



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 fosfatasa de captura de sustrato.**

(30) Prioridad: **25.07.1996 US 685992**

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

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

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 aminoácidos 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, aislar 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 PTB-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^{cas}, respectivamente. Estas asociaciones se observaron en lisados de varias líneas celulares y en células COS transfectadas, indicando que p210 bcr:abl y p130^{cas} 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^{cas} 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 Km de la enzima pero que tiene como resultado una reducción en el valor de Kcat a menos de 1 por minuto (menos de 1 min⁻¹). 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

ES 2 281 915 T3

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.

5 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 Km de la enzima, pero que ocasiona una reducción en el valor de Kcat a menos de 1 por minuto (menos de 1 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).

10 15 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 Km de la enzima pero que ocasiona una reducción de la Kcat a menos 1 por minuto (menos de 1 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).

20 25 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 Km de la enzima pero que ocasiona una reducción en la Kcat a menos de 1 por minuto (menos de 1 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.

30 35 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 Km de la enzima pero que ocasiona una reducción en la Kcat a menos de 1 por minuto (menos de 1 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.

40 45 50 Por ejemplo, la invención se refiere a un método para reducir los efectos de transformación de oncogenes asociados con p130^{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^{cas}, regulando de esta manera de forma negativa sus efectos corriente abajo. Los mutantes DA de PTP-PEST se unen pero no desfosforilan p130^{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^{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.

55 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.

60 65 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

ES 2 281 915 T3

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 fosfatasas, 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.

10 Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1E muestran un alineamiento múltiple de secuencias de los dominios catalíticos de PTP (SEC ID Nº 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.

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

Descripción detallada de la invención

25 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 Nº 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, 30 los mutantes CS están limitados en su aplicabilidad y no pueden usarse para aislar todas las combinaciones de PTP y sustratos.

35 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 Struct. 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 GENWORKS.

40 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 Kcat a menos de 1 por minuto (menos de 1 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.

45 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

ES 2 281 915 T3

quinasa (PKA) y tiene como resultado una reducción de la actividad enzimática como consecuencia de un aumento en la Km 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 5 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 10 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 15 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 Km de la enzima, pero que ocasiona una reducción en la Kcat a menos de 1 por minuto (menos de 1 min⁻¹). Estas PTP conservan la capacidad de formar un complejo 20 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 Km similar a la de la fosfatasa de tipo silvestre, pero tiene un valor de Vmax que está reducido en un factor de al menos 10⁴ 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, 25 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 30 aminoácido que no produce una alteración significativa de la Km de la enzima pero que ocasiona una reducción en la Kcat a menos de 1 por minuto (menos de 1 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 35 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 40 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] HCXAGXXR[S/T]G (SEC ID Nº 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_γ, MKP-1, DEP-1, PTP_μ, 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 45 181 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 50 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 Km de la enzima pero que ocasiona una reducción en la Kcat a menos de 1 por minuto (menos de 1 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 Nº 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, 55 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, β-galactosidasa y acetilcolinesterasa. Los ejemplos de materiales fluo-

ES 2 281 915 T3

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}P , yodo I^{125} , 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 Km de la enzima pero que ocasiona una reducción en la Kcat a menos de 1 por minuto (menos de 1 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, p130^{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 Km de la enzima, pero que ocasiona una reducción en la Kcat a menos de 1 por minuto (menos de 1 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 p130^{sac}, 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 p130^{cas}, regulando de esta manera de forma negativa sus efectos corriente abajo. Los mutantes DA de PTP-PEST se unen pero no desfosforilan p130^{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 p130^{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 p130^{cas}, regulando de esta manera de forma negativa los efectos corriente abajo de p130^{cas} y reduciendo la formación de complejos de señalización asociados con p130^{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 Km de la enzima pero que ocasiona una reducción en la Kcat a menos de 1 por minuto (menos 1 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 compite con la PTP de tipo silvestre por la unión al sustrato. Por ejemplo, puede identificarse una proteína fosforilada en tirosina específica que esté implicada

ES 2 281 915 T3

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 necesita tratamiento para ligarse o unirse al sustrato fosforilado en tirosina, inhibiendo o reduciendo de esta manera la función de la proteína fosforilada.

- 5 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 Nº 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.

10 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 15 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 20 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}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.

25 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 Nº 5.352.660 de Pawson describe métodos adecuados para uso en esta invención. Una reducción 30 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.

35 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.

40 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 Km de la enzima pero que ocasiona una reducción en la Kcat a menos de 1 por minuto (menos de 1 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, propileneglicol, polietileneglicol líquido) 45 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 50 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.

55 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

60 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

65 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™ (Bio-Rad, Richmond, CA). Despues se cambiaron regiones que contenían la mutación puntual requerida por las secuencias

ES 2 281 915 T3

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 5 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 (BaculoGoldTM, 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 aminoácidos 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 10 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 (DO₆₀₀ aproximadamente 0,5). Después se indujo la expresión de la proteína de fusión por la adición de isopropil-1-tio-b-D-galactopiranósido 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 15 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 20 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 20 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 30 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 estreptomicina 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 35 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 40 con pervanadato 0,1 mM (20 ml de una solución reciente que contenía metavanadato sódico (NaVO₃) 50 mM y H₂O₂ 50 mM a 10 ml de medio). El tratamiento de las células con H₂O₂ 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 H₂O₂ 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: 2896-45 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).

50 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 55 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, 60 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.

ES 2 281 915 T3

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.

5 La desfosforilación se terminó por la eliminación de alícuotas (30 µg 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 ³²P fosforilada en tirosina como sustrato se realizaron como se describe en Flint *et al.* (*EMBO J.* 12: 1937-1946 (1993)).

10 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-15 3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida, un método descrito originalmente en Kamps y Sefton (*Oncogene* 2: 305-315 (1988)). El anticuerpo monoclonal p130^{cas} 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™ (Pierce, Rockford, IL).

Inmunoprecipitación y Captura de Sustrato

25 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 pimelimido 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 pimelimido 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.

35 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-40 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.

45 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.

50 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; 55 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 60 se ha descrito anteriormente.

PTP1B y p210 bcr:abl

65 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

ES 2 281 915 T3

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 linfoideas 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 Glutatión-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 purificado (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.

ES 2 281 915 T3

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^{cas} 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^{cas}. 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^{cas}.

