Asp Val Tyr Gly Tyr Val Val Lys Leu Arg Arg Gln
210          215          220

Arg Cys Leu Met Val Gln Val Glu Ala Gln Tyr Ile Leu Ile His Gln
225          230          235          240

Ala Leu Val Glu Tyr Asn Gln Phe Gly Glu Thr Glu Val
245          250

```

## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:12:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 266 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

```

Leu Tyr Ser Arg Lys Glu Gly Gln Arg Gln Glu Asn Lys Asn Lys Asn
1          5          10          15

Arg Tyr Lys Asn Ile Leu Pro Phe Asp His Thr Arg Val Val Leu His
20          25          30

Asp Gly Asp Pro Asn Glu Pro Val Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Ile
35          40          45

Ile Met Pro Glu Phe Glu Thr Lys Cys Asn Asn Ser Lys Pro Lys Lys
50          55          60

Ser Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Cys Leu Gln Asn Thr Val Asn Asp Phe
65          70          75          80

Trp Arg Met Val Phe Gln Glu Asn Ser Arg Val Ile Val Met Thr Thr
85          90          95

Lys Glu Val Glu Arg Gly Lys Ser Lys Cys Val Lys Tyr Trp Pro Asp
100         105         110

Glu Tyr Ala Leu Lys Glu Tyr Gly Val Met Arg Val Arg Asn Val Lys
115         120         125

Glu Ser Ala Ala His Asp Tyr Thr Leu Leu Lys Leu Ser Lys Val Gly
130         135         140

Gln Gly Asn Thr Glu Arg Thr Val Trp Gln Tyr His Phe Arg Thr Trp
145         150         155         160

Pro Asp His Gly Val Pro Ser Asp Pro Gly Gly Val Leu Asp Phe Leu
165         170         175

Glu Glu Val His His Lys Gln Glu Ser Ile Met Asp Ala Gly Pro Val
180         185         190

```

## ES 2 281 915 T3

Val Val His Cys Ser Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Thr Phe Ile Val  
195 200 205

5 Ile Asp Ile Leu Ile Asp Ile Ile Arg Glu Lys Gly Val Asp Cys Asp  
210 215 220

10 Ile Asp Val Pro Lys Thr Ile Gln Met Val Arg Ser Gln Arg Ser Gly  
225 230 235 240

Met Val Gln Thr Glu Ala Gln Tyr Arg Phe Ile Tyr Met Ala Val Gln  
245 250 255

15 His Tyr Ile Glu Thr Leu Gln Arg Arg Ile  
260 265

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 263 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) CLASE DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

35 Leu His Gln Arg Leu Glu Gly Gln Arg Pro Glu Asn Lys Gly Lys Asn  
1 5 10 15

40 Arg Tyr Lys Asn Ile Leu Pro Phe Asp His Ser Arg Val Ile Leu Gln  
20 25 30

Gly Arg Asp Ser Asn Ile Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr  
35 40 45

45 Ile Lys Asn Gln Leu Leu Gly Pro Asp Glu Asn Ala Lys Thr Tyr Ile  
50 55 60

50 Ala Ser Gln Gly Cys Leu Glu Ala Thr Val Asn Asp Phe Trp Gln Met  
65 70 75 80

Ala Trp Gln Glu Asn Ser Arg Val Ile Val Met Thr Thr Arg Glu Val  
85 90 95

55 Glu Lys Gly Arg Asn Lys Cys Val Pro Tyr Trp Pro Glu Val Gly Met  
100 105 110

60

65

## ES 2 281 915 T3

		Gln	Arg	Ala	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Ser	Val	Thr	Asn	Cys	Gly	Glu	His	Asp
				115					120					125			
5		Thr	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Gln	Val	Ser	Pro	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp
		130						135					140				
10		Leu	Ile	Arg	Glu	Ile	Trp	His	Tyr	Gln	Tyr	Leu	Ser	Trp	Pro	Asp	His
		145					150					155				160	
		Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Pro	Gly	Gly	Val	Leu	Ser	Phe	Leu	Asp	Gln	Ile
						165				170					175		
15		Asn	Gln	Arg	Gln	Glu	Ser	Leu	Pro	His	Ala	Gly	Pro	Ile	Ile	Val	His
					180					185					190		
20		Cys	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly	Arg	Thr	Gly	Thr	Ile	Ile	Val	Ile	Asp	Met
				195					200					205			
		Leu	Met	Glu	Asn	Ile	Ser	Thr	Lys	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	Ile	Asp	Ile
		210						215					220				
25		Gln	Lys	Thr	Ile	Gln	Met	Val	Arg	Ala	Gln	Arg	Ser	Gly	Met	Val	Gln
		225				230						235				240	
30		Thr	Glu	Ala	Gln	Tyr	Lys	Phe	Ile	Tyr	Val	Ala	Ile	Ala	Gln	Phe	Ile
					245					250					255		
		Glu	Thr	Thr	Lys	Lys	Lys	Leu									
					260												

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:14:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 254 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

	Asn	Gln	Ser	Cys	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Pro	Glu	Asn	Arg	Gly	Lys	Asn
	1			5						10					15	
55	Arg	Tyr	Asn	Asn	Ile	Leu	Pro	Tyr	Asp	Ala	Thr	Arg	Val	Lys	Leu	Ser
			20					25						30		

## ES 2 281 915 T3

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

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:15:

- |    |  |
|----|--|
| 55 | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:         |
|    | (A) LONGITUD: 251 aminoácidos                |
|    | (B) TIPO: aminoácido                         |
| 60 | (C) CLASE DE CADENA: sencilla                |
|    | (D) TOPOLOGÍA: lineal                        |
|    | (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido                  |
| 65 | (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:15: |



## ES 2 281 915 T3

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

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:16:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 255 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

## ES 2 281 915 T3

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65

(A) LONGITUD: 243 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

## ES 2 281 915 T3

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:17:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 257 aminoácidos

# ES 2 281 915 T3

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

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

## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:19:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 258 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

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

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:20:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 253 aminoácidos

# ES 2 281 915 T3

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:20:

```

10      Ile Tyr Pro Thr Ala Thr Gly Glu Lys Glu Glu Asn Val Lys Lys Asn
      1              5              10              15

15      Arg Tyr Lys Asp Ile Leu Pro Phe Asp His Ser Arg Val Lys Leu Thr
              20              25              30

20      Leu Lys Thr Pro Ser Gln Asp Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Phe Ile
              35              40              45

25      Lys Gly Val Tyr Gly Pro Lys Ala Tyr Val Ala Thr Gln Gly Pro Leu
      50              55              60

30      Ala Asn Thr Val Ile Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Tyr Asn Val
      65              70              75              80

35      Val Ile Ile Val Met Ala Cys Arg Glu Phe Glu Met Gly Arg Lys Lys
              85              90              95

40      Cys Glu Arg Tyr Trp Pro Leu Tyr Gly Glu Asp Pro Ile Thr Phe Ala
              100             105             110

45      Pro Phe Lys Ile Ser Cys Glu Asp Glu Gln Ala Arg Thr Asp Tyr Phe
              115             120             125

50      Ile Leu Leu Leu Glu Phe Gln Asn Glu Ser Arg Arg Leu Tyr Gln Phe
      130             135             140

55      His Tyr Val Asn Trp Pro Asp His Asp Val Pro Ser Ser Phe Asp Ser
      145             150             155             160

60      Ile Leu Asp Met Ile Ser Leu Met Arg Lys Tyr Gln Glu His Glu Asp
              165             170             175

65      Val Pro Ile Cys Ile His Cys Ser Ala Gly Cys Gly Arg Thr Gly Ala
              180             185             190

      Ile Cys Ala Ile Asp Tyr Thr Trp Asn Leu Leu Lys Ala Gly Lys Ile
              195             200             205

70      Pro Glu Glu Phe Asn Val Phe Asn Leu Ile Gln Glu Met Arg Thr Gln
      210             215             220

75      Arg His Ser Ala Val Gln Thr Lys Glu Gln Tyr Glu Leu Val His Arg
      225             230             235             240