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^{FAK}, ras-GAP, gp130 y p130^{cas}. De estos candidatos, p130^{cas} 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^{cas} se ensayó por inmunotransferencia de las fracciones de Mono Q usando un anticuerpo contra p130^{cas}. La banda de 130 kDa correspondiente a p130^{cas} 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^{cas} 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^{cas}. La inmunotransferencia de las proteínas asociadas con PTP-PEST usando el anticuerpo p130^{cas} demostró que la proteína

ES 2 281 915 T3

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

5 *Determinación de Características Estructurales de PTP-PEST Implicadas en la Interacción Específica con p130^{cas} Fosforilada en Tirosina*

La interacción entre p130^{cas} 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-fosftirosina o anti-p130^{cas}.

Se descubrió que la fosfatasa de longitud completa de tipo silvestre no podía asociarse de manera estable con p130^{cas} 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^{cas} a partir del lisado. La incapacidad de la fosfatasa de tipo silvestre de precipitar p130^{cas} fosforilada en tirosina supuestamente refleja la naturaleza transitoria de la interacción normal entre PTP-PEST y p130^{cas} fosforilada en tirosina, que probablemente concluirá en cuanto p130^{cas} se desfosforile por PTP-PEST.

20 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^{cas} dependa en alguna medida de la asociación de estos segmentos con el dominio SH3 de p130^{cas}. Por lo tanto, la posible contribución del segmento C-terminal de PTP-TESP en la interacción específica observada de PTP-PEST con p130^{cas} se abordó en experimentos de captura de sustrato adicionales 25 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 fosftirosina de p130^{cas} específicamente, mientras que tanto la proteína de fusión de tipo silvestre como la GST sola no podían precipitar p130^{cas}. Por lo tanto, la interacción específica entre PTP-PEST y p130^{cas} observada en estos experimentos parece ser una propiedad intrínseca del dominio catalítico de PTP-PEST, 30 emulando la preferencia observada del dominio catalítico de la PTP-PEST activa para la desfosforilación de p130^{cas} *in vitro*.

Especificidad de la Interacción entre PTP-PEST Mutante y p130^{cas} Fosforilada en Tirosina

35 En vista de la abundancia relativa de p130^{cas} 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^{cas} estuviera dirigida por el sustrato (reflejando la abundancia de este sustrato potencial con respecto a las otras proteínas que contienen fosftirosina 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 40 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 interactuar de forma estable con ninguna proteína que contenía fosftirosina, 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 45 mutante de ácido aspártico de PTP1B (D181A), que parecía precipitar esencialmente todas las proteínas que contenían fosftirosina a partir del lisado con una eficacia similar. Estos datos subrayan la naturaleza específica de la interacción entre PTP-PEST y p130^{cas}, 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.

50 La especificidad de la interacción entre PTP-PEST y p130^{cas} 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-fosftirosina. 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 55 analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosftirosina o anti-p130^{cas} como se ha descrito anteriormente.

En cualquier caso, la proteína PTP-PEST mutante de D199A precipitaba una sola banda de fosftirosina ancha con un peso molecular aparente comprendido entre 120 y 150 kDa en diferentes líneas celulares, mientras que la matriz de 60 afinidad sola no precipitaba ninguna proteína que contuviera fosftirosina. La inmunotransferencia de los precipitados con un anticuerpo p130^{cas} reveló que la proteína precipitada a partir de todos los lisados celulares correspondía a p130^{cas}; la variación observada de peso molecular entre las diferentes líneas celulares supuestamente refleja diferencias de especie en el peso molecular de p130^{cas} o la expresión de diferentes formas unidas de forma alternativa (Sakai *et al.*, *EMBO J.* 13: 3748-3756 (1994)).

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

que contenía fosfotirosina en los precipitados, incluso en lisados de células 293 que contenían muy poca proteína p130^{cas} 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^{cas} 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^{cas} es sustancialmente mayor que para cualquier otro sustrato presente, y subraya adicionalmente la extraordinaria selectividad de sustrato de PTP-PEST por p130^{cas}.

10 *Inhibición por Vanadato de la Asociación de p130^{cas} 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^{cas} 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^{cas} 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^{cas}. La actividad de PTP-PEST de tipo silvestre también se determinó en las mismas condiciones, usando RCM-lisozima marcada con ³²P 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^{cas} 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^{cas}.

Asociación de p130^{cas} Endógena con PTP-PEST Mutante Transfectada en Células COS

El trabajo descrito anteriormente sugiere claramente que p130^{cas} representa un sustrato potencial fisiológicamente significativo para PTP-PEST. Para evaluar si PTP-PEST interacciona con p130^{cas} 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^{cas} de nuevo era única en su capacidad de asociarse con la proteína PTP-PEST C231S, indicando que p130^{cas} 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^{cas} 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^{cas} 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^{cas}. La capacidad del mutante de PTP-PEST C231S de asociarse en un complejo estable con p130^{cas} 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^{cas} 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^{cas}.

Los resultados descritos aquí implican a p130^{cas} como un sustrato fisiológicamente relevante para PTP-PEST. Además, la rigurosidad observada y la exclusividad de la interacción entre PTP-PEST y p130^{cas} en una amplia diversidad de líneas celulares sugiere que p130^{cas} 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^{cas} exclusivamente como sustrato a partir de lisados de varias líneas celulares diferentes, que contienen una combinación total de al menos cien sustratos 5 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 10 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 15 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 fosftirosina 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^{cas} en un contexto intracelular en presencia de 20 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^{cas} 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^{cas} 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^{cas} 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^{cas} en estas células produce una reversión 35 parcial del fenotipo transformado. Estas observaciones sugieren que la fosforilación en tirosina aberrante de p130^{cas} es una característica común de células transformadas por varios mecanismos dispares y que p130^{cas} puede requerirse para la manifestación completa del estado transformado. Por lo tanto, la desfosforilación de p130^{cas} por PTP-PEST es un mecanismo regulador potencialmente importante para contrarrestar los efectos de transformación de diversos 40 oncogenes.

Se ha observado la fosforilación en tirosina de p130^{cas} 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 45 condiciones, usando un anticuerpo (4F4) que reconoce predominantemente p130^{cas} 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^{cas} 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^{cas} no fosforilada es el citosol (Sakai *et al.*, *EMBO J.* **13**: 3748-3756 (1994)). Además, en fibroblastos transformados con 50 crk, sólo se detecta p130^{cas} 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^{cas} están asociados con la redistribución de la proteína desde el citosol a las adhesiones focales.

Es plausible que la redistribución de p130^{cas} fosforilada en tirosina pueda dirigirse por su asociación con FAK, 55 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^{cas} 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^{cas} en 60 sucesos de señalización en esta región de la célula. Probablemente, una consecuencia de la redistribución de p130^{cas} fosforilada en tirosina es que, además de la localización de p130^{cas} 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^{cas} sea prevenir 65 la fosforilación en tirosina inapropiada de las reservas citosólicas de p130^{cas}, previniendo de esta manera la formación de complejos de señalización ensamblados alrededor de p130^{cas} fosforilada en tirosina en localizaciones celulares inapropiadas.

ES 2 281 915 T3

Varios factores mitogénicos estimulan de manera potente la fosforilación en tirosina de p130^{cas}. 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^{cas} en la regulación de rutas de señalización mitogénicas, que supuestamente implican el ensamblaje de complejos de señalización basados en p130^{cas} 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^{cas} 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.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 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,

10 15 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 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.

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

25 (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 γ ; MKP-1; DEP-1; PTP μ ; PTPX1; PTPX10; y PTPH1; o

30 (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.

35 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.

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

45 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;

50 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.

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

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

65 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.

70 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:

75 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;

80 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;

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

90 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.

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

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

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.

35 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^{cas}; y/o

50 d) un método para reducir los efectos de transformación de oncogenes asociados con la fosforilación de p130^{cas} 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^{cas}, reduciendo los efectos de transformación de oncogenes asociados con la fosforilación de p130^{cas}; y/o

55 e) el tratamiento, terapia, diagnóstico o profilaxis de cánceres, incluyendo cánceres asociados con la fosforilación de p130^{cas}; y/o

f) la reducción de la formación de complejos de señalización asociados con p130^{cas}, y/o

60 g) un método para reducir la formación de complejos de señalización asociados con p130^{cas} 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^{cas}, reduciendo la formación de complejos de señalización asociados con p130^{cas} 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

ES 2 281 915 T3

- 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^{cas}, 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^{cas}, regulando de esta manera negativamente los efectos corriente abajo de p130^{cas} y reduciendo los efectos de transformación de oncogenes asociados con la fosforilación de p130^{cas}; o
- 20 (c) reduce la formación de complejos de señalización asociados con p130^{cas}, 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^{cas}, regulando de esta manera negativamente los efectos corriente abajo de p130^{cas} y reduciendo la formación de complejos de señalización asociados con p130^{cas}; 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^{cas}, 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 γ , MKP-1, DEP-1, PTP μ , 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