80      Ala Ile Ala Gln Leu Phe Glu Lys Gln Leu Gln Leu Tyr
              245             250

```

## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:21:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 242 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:21:

Gly Leu Ala Ile Thr Phe Ala Lys Leu Pro Gln Asn Leu Asp Lys Asn  
1 5 10 15

Arg Tyr Lys Asp Val Leu Pro Tyr Asp Thr Thr Arg Val Leu Leu Gln  
20 25 30

Gly Asn Glu Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Tyr Val Asn Met Glu Ile Pro  
35 40 45

Ala Ala Asn Leu Val Asn Lys Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro  
50 55 60

His Thr Cys Ala Gln Phe Trp Gln Val Val Trp Asp Gln Lys Leu Ser  
65 70 75 80

Leu Ile Val Met Leu Thr Thr Leu Thr Glu Arg Gly Arg Thr Lys Cys  
85 90 95

His Gln Tyr Trp Pro Asp Pro Pro Asp Val Met Asn His Gly Gly Phe  
100 105 110

His Ile Gln Cys Gln Ser Glu Asp Cys Thr Ile Ala Tyr Val Ser Met  
115 120 125

Leu Val Thr Asn Thr Gln Thr Gly Glu Glu His Thr Val Thr His Leu  
130 135 140

Gln Tyr Val Ala Trp Pro Asp His Gly Ile Pro Asp Asp Ser Ser Asp  
145 150 155 160

Phe Leu Glu Phe Val Asn Tyr Val Arg Ser Leu Arg Val Asp Ser Glu  
165 170 175

Pro Val Leu Val His Cys Ser Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Val Leu  
180 185 190

Val Thr Met Glu Thr Ala Met Cys Leu Thr Glu Arg Asn Leu Pro Ile  
195 200 205

Tyr Pro Leu Asp Ile Val Arg Lys Met Arg Asp Gln Arg Ala Met Met  
210 215 220

Val Gln Thr Ser Ser Gln Tyr Lys Phe Val Cys Glu Ala Ile Leu Arg  
225 230 235 240

Val Tyr

## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:22:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 277 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:22:

```

Pro Ser Glu Thr Ser Glu Gly Asp Lys Lys His Asn Thr Ser Lys Asn
1      5      10      15
Arg Tyr Thr Asn Ile Leu Pro Val Asn His Thr Arg Val Gln Leu Lys
20      25      30
Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile
35      40      45
Asp Gly Ala Tyr Pro Lys Gln Phe Ile Cys Thr Gln Gly Pro Leu Pro
50      55      60
Asn Thr Ile Ala Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Asn Arg Cys Arg
65      70      75      80
Ile Ile Val Met Leu Ser Arg Glu Ser Glu Gly Ser Glu Asn Cys Arg
85      90      95
Ile Lys Cys Asp Arg Tyr Trp Pro Glu Gln Ile Gly Gly Glu Gln Phe
100     105     110
Ser Ile Tyr Gly Asn Gly Asn Glu Val Phe Gly Thr Tyr Ser Val Glu
115     120     125
Leu Val Glu Val Ile Gln Cys Arg Glu Ile Ile Thr Arg Asn Ile Arg
130     135     140
Leu Thr Phe Glu Gly Glu Thr Arg Asp Ile Thr Gln Tyr Gln Tyr Glu
145     150     155     160
Gly Trp Pro Asp His Asn Ile Pro Asp His Thr Gln Pro Phe Arg Gln
165     170     175
Leu Leu His Ser Ile Thr Asn Arg Gln Asn Gln Ile Ile Pro Ser Ser
180     185     190
Asp Arg Asn Val Pro Ile Ile Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg
195     200     205
Thr Gly Thr Phe Cys Thr Ala Val Ile Met Met Lys Lys Leu Asp His
210     215     220
Tyr Phe Lys Gln Leu Asp Tyr Asn Ser Arg Ile Asp Phe Asn Leu Phe
225     230     235     240
Ser Ile Val Leu Lys Leu Arg Glu Gln Arg Pro Gly Met Val Gln Gln
245     250     255
Leu Glu Gln Tyr Leu Phe Cys Tyr Lys Thr Ile Leu Asp Glu Ile Tyr
260     265     270
His Arg Leu Asn Cys
275

```



## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:23:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 254 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:23:

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

## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:24:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 250 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:24:

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

## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:25:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 260 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:25:

```

15      Gly Ile Thr Ala Asp Ser Ser Asn His Pro Asp Asn Lys His Lys Asn
      1              5              10              15

20      Arg Tyr Ile Asn Ile Val Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Lys Leu Ala
      20              25              30