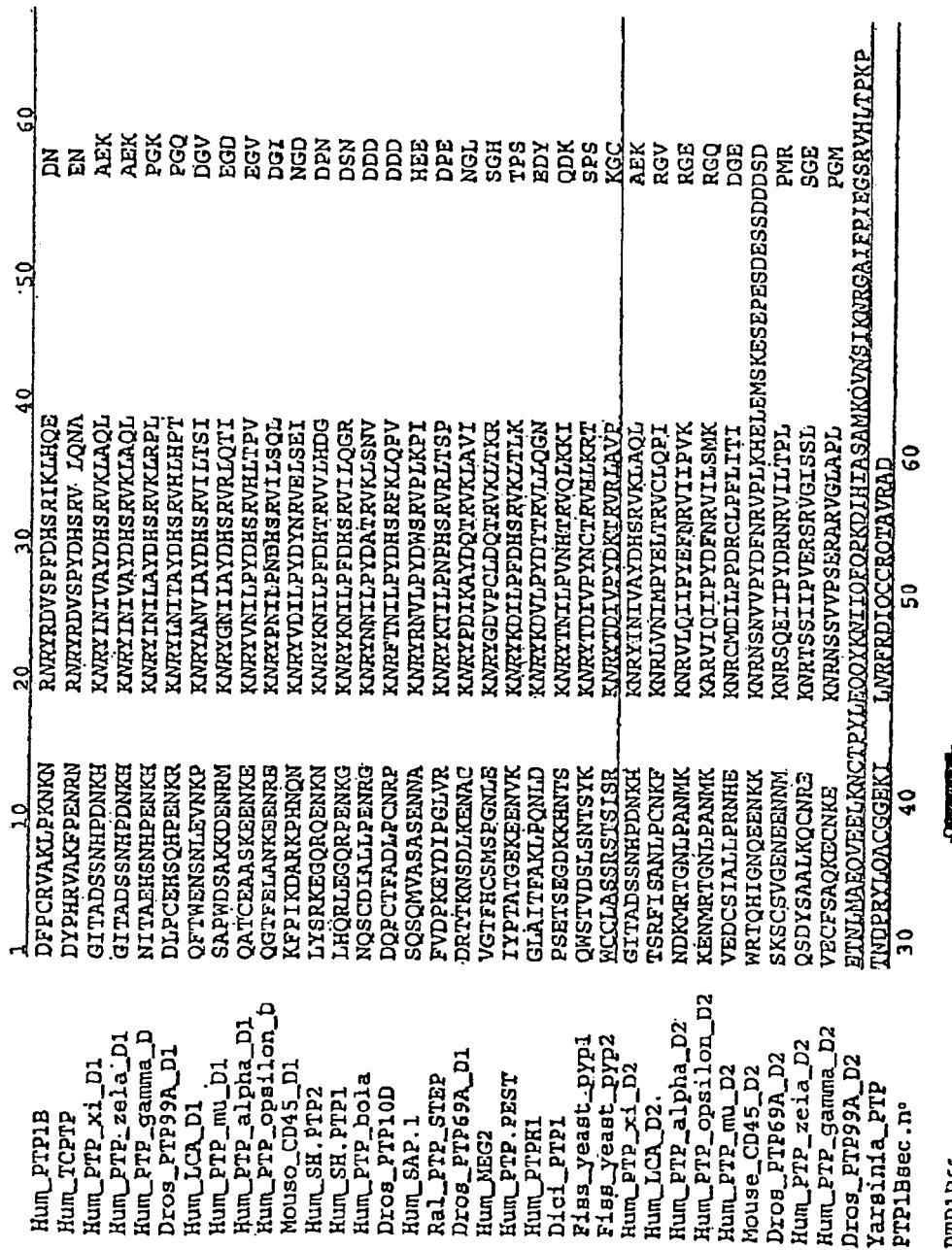
50

55

60

65

ES 2 281 915 T3



PTP1B66

▲▲▲ Figura 1a

ES 2 281 915 T3

		70	80	90	100	110	120	130
Hum_PTP1B	DYNASLI	KNEEAQRSYLTqGPLPNTCGHFWEMWE						
Hum_TCPTP	DYNASLY	DIEEAQRSYLTqGPLPNTCCHFWMVWQ						
Hum_PTP_xi_D1	DGKLTDYLANYV	DGYN RPKEYTAAQGPLKSTAEDFWRMWE						
Hum_PTP_zeta_D1	DGKLTDYLANYV	DGXN RPKEYTAAQGPLKSTAEDFWRMWE						
Hum_PTP_gamma_D	DSEKSDYLMNYV	DGYN KARAYTAAQGPLKSTEDFWRMWE						
Dros_PTP99A_D1	XQNL DYNANFI	DGXQ KGHAFIGTqGPLDPTDFCFWRMWE						
Hum_LCA_D1	PGS DYNASYI	DGYR KQNAFLTAQGPLETGDFWRMWE						
Hum_PTP_mu_D1	TNS DYLASYI	DGYR RPNHYLIAQTQPMQETIDFWRMWE						
Hum_PTP_alpha_D1	PDS DYLASYI	NGYQ EKNAFLIAAQGPLKGETYNDFWRMWE						
Hum_PTP_omega_D	PCS DYLASYI	DGYK EKNAFLIAAQGPLKGETYNDFWRMWE						
Mouse_CD45_D1	AGS TYINASYI	DGFK EPRYLAQGPQDTEVDFFWRMWE						
Hum_SH_PTP2	EPV SDYIAMIIMPEFETKCNNSK	PKSYLTqGCLQNTDFWRMWE						
Hum_SH_PTP1	IPG SDYIANYVIRNQLL	GPDB NAKTYIASQGCLERATDFWRMWE						
Hum_PTP_bola	PCS DYLASYI	PGNN FRREXIVTqGPLPCTKODFWRMWE						
Dros_PTP10D	EGL DYLANYV	PGHN SPREFIVTqGPLHSLSTRDDFWRMWE						
Hum_SAP_1	PGS DYLASFV	PGLN SPQEFLATqGPLPQTVGDFWRMWE						
Ral_PTP_STEP	DPL SSYIANYV	RGYNGBEKVIAATqGPIVSTVDFWRMWE						
Dros_PTP69A_D1	QTT DYLANYV	IGYK ERKFCFIAQGPMEESTIDFWRMWE						
Hum_MEG2	TOT DYLASFV	DGYK QKNAIXGTqGPPLNETYRDFWRMWE						
Hum_PTP_PEST	QDS DYLANYV	KGYI GPKAVATqGPPLANTVDFWRMWE						
Hum_PTPH1	INA SYVMEI	PAAN LYNKIATqGPLPHICQFRQYWD						
Dici_PTP1	EGL DYLANYV	DGYA PKQFCITqGPLNNTADFWRMWE						
Fiss_yeast_PYP1	EL DYLASFV	KTETSNYTACQGSISRSRSTDFWRMWE						
Fiss_yeast_PYP2	S DYLASHI	DVGNNKKLIAACCQPKPSTLDFWRMWE						
Hum_PTP_xi_D2	DGKLTDYLANYV	DGYN RPKEYTAAQGPLKSTAEDFWRMWE						
Hum_LCA_D2	EGL DYLASFV	DGYR QQKAYLATqGPLAESTEDFWRMWE						
Hum_PTP_alpha_D2	ENT DYLASFV	DGYR QKDSYIASQGPALSTEIDFWRMWE						
Hum_PTP_omega_D2	EYT DYLASFV	DGYR "QDQYFATqGPALHTEDEFWRMWE						
Hum_PTP_mu_D2	SS NYIVALMA	DSXK QPSAFIVTqGPPLNTYDFWRMWE						
Mouse_CD45_D2	SEETSKYINASFY	MSYW KPEMIAQGPPLKETIGDFWRMWE						
Dros_PTP69A_D2	ENS TYINASFI	EGYD NSETETIAQDPFENTIGDFWRMWE						
Hum_PTP_zeta_D2	GT DYLASYI	MGYY QSNEF LITQHPLHHTIKDFWRMWE						
Hum_PTP_gamma_D2	KGT DYLASYI	MGYX RSNEF LITQHPLHHTIKDFWRMWE						
Dros_PTP99A_D2	GEDGSDYINASML	HGER RARDEFVTCHPMAHTIKDFWRMWE						
Yarsinia_PTP	NYIOUG	NIRTIALCXPOLOLESHERMIAE NETPVAYASSS						
PTP1Bsec.nº		70	80	90	100	110		



Figura 1B

	140	150	160	170	180	190	200
Hum_PTP1B	EKGSLKCA	QYWPOKEEKKM	IPEDTINLKLTLISEDIKSYTYVLE				NLTQETREI
Hum_TCTPTP	EKESVKCA	QYWPT DDQEM	LPKETTGFSVQLLSEDVKSYTYVLE				NINSGETRTI
Hum_PTP_xi_D1	EKGRRKCD	QYWPP ADGSE	EYGN FLVTQKSQVQLAYYTFTLRLNTKIKGG				SOKGRPSGRVV
Hum_PTP_zeta_D1	EKGRRKCD	QYWPP ADGSE	EYGN FLVTQKSQVQLAYYTFTLRLNTKIKGG				SOKGRPSGRVV
Hum_PTP_gamma_D	EKGRRKCD	QYWPP TENSE	EYGN IIVTLLSTKIHACTYVSIRNTKVKGOKGNPKGRQNERVV				
Dros_PTP99A_D1	ERGRRKCD	MYWP KDGVE	TGIV IQVCLIEEVMSITYTVLQKHLKLKK				KKQCNTKEKLV
Hum_LCA_D1	EKSRRVKCD	QYWPP ARGTE	TGCL IQVTLDDVELATYTFEALH				KSGSSEKREL
Hum_PTP_mu_D1	EYGRVKCC	KYWP DDTE	IYKD IKVLIETELLAEYVIAFE				KRGVHEIREI
Hum_PTP_alpha_D1	EKECKCA	QYWP DQGCW	TYGN IRVSVEDYTFLVLDYTFCIQQVG				DMTNRKPQRLL
Hum_PTP_omega_D	ERKEEKCH	QYWP DQGCW	TYGN IRYCVEDCVVLVDYTFCIQQVG				PDGCKAPRLV
Mouse_CD45_D1	EGRNPKCA	EYWPMSMEGTR	AFKD IIVTTINDHKRCPDYILLNVAH				KKEKATGREV
Hum_SH_PTP2	ERGSKCKV	KYWD EYALK	EYGV MRVRVNKESEAHDYTLKLKS				VGQGNTERTV
Hum_SH_PTP1	ERGRNPKV	PYWP VGMQR	AYGP YSUTNGCENDHTEYKLUQSP				LDNGDLIREI
Hum_PTP_bola	EKGRRKCD	HYWPQ DQDSL	YFGD LILQMLSESVLPEWTIFKICG				EELQDAHRLI
Dros_PTP10D	EKGREKCD	QYWPW DTVPV	FYGD IKYQILNDSHYADWVMFMC				RGSEORIL
Hum_SAP_1	EAGRVKCE	HYWPL DSQPC	THGH LRVTLYGEEMVNWTULLL				QVEEQKILSV
Ral_PTP_STEP	EMN_EKCT	EYWP EEQV	VDIG VEITVQKVLIHTEDYRLISLR				RGTEERGL
Dros_PTP69A_D1	EYNKAKCA	KYWPZEKVFDTK	QFGD ILYVPAQERKTGDIYELNVSKNKA				VGEEDRQI
Hum_MEG2	EGGRKCG	QYWPLEKDSRI	REGF LITVNLGVENNMHYKCLEIH				NTTEROKROV
Hum_PTP_PEST	EMGRKCKH	RYWPLYGEDCE	TEAP FKISCDQEARTDFYLLE				FQNESRRL
Hum_PTPH1	ERGRTKCH	QYWPD PPDVW	NGGG NHQCSQEDCTIAYVSMILV				NTQTGEEHTV
Dici_PTP1	ENCRKCD	RYWPEQIGGEQFSIYGMNVEGTQY	PHIQCSQEDCTIAYVSMILV				LTFEGETRDI
Fiss_Yeast_pyp1	EAGREMCT	AYWPSNGIGDK	QVYGDYCYVKQISEEENDNSRFILFELQ				NANFPSPVKKV
Fiss_Yeast_pyp2	EKGSEKCS	OYWEDNKDHACLEGSS	IARISSYQICYLEEDLKVKHLRL				DKPNPGPRKXJ
Hum_PTP_xi_D2	EKGRRKCD	QYWP ADGSE	EYGN FLVTQKSQVQLAYYTFTLRLNTKIKGG				SOKGRPSGRVV
Hum_LCA_D2	EMGREKCH	QYWP AERSA	RYQY FVTDPMAEYNMPQYILFKVT				DARDGQSRTI
Hum_PTP_alpha_D2	ERGQEKCA	QYWP SDGLV	SYGD IIVTLLKKEEECESYTVLLVT				NTRENKSRQI
Hum_PTP_omega_D2	EREQDKCY	QYWP TEGSV	THGE ITIEIIONDTLSEASISIFLVTLNQP				AROEEQVRVV
Hum_PTP_mu_D2	PA_QLCP	QYWP ENGVH	RHGP IQVEFVSADLEDILISFRYNA				ARPQDGYRMW
Mouse_CD45_D2	NDQDEVCA	QYWP GECKQ	TYGD MEVEMKDINTRASAYTLFELL				HSKRKEPRTV
Dros_PTP69A_D2	D_GPRKCP	RYWA DDEVQ	YDH ILVVCYHESCPYITFTV				NCKIDDILKV
Hum_PTP_zeta_D2	NMAEDEFV	YWPNKDEPINCESFKVTLMAFEHKCLSNEEKLILFEL					ATQDDYKLEV
Hum_PTP_gamma_D2	SIAEDEFV	YWPNSRESMCEAFTVTLISKORCLSLNEQQLLFILE					ATQDDYKLEV
Dros_PTP99A_D2	D_INFA_OFWPDEAIPLESQH						SIQDDYKLEV
Yarsinia_PTP	EIANOREGMPDYER	QSGT	YGSITVESKNTQOQUGDGINMMYLTII				REAGQKTSV
PTP1Bsec_n°				140	150	160	

PTP1B66.