25      Gln Leu Ala Glu Lys Asp Gly Lys Leu Thr Asp Tyr Ile Asn Ala Asn
      35              40              45

30      Tyr Val Asp Gly Tyr Asn Arg Pro Lys Ala Tyr Ile Ala Ala Gln Gly
      50              55              60

35      Pro Leu Lys Ser Thr Ala Glu Asp Phe Trp Arg Met Ile Trp Glu His
      65              70              75              80

40      Asn Val Glu Val Ile Val Met Ile Thr Asn Leu Val Glu Lys Gly Arg
      85              90              95

45      Arg Lys Cys Asp Gln Tyr Trp Pro Ala Asp Gly Ser Glu Glu Tyr Gly
      100             105             110

50      Asn Phe Leu Val Thr Gln Lys Ser Val Gln Val Leu Ala Tyr Tyr Thr
      115             120             125

55      Val Phe Thr Leu Arg Asn Thr Lys Ile Lys Lys Gly Ser Gln Lys Gly
      130             135             140

60      Arg Pro Ser Gly Arg Val Val Thr Gln Tyr His Tyr Thr Gln Trp Pro
      145             150             155             160

65      Asp Met Gly Val Pro Glu Tyr Ser Leu Pro Val Leu Thr Phe Val Arg
      165             170             175

70      Lys Ala Ala Tyr Ala Lys Arg His Ala Val Gly Pro Val Val Val His
      180             185             190

75      Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Tyr Ile Val Leu Asp Ser
      195             200             205

80      Met Leu Gln Gln Ile Gln His Glu Gly Thr Val Asn Ile Phe Gly Phe
      210             215             220

85      Leu Lys His Ile Arg Ser Gln Arg Asn Tyr Leu Val Gln Thr Glu Glu
      225             230             235             240

90      Gln Tyr Val Phe Ile His Asp Thr Leu Val Glu Ala Ile Leu Ser Lys
      245             250             255

95      Glu Thr Glu Val
      260
  
```

# ES 2 281 915 T3

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:26:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 245 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:26:

```

Thr Ser Arg Phe Ile Ser Ala Asn Leu Pro Cys Asn Lys Phe Lys Asn
1           5           10           15

Arg Leu Val Asn Ile Met Pro Tyr Glu Leu Thr Arg Val Cys Leu Gln
20           25           30

Pro Ile Arg Gly Val Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Leu
35           40           45

Asp Gly Tyr Arg Gln Gln Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu
50           55           60

Ala Glu Ser Thr Glu Asp Phe Trp Arg Met Leu Trp Glu His Asn Ser
65           70           75           80

Thr Ile Ile Val Met Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly Arg Glu Lys
85           90           95

Cys His Gln Tyr Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr Gln Tyr Phe
100          105          110

Val Val Asp Pro Met Ala Glu Tyr Asn Met Pro Gln Tyr Ile Leu Phe
115          120          125

Lys Val Thr Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg Thr Ile Arg Gln Phe
130          135          140

Gln Phe Thr Asp Trp Pro Glu Gln Gly Val Pro Lys Thr Gly Glu Gly
145          150          155          160

Phe Ile Asp Phe Ile Gly Gln Val His Lys Thr Lys Glu Gln Phe Gly
165          170          175

Gln Asp Gly Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr
180          185          190

Gly Val Phe Ile Thr Leu Ser Ile Val Leu Glu Arg Met Arg Tyr Glu
195          200          205

Gly Val Val Asp Met Phe Gln Thr Val Lys Thr Leu Arg Thr Gln Arg
210          215          220

Pro Ala Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Gln Leu Cys Tyr Arg Ala
225          230          235          240