Figura 1C
β6 β1

ES 2 281 915 T3

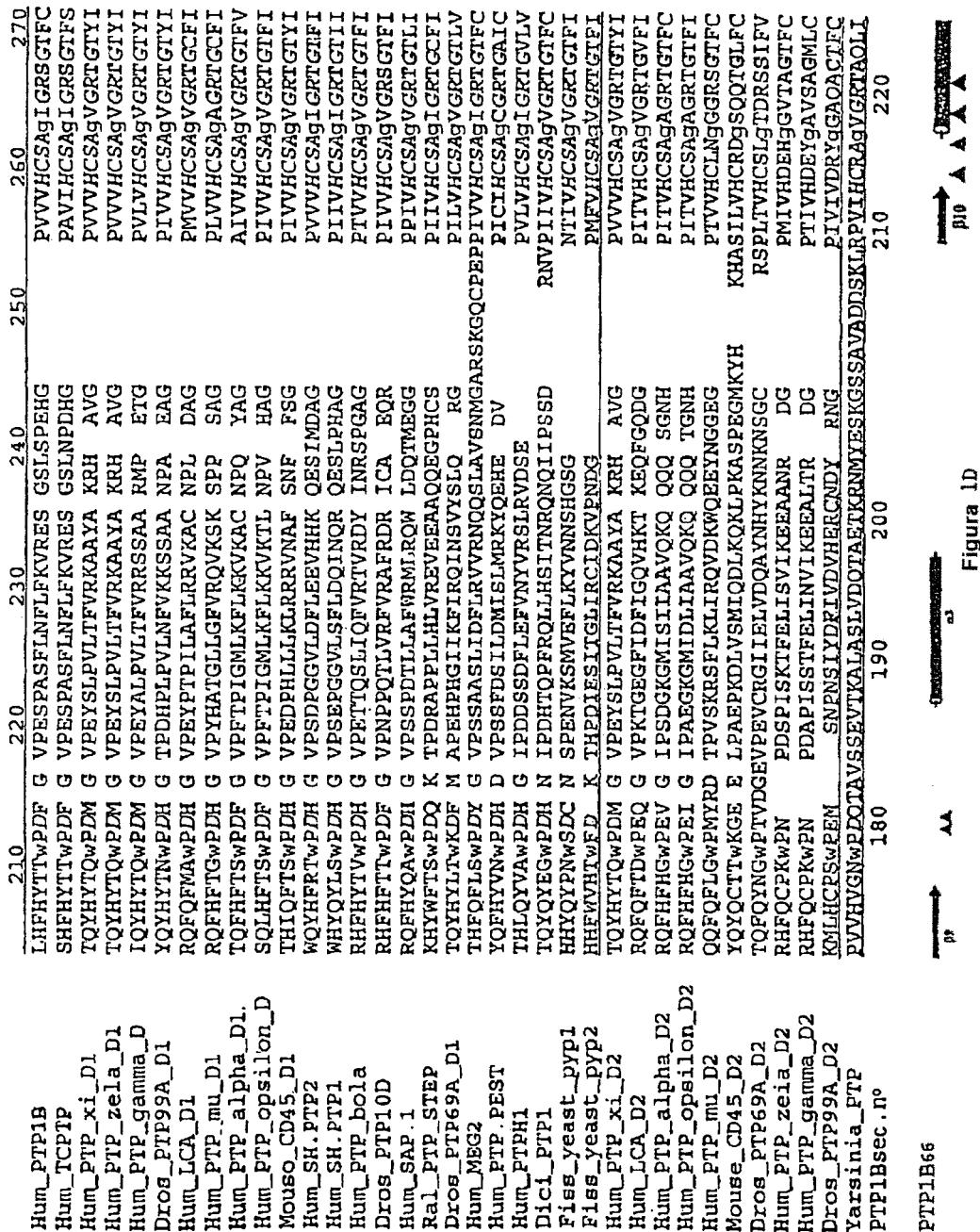


Figura 1D

ES 2 281 915 T3

	280	290	300	310	320	330	340
Hum_PTP1B	KAUTCLLJMDKR	KDPSSVDI	KKVLLERMRKFRMG	LIGTADQRLRFSYLAVIEGAKETIMGD			
Hum_TCPTP	LYDTCLVIMEKG	DD	INI	KQVILJNMRKRYRMG	LIGTPDQLRFSYMALEGAKCIIKGDS		
Hum_PTP_xi_D1	VLDLSMLQQIQHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRNY	LYQTEEQYVFHDTLVEAIIISKETEV		
Hum_PTP_zeta_D1	VLDLSMLQQIQHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRNY	LYQTEEQYVFHDTLVEAIIISKETEV		
Hum_PTP_gamma_D	VLDLSMLQQIKDK	ST	VNV	LGFLKHRSQRNY	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV		
Dros_PTP99A_D1	VLDAMLKQIQQK	NI	VNV	YGHVTCMRSQRNY	LYQTEEQYFLHDALVEAIIASGETNL		
Hum_LCA_D1	VLDAMLERMKHE	KT	VDI	YNCVRELRSRRVN	LYQTEQYFLHDALVEAIIATCGHTEV		
Hum_PTP_mu_D1	VLDIMLDMAERE	GV	VDI	YGFVSRRAQRCQ	LYQTEEQYFLHDALVEAIIACLGDTSV		
Hum_PTP_alpha_D1	VLDAMLDMMWTE	RK	VDV	YQDMQXVFLYQALLEHYLYGDTIEL			
Hum_PTP_omega_D	VIDAMMAMMHAE	QK	VDV	REFVSRRIQNRPQ	LYQTEEQYFLHDALVEAIIYLYGDTIEL		
Mouso_CD45_D1	GIDAMMLEAE	HK	VDV	YGYVVKLRRQRCL	LYQTEAQYFLHDALVEYNOFGETEV		
Hum_SH_PTP1	VIDLIDIREK	GWDCDIDI	PKTIONMRSQRSG	LYQTEAQYFLHDALVEAIIQHLYLETQRR			
Hum_PTP_beta1a	VIDMLMENISTK	GLJDCDIDI	QKTIONMRAQRSG	LYQTEAQYFLHDALVEAIIAQFIEETKKL			
Dros_PTP10D	ALDRFLQQDSK	DS	VDI	YGAVALDLRHRVH	LYQTECOVYFLHQCVRDVLARKLRS		
Hum_SAP_1	TLDRLLQQINTS	DI	VDI	FGIVYAMRKERVW	LYQTEEQYCTHQCLAVLEGKNTIVGP		
Rad_PTP_STEP	ALDVLARLOQSE	GL	LGP	FSEVRKMRRESRPL	LYQTEAQYFLHQCTCGSSNSQPRPQPR		
Dros_PTP69A_D1	ATSIICQQLRRE	GV	VDI	LKTTCOLQRDRGG	LYQTEAQYFLHQCTCGSSNSQPRPQPR		
Hum_MEG2	ALDSLICQLEEE	DS	VS1	YNTVCDLHQRNF	LYQSLKQFLHQCTCGSSNSQPRPQPR		
Hum_PTP_PEST	SLDICLQAQEL	GT	LNV	FTVTSRMRQTQAF	LYQTEAQYFLHQCTCGSSNSQPRPQPR		
Hum_PTPHI	AIDYTWNLLKAG	KIPEEFNV	FNLIQQMERTQRHS	LYQTEAQYFLHQCTCGSSNSQPRPQPR			
TMETANCLTERN	TMETANCLTERN	LP	TYP	LDIVRKMRDQRAM	LYQTEAQYFLHQCTCGSSNSQPRPQPR		
Dici_PTP1	TAVIMMKCLDHYFKOLDYNSRIDFNL	FSIVLKLREORG	MVCOLEOYFLCYKTLDEIYHRINC				
Fiss_yeast_Pyp1	VLDLTIRFPESKLSGFPNSVADSSDVFQYDHLRKQRWK	MVQFTTDFKYYVD	LIDSL				
Fiss_yeast_Pyp2	AVDQILQYQPKNILEK	TINLIEDSKDEIENCYNLSRSQRMK	MVONEEOFKELYD	YVDYL			
Hum_LCA_D2	VLDLSMLQQIQHE	GT	VNI	FGFLKHRSQRNY	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV		
Hum_LCA_D2	ALSTIVLERYAE	GV	VDM	FOTVKTLTRORPA	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV		
Hum_PTP_alpha_D2	ALSNLTERVKA	GI	LDV	FOVKSRLQRPH	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV		
Hum_PTP_omega_D2	ALSNLTERVKA	GL	LDV	FOAVKSRLQRPH	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV		
Hum_PTP_mu_D2	ALSIVCEMLRQ	RT	VDV	FOAVKTLRNNPN	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV		
Mouse_CD45_D2	ALFNLLESAETE	DV	VDV	FOVVKSLRKARP	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV		
Dros_PTP69A_D2	AMCILYQHURLE	KC	VDI	CATTTRKLRQRTG	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV		
Hum_PTP_zeta_D2	ALTTLMHOLEKE	NS	VDV	YQVAKMILMMPG	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV		
Hum_PTP_gamma_D2	ALTTLSQOLENE	NA	VDV	FQVARMINLMPG	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV		
Dros_PTP99A_D2	AISSIALEMNC	ST	ANV	XOYAKLYXANIKRG	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV		
Yarsinia_PTP	GAMCMANDSRNSQ	LSV	EDMVSMQRYQNG	LYQTEEQYFLHDALVEAIIISKETEV			
PTP1Bsec_np	230	240	250	260	270	280	

Figura 1E a5
a4 a5 a6

PTP1B66

V_{max} y K_m de Mutantes de PTP1B de 37 kDa Hacia RCML

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

Figura 2

ES 2 281 915 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Harbor, Cold Spring
 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Proteína Tirosina Fosfatasa 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
 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 02173
20 (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:
45 (A) TELÉFONO: (781) 861-6240
 (B) TELEFAX: (781) 861-9540

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ. ID NO:1:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (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

Arg Tyr Arg Asp Val Ser Pro Phe Asp His Ser Arg Ile Lys Leu His
5 20 25 30

Gln Glu Asp Asn Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Leu Ile Lys Met Glu Glu
10 35 40 45

Ala Gln Arg Ser Tyr Ile Leu Thr Gln Gly Pro Leu Pro Asn Thr Cys
15 50 55 60

Gly His Phe Trp Glu Met Val Trp Glu Gln Lys Ser Arg Gly Val Val
20 65 70 75 80

Met Leu Asn Arg Val Met Glu Lys Gly Ser Leu Lys Cys Ala Gln Tyr
25 85 90 95

Trp Pro Gln Lys Glu Glu Lys Glu Met Ile Phe Glu Asp Thr Asn Leu
30 100 105 110

Lys Leu Thr Leu Ile Ser Glu Asp Ile Lys Ser Tyr Tyr Thr Val Leu
35 115 120 125

Glu Leu Glu Asn Leu Thr Thr Gln Glu Thr Arg Glu Ile Leu His Phe
40 130 135 140

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

Phe Leu Asn Phe Leu Phe Lys Val Arg Glu Ser Gly Ser Leu Ser Pro
50 165 170 175

Glu His Gly Pro Val Val His Cys Ser Ala Gly Ile Gly Arg Ser
55 180 185 190

Gly Thr Phe Cys
60 195

(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:

ES 2 281 915 T3

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

Gln Arg Ser Tyr Ile Leu Thr Gln Gly Pro Leu Pro Asn Thr Cys Cys
50 55 60

15 His Phe Trp Leu Met Val Trp Gln Gln Lys Thr Lys Ala Val Val Met
65 70 75 80

20 Leu Asn Arg Ile Val Glu Lys Glu Ser Val Lys Cys Ala Gln Tyr Trp
85 90 95

25 Pro Thr Asp Asp Gln Glu Met Leu Phe Lys Glu Thr Gly Phe Ser Val
100 105 110

Lys Leu Leu Ser Glu Asp Val Lys Ser Tyr Tyr Thr Val Leu Gln Leu
115 120 125

30 Glu Asn Ile Asn Ser Gly Glu Thr Arg Thr Ile Ser His Phe His Tyr
130 135 140

35 Thr Thr Trp Pro Asp Phe Gly Val Pro Glu Ser Pro Ala Ser Phe Leu
145 150 155 160

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

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

Phe Ser

45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

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

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

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

60

65

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

Arg Tyr Ile Asn Ile Val Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Lys Leu Ala
5 20 25 30

Gln Leu Ala Glu Lys Asp Gly Lys Leu Thr Asp Tyr Ile Asn Ala Asn
10 35 40 45

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
15 65 70 75 80

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
20 100 105 110

Gly Asn Phe Leu Val Thr Gln Lys Ser Val Gln Val Leu Ala Tyr Tyr
25 115 120 125

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
30 145 150 155 160

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

Arg Lys Ala Ala Tyr Ala Lys Arg His Ala Val Gly Pro Val Val Val
35 180 185 190

His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Tyr Ile Val Leu Asp
40 195 200 205

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

Phe Leu Lys His Ile Arg Ser Gln Arg Asn Tyr Leu Val Gln Thr Glu
45 225 230 235 240

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

Lys Glu Thr Glu Val
50 260

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

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

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	
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	80
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	160
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	240
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:

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

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:

ES 2 281 915 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 250 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

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

Gln	Phe	Thr	Trp	Glu	Asn	Ser	Asn	Leu	Glu	Val	Asn	Lys	Pro	Lys	Asn	
1				5					10			15				
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					
Asp	Gly	Tyr	Arg	Lys	Gln	Asn	Ala	Tyr	Ile	Ala	Thr	Gln	Gly	Pro	Leu	
	50				55				60							
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					
Cys	Asp	Gln	Tyr	Trp	Pro	Ala	Arg	Gly	Thr	Glu	Thr	Cys	Gly	Leu	Ile	
	100				105					110						
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							
Gln	Phe	Met	Ala	Trp	Pro	Asp	His	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Pro	Thr	Pro	
	145				150				155		160					
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							
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					
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:

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

ES 2 281 915 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 253 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

15 (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 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 Lys Leu 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

55 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

65 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

25 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
 30 65 70 75 80

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

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

40 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

45 Gln Gly Asn Thr Glu Arg Thr Val Trp Gln Tyr His Phe Arg Thr Trp

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

Glu Glu Val His His Lys Gln Glu Ser Ile Met Asp Ala Gly Pro Val
180 185 186

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

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

Ala Ser Gln Gly Cys Leu Glu Ala Thr Val Asn Asp Phe Trp Gln Met
50 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

Leu Ile Arg Glu Ile Trp His Tyr Gln Tyr Leu Ser Trp Pro Asp His
10 145 150 155 160

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

Cys Ser Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Thr Ile Ile Val Ile Asp Met
20 195 200 205

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

Thr Glu Ala Gln Tyr Lys Phe Ile Tyr Val Ala Ile Ala Gln Phe Ile
30 245 250 255

Glu Thr Thr Lys Lys Lys Leu
35 260

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:14:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 254 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CLASE DE CADENA: sencilla
45 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

50 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

60

65

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:15:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 251 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CLASE DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (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
5	Arg Phe Thr Asn Ile Leu Pro Tyr Asp His Ser Arg Phe Lys Leu Gln	
	20	25
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

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 243 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

ES 2 281 915 T3

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (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