Ala Leu Glu Tyr Leu
245

```

ES 2 281 915 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 232 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:27:

Asn Asp Lys Met Arg Thr Gly Asn Leu Pro Ala Asn Met Lys Lys Asn  
1 5 10 15

Arg Val Leu Gln Ile Ile Pro Tyr Glu Phe Asn Arg Val Ile Ile Pro  
20 25 30

Val Lys Arg Gly Glu Asn Asp Lys Met Arg Thr Gly Asn Leu Pro Ala  
35 40 45

Asn Met Lys Lys Asn Arg Val Leu Gln Ile Ile Pro Tyr Glu Phe Asn  
50 55 60

Arg Val Ile Ile Pro Val Lys Arg Gly Glu Glu Asn Thr Asp Tyr Val  
65 70 75 80

Asn Ala Ser Phe Ile Asp Gly Tyr Arg Gln Lys Asp Ser Tyr Ile Ala  
85 90 95

Ser Gln Gly Pro Leu Leu His Thr Ile Glu Asp Phe Trp Arg Met Ile  
100 105 110

Trp Glu Trp Lys Ser Cys Ser Ile Val Met Leu Thr Glu Leu Glu Glu  
115 120 125

Arg Gly Gln Glu Lys Cys Ala Gln Tyr Trp Pro Ser Asp Gly Leu Val  
130 135 140

Ser Tyr Gly Asp Ile Thr Val Glu Leu Lys Lys Glu Glu Glu Cys Glu  
145 150 155 160

Ser Tyr Thr Val Leu Leu Val Thr Asn Thr Arg Glu Asn Lys Ser Arg  
165 170 175

Gln Ile Arg Gln Phe His Phe His Gly Trp Pro Glu Val Gly Ile Pro  
180 185 190

Ser Asp Gly Lys Gly Met Ile Ser Ile Ile Ala Ala Val Gln Lys Gln  
195 200 205

Gln Gln Gln Ser Gly Asn His Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly  
210 215 220

Ala Gly Arg Thr Gly Thr Phe Cys  
225 230

## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:28:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 249 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:28:

```

Lys Glu Asn Met Arg Thr Gly Asn Leu Pro Ala Asn Met Lys Lys Ala
1          5          10          15

Arg Val Ile Gln Ile Ile Pro Tyr Asp Phe Asn Arg Val Ile Leu Ser
20          25          30

Met Lys Arg Gly Gln Glu Tyr Thr Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Ile
35          40          45

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

Ala His Thr Val Glu Asp Phe Trp Arg Met Ile Trp Glu Trp Lys Ser
65          70          75          80

His Thr Ile Val Met Leu Thr Glu Val Gln Glu Arg Glu Gln Asp Lys
85          90          95

Cys Tyr Gln Tyr Trp Pro Thr Glu Gly Ser Val Thr His Gly Glu Ile
100         105         110

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

Leu Val Thr Leu Asn Gln Pro Gln Ala Arg Gln Glu Glu Gln Val Arg
130         135         140

Val Val Arg Gln Phe His Phe His Gly Trp Pro Glu Ile Gly Ile Pro
145         150         155         160

Ala Glu Gly Lys Gly Met Ile Asp Leu Ile Ala Ala Val Gln Lys Gln
165         170         175

Gln Gln Gln Thr Gly Asn His Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly
180         185         190

Ala Gly Arg Thr Gly Thr Phe Ile Ala Leu Ser Asn Ile Leu Glu Arg
195         200         205

Val Lys Ala Glu Gly Leu Leu Asp Val Phe Gln Ala Val Lys Ser Leu
210         215         220

Arg Leu Gln Arg Pro His Met Val Gln Thr Leu Glu Gln Tyr Glu Phe
225         230         235         240

Cys Tyr Lys Val Val Gln Asp Phe Ile
245

```

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:29:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 249 aminoácidos

# ES 2 281 915 T3

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:29:

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

# ES 2 281 915 T3

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:30:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 277 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:30:

```

Trp Arg Thr Gln His Ile Gly Asn Gln Glu Glu Asn Lys Lys Lys Asn
1          5          10          15

Arg Asn Ser Asn Val Val Pro Tyr Asp Phe Asn Arg Val Pro Leu Lys
20          25          30

His Glu Leu Glu Met Ser Lys Glu Ser Glu Pro Glu Ser Asp Glu Ser
35          40          45

Ser Asp Asp Asp Ser Asp Ser Glu Glu Thr Ser Lys Tyr Ile Asn Ala
50          55          60

Ser Phe Val Met Ser Tyr Trp Lys Pro Glu Met Met Ile Ala Ala Gln
65          70          75          80

Gly Pro Leu Lys Glu Thr Ile Gly Asp Phe Trp Gln Met Ile Phe Gln
85          90          95

Arg Lys Val Lys Val Ile Val Met Leu Thr Glu Leu Val Asn Gly Asp
100          105          110