15 Ser Pro Asp Pro Glu Asp Pro Leu Ser Ser Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr
35 40 45

20 Ile Arg Gly Tyr Asn Gly Glu Glu Lys Val Tyr Ile Ala Thr Gln Gly
50 55 60

25 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

30 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

35 Ser Leu Arg Arg Gly Thr Glu Glu Arg Gly Leu Lys His Tyr Trp Phe
130 135 140

40 Thr Ser Trp Pro Asp Gln Lys Thr Pro Asp Arg Ala Pro Pro Leu Leu
145 150 155 160

45 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

50 Cys Phe Ile Ala Thr Ser Ile Cys Cys Gln Gln Leu Arg Arg Glu Gly
195 200 205

55 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

60 Ser Leu Tyr

65 (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	
25	Glu Ser Thr Ile Asp Asp Phe Trp Arg Met Ile Trp Glu Gln His Leu			
	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 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 Asp Ser Val Ser Ile Tyr Asn Thr Val Cys Asp			
	210	215	220	
	Leu Arg His Gln Arg Asn Phe Leu Val Gln Ser Leu Lys Gln Tyr Ile			
60		225	230	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:

- 5 (A) LONGITUD: 258 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CLASE DE CADENA: sencilla
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

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

15 Val Gly Thr Phe His Cys Ser Met Ser Pro Gly Asn Leu Glu Lys Asn
1 5 10 15

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

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

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

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

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

45 Cys Gly Gln Tyr Trp Pro Leu Glu Lys Asp Ser Arg Ile Arg Phe Gly
100 105 110

50 Phe Leu Thr Val Thr Asn Leu Gly Val Glu Asn Met Asn His Tyr Lys
115 120 125

55 Lys Leu Glu Ile His Asn Thr Glu Glu Arg Gln Lys Arg Gln Val Thr
130 135 140

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

65 Ala Ser Leu Ile Asp Phe Leu Arg Val Val Arg Asn Gln Gln Ser Leu
165 170 175

70 Ala Val Ser Asn Met Gly Ala Arg Ser Lys Gly Gln Cys Pro Glu Pro
180 185 190

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

80 Cys Ser Leu Asp Ile Cys Leu Ala Gln Leu Glu Glu Leu Gly Thr Leu
210 215 220

85 Asn Val Phe Gln Thr Val Ser Arg Met Arg Thr Gln Arg Ala Phe Ser
225 230 235 240

90 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:

- 65 (A) LONGITUD: 253 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:20:

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

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:

5 (A) LONGITUD: 277 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

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

15	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
20	Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile	35	40		45
25	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
30	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
35	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	
40	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
45	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
50	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
55	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
60	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:

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

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 250 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CLASE DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

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

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

20 Arg Tyr Thr Asp Ile Val Pro Tyr Asp Lys Thr Arg Val Arg Leu Ala
20 25 30

25 Val Pro Lys Gly Cys Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser His Ile Asp Val
35 40 45

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

35 Leu Asp Phe Trp Glu Met Val Trp His Asn Ser Gly Thr Asn Gly Val
65 70 75 80

40 Ile Val Met Leu Thr Asn Leu Tyr Glu Ala Gly Ser Glu Lys Cys Ser
85 90 95

45 Gln Tyr Trp Pro Asp Asn Lys Asp His Ala Leu Cys Leu Glu Gly Gly
100 105 110

50 Leu Arg Ile Ser Val Gln Lys Tyr Glu Thr Phe Glu Asp Leu Lys Val
115 120 125

55 His Leu Phe Arg Leu Asp Lys Pro Asn Gly Pro Pro Lys Tyr Ile His
130 135 140

60 His Phe Trp Val His Thr Trp Phe Asp Lys Thr His Pro Asp Ile Glu
145 150 155 160

65 Ser Ile Thr Gly Leu Ile Arg Cys Ile Asp Lys Val Pro Asn Asp Gly
165 170 175

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

75 Ile Ala Val Asp Gln Ile Leu Gln Val Pro Lys Asn Ile Leu Pro Lys
195 200 205

80 Thr Thr Asn Leu Glu Asp Ser Lys Asp Phe Ile Phe Asn Cys Val Asn
210 215 220

85 Ser Leu Arg Ser Gln Arg Met Lys Met Val Gln Asn Phe Glu Gln Phe
225 230 235 240

90 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: SEO 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
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 Gin 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 tyi thi val sed sed val thi ask thi arg old ask sys ser arg
165 170 175

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:

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

ES 2 281 915 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 277 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

10 (C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

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

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

195 200 205

Arg Ser Glu Lys Cys Val Asp Ile Cys Ala Thr Thr Arg Lys Leu Arg
210 215 220

Ser Gln Arg Thr Gly Ser Ile Asp Ser Tyr Ala Gln Tyr Glu Thr Ser
225 230 235 240

245

ES 2 281 915 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 252 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

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

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

65 (A) LONGITUD: 252 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: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	
25	Gly Tyr Tyr Arg Ser Asn Glu Phe Ile Ile Thr Gln His Pro Leu Pro			
	50	55	60	
30	His Thr Thr Lys Asp Phe Trp Arg Met Ile Trp Asp His Asn Ala Gln			
	65	70	75	80
35	Ile Ile Val Met Leu Pro Asp Asn Gln Ser Leu Ala Glu Asp Glu Phe			
	85	90	95	
40	Val Tyr Trp Pro Ser Arg Glu Glu Ser Met Asn Cys Glu Ala Phe Thr			
	100	105	110	
45	Val Thr Leu Ile Ser Lys Asp Arg Leu Cys Leu Ser Asn Glu Glu Gln			
	115	120	125	
50	Ile Ile Ile Phe Ile Leu Glu Ala Thr Gln Asp Asp Tyr Val Leu Glu			
	130	135	140	
55	Val Arg His Phe Gln Cys Pro Lys Trp Pro Asn Pro Asp Ala Pro Ile			
	145	150	155	160
60	Ser Ser Thr Phe Glu Leu Ile Asn Val Ile Lys Glu Glu Ala Leu Thr			
	165	170	175	
65	Arg Asp Gly Pro Thr Ile Val His Asp Glu Tyr Gly Ala Val Ser Ala			
	180	185	190	
70	Gly Met Leu Cys Ala Leu Thr Thr Leu Ser Gln Gln Leu Glu Asn Glu			
	195	200	205	
75	Asn Ala Val Asp Val Phe Gln Val Ala Lys Met Ile Asn Leu Met Arg			
	210	215	220	
80	Pro Gly Val Phe Thr Asp Ile Glu Gln Tyr Gln Phe Ile Tyr Lys Ala			
	225	230	235	240
85	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: line

- (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

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

ES 2 281 915 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:36:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) MOLÉCULA TIPO: péptido

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

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

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65