Gln Glu Val Cys Ala Gln Tyr Trp Gly Glu Gly Lys Gln Thr Tyr Gly
115          120          125

Asp Met Glu Val Glu Met Lys Asp Thr Asn Arg Ala Ser Ala Tyr Thr
130          135          140

Leu Phe Glu Leu Arg His Ser Lys Arg Lys Glu Pro Arg Thr Val Tyr
145          150          155          160

Gln Tyr Gln Cys Thr Thr Trp Lys Gly Glu Glu Leu Pro Ala Glu Pro
165          170          175

Lys Asp Leu Val Ser Met Ile Gln Asp Leu Lys Gln Lys Leu Pro Lys
180          185          190

Ala Ser Pro Glu Gly Met Lys Tyr His Lys His Ala Ser Ile Leu Val
195          200          205

His Cys Arg Asp Gly Ser Gln Gln Thr Gly Leu Phe Cys Ala Leu Phe
210          215          220

Asn Leu Leu Glu Ser Ala Glu Thr Glu Asp Val Val Asp Val Phe Gln
225          230          235          240

Val Val Lys Ser Leu Arg Lys Ala Arg Pro Gly Val Val Cys Ser Tyr
245          250          255

Glu Gln Tyr Gln Phe Leu Tyr Asp Ile Ile Ala Ser Ile Tyr Pro Ala
260          265          270

Gln Asn Gly Gln Val
275

```



## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:31:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 247 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:31:

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

## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:32:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 252 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:32:

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

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:33:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 252 aminoácidos

# ES 2 281 915 T3

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:33:

10

Val Glu Cys Phe Ser Ala Gln Lys Glu Cys Asn Lys Glu Lys Asn Arg  
1 5 10 15

15

Asn Ser Ser Val Val Pro Ser Glu Arg Ala Arg Val Gly Leu Ala Pro  
20 25 30

20

Leu Pro Gly Met Lys Gly Thr Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Tyr Ile Met  
35 40 45

Gly Tyr Tyr Arg Ser Asn Glu Phe Ile Ile Thr Gln His Pro Leu Pro  
50 55 60

25

His Thr Thr Lys Asp Phe Trp Arg Met Ile Trp Asp His Asn Ala Gln  
65 70 75 80

30

Ile Ile Val Met Leu Pro Asp Asn Gln Ser Leu Ala Glu Asp Glu Phe  
85 90 95

Val Tyr Trp Pro Ser Arg Glu Glu Ser Met Asn Cys Glu Ala Phe Thr  
100 105 110

35

Val Thr Leu Ile Ser Lys Asp Arg Leu Cys Leu Ser Asn Glu Glu Gln  
115 120 125

40

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

Val Arg His Phe Gln Cys Pro Lys Trp Pro Asn Pro Asp Ala Pro Ile  
145 150 155 160

45

Ser Ser Thr Phe Glu Leu Ile Asn Val Ile Lys Glu Glu Ala Leu Thr  
165 170 175

50

Arg Asp Gly Pro Thr Ile Val His Asp Glu Tyr Gly Ala Val Ser Ala  
180 185 190

Gly Met Leu Cys Ala Leu Thr Thr Leu Ser Gln Gln Leu Glu Asn Glu  
195 200 205

55

Asn Ala Val Asp Val Phe Gln Val Ala Lys Met Ile Asn Leu Met Arg  
210 215 220

60

Pro Gly Val Phe Thr Asp Ile Glu Gln Tyr Gln Phe Ile Tyr Lys Ala  
225 230 235 240

65

Met Leu Ser Leu Val Ser Thr Lys Glu Asn Gly Asn  
245 250

## ES 2 281 915 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:34:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 278 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:34:

```

15      Glu Thr Asn Leu Met Ala Glu Gln Val Glu Glu Leu Lys Asn Cys Thr
        1           5           10           15
        Pro Tyr Leu Glu Gln Gln Tyr Lys Asn Ile Ile Gln Phe Gln Pro Lys
           20           25           30
20      Asp Ile His Ile Ala Ser Ala Met Lys Gln Val Asn Ser Ile Lys Asn
           35           40           45
        Arg Gly Ala Ile Phe Pro Ile Glu Gly Ser Arg Val His Leu Thr Pro
           50           55           60
25      Lys Pro Gly Glu Asp Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Trp Leu His
        65           70           75           80
        Gly Phe Arg Arg Leu Arg Asp Phe Ile Val Thr Gln His Pro Met Ala
           85           90           95
30      His Thr Ile Lys Asp Phe Trp Gln Met Val Trp Asp His Asn Ala Gln
           100          105          110
        Thr Val Val Leu Leu Ser Ser Leu Asp Asp Ile Asn Phe Ala Gln Phe
           115          120          125
35      Trp Pro Asp Glu Ala Thr Pro Ile Glu Ser Asp His Tyr Arg Val Lys
           130          135          140
        Phe Leu Asn Lys Thr Asn Lys Ser Asp Tyr Val Ser Phe Val Ile Gln
        145          150          155          160
40      Ser Ile Gln Asp Asp Tyr Glu Leu Thr Val Lys Met Leu His Cys Pro
           165          170          175
        Ser Trp Pro Glu Met Ser Asn Pro Asn Ser Ile Tyr Asp Phe Ile Val
           180          185          190
45      Asp Val His Glu Arg Cys Asn Asp Tyr Arg Asn Gly Pro Ile Val Ile
           195          200          205
        Val Asp Arg Tyr Gly Gly Ala Gln Ala Cys Thr Phe Cys Ala Ile Ser
           210          215          220
50      Ser Leu Ala Ile Glu Met Glu Tyr Cys Ser Thr Ala Asn Val Tyr Gln
        225          230          235          240
        Tyr Ala Lys Leu Tyr His Asn Lys Arg Pro Gly Val Trp Thr Ser Ser
           245          250          255
55      Glu Asp Ile Arg Val Ile Tyr Asn Ile Leu Ser Phe Leu Pro Gly Asn
           260          265          270
60      Leu Asn Leu Leu Lys Arg
           275

```

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:35:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 243 aminoácidos

# ES 2 281 915 T3

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:35:

10

Thr Asn Asp Pro Arg Tyr Leu Gln Ala Cys Gly Gly Glu Lys Ile Leu  
1 5 10 15

15

Asn Arg Phe Arg Asp Ile Gln Cys Cys Arg Gln Thr Ala Val Arg Ala  
20 25 30

20

Asp Asn Tyr Ile Gln Val Gly Asn Thr Arg Thr Ile Ala Cys Gln Tyr  
35 40 45

Pro Leu Gln Ser Gln Leu Glu Ser His Phe Arg Met Leu Ala Glu Asn  
50 55 60

25

Arg Thr Pro Val Leu Ala Val Leu Ala Ser Ser Ser Glu Ile Ala Asn  
65 70 75 80

30

Gln Arg Phe Gly Met Pro Asp Tyr Phe Arg Gln Ser Gly Thr Tyr Gly  
85 90 95

Ser Ile Thr Val Glu Ser Lys Met Thr Gln Gln Val Gly Leu Gly Asp  
100 105 110

35

Gly Ile Asn Met Tyr Thr Leu Thr Ile Arg Glu Ala Gly Gln Lys Thr  
115 120 125

40

Ile Ser Val Pro Val Val His Val Gly Asn Trp Pro Asp Gln Thr Ala  
130 135 140

45

Val Ser Ser Glu Val Thr Lys Ala Leu Ala Ser Leu Val Asp Gln Thr  
145 150 155 160

Ala Glu Thr Lys Arg Asn Met Tyr Glu Ser Lys Gly Ser Ser Ala Val  
165 170 175

50

Ala Asp Asp Ser Lys Leu Arg Pro Val Ile His Cys Arg Ala Gly Val  
180 185 190

55

Gly Arg Thr Ala Gln Leu Ile Gly Ala Met Cys Met Asn Asp Ser Arg  
195 200 205

Asn Ser Gln Leu Ser Val Glu Asp Met Val Ser Gln Met Arg Val Gln  
210 215 220

60

Arg Asn Gly Met Val Gln Lys Asp Glu Gln Leu Asp Val Leu Ile Lys  
225 230 235 240

65

Leu Ala Glu

## ES 2 281 915 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:36:

Xaa	His	Cys	Xaa	Ala	Gly	Xaa	Xaa	Arg	Xaa	Gly
1				5					10	