



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 814**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01970886 .6**
86 Fecha de presentación : **13.09.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1351703**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2003**

54 Título: **Método para tratar la inflamación.**

30 Prioridad: **15.09.2000 US 233305 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **ZymoGenetics, Inc.**
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102, US

72 Inventor/es: **Chandrasekher, Yasmin, A. y**
Jaspers, Stephen, R.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 267 814 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para tratar la inflamación.

5 **Antecedentes de la invención**

La inflamación es normalmente una respuesta protectora localizada a un trauma o una invasión microbiana que destruye, diluye o cierra el paso al agente lesivo y al tejido lesionado. Se caracteriza en la forma aguda por los signos clásicos de dolor, calor, enrojecimiento, hinchamiento y pérdida de función. Microscópicamente, implica una compleja serie de episodios, incluyendo dilatación de las arteriolas, los capilares y las vénulas, con permeabilidad y flujo sanguíneo incrementados, exudación de fluidos, incluyendo proteínas plasmáticas, y migración de leucocitos al área de inflamación.

Las enfermedades caracterizadas por inflamación son causas significativas de morbilidad y mortalidad en seres humanos. Comúnmente, la inflamación se produce como una respuesta defensiva a la invasión del huésped por material extraño, particularmente microbiano. Las respuestas al trauma mecánico, las toxinas y la neoplasia también pueden dar como resultado reacciones de inflamación. La acumulación y la activación subsiguiente de leucocitos son episodios principales en la patogénesis de la mayoría de las formas de inflamación. Las deficiencias de la inflamación comprometen al huésped. La inflamación excesiva provocada por un reconocimiento anormal de tejido del huésped como extraño o la prolongación del proceso inflamatorio pueden conducir a enfermedades inflamatorias tan diversas como diabetes, aterosclerosis, cataratas, lesión por reperfusión y cáncer, a síndromes posinfecciosos tales como meningitis infecciosa, fiebre reumática y a enfermedades reumáticas tales como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide. La centralidad de la respuesta inflamatoria en estos procesos de enfermedad variados hace a su regulación un elemento principal en la prevención, el control o la cura de una enfermedad humana.

Citoquinas importantes en el proceso inflamatorio son IL-19, Patente de EE.UU. N° 5.985.614, y mda7, Jiang, H. y otros, *Oncogene* 10:2477-2486 (1995).

WO 01/46261 describe un método para tratar inflamación inducida por IL-20, que comprende administrar un antagonista de IL-20.

US 5.945.511 describe un receptor de citoquina de Clase II y métodos para detectar ligandos del receptor, que promueven la proliferación y/o la diferenciación de órganos en los que se expresa el receptor.

WO 00/42189 describe proteína y ácido nucleico de IL-20, y métodos, vectores y células huésped relacionados.

US 5.985.614 describe polinucleótidos que codifican IL-19, polipéptidos de IL-19 y vectores, células huésped y métodos relacionados.

Dumoutier y otros, *J. Immunology*, (US), 1 de Octubre de 2001, Vol. 167, N° 1, Páginas 3545-3549, describen la activación de STATs por IL-19, IL-20 y mda7 a través de complejos receptores de IL-20.

Así, existe una necesidad de producir agentes que inhiban la inflamación relacionada con una o más de las proteínas relacionadas con la inflamación mencionadas anteriormente.

La presente invención cumple esta necesidad proporcionando el uso de un polipéptido comprendido por el dominio extracelular de IL-20RA y el dominio extracelular de IL-20RB en la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación, regulando a la baja IL-19, en donde dicho IL-20RA comprende una secuencia seleccionada del N° ID SEC: 39 y el N° ID SEC: 40.

Antes de presentar la invención con detalle, puede ser útil para la comprensión de la misma definir los siguientes términos.

El término “etiqueta de afinidad” se usa aquí para indicar un segmento polipeptídico que puede estar ligado a un segundo polipéptido para proporcionar la purificación o la detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para la ligazón del segundo polipéptido a un substrato. En principio, cualquier péptido o proteína para el que está disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico puede usarse como una etiqueta de afinidad. Etiquetas de afinidad incluyen una región de polihistidina, proteína A, Nilsson y otros, *EMBO J.* 4:1075, 1985; Nilsson y otros, *Methods Enzymol.* 198:3 (1991), glutationa S transferasa, Smith y Johnson, *Gene* 67:31 (1988), etiqueta de afinidad Glu-Glu, Grussenmeyer y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7952-4 (1985), sustancia P, péptido Flag™, Hopp y otros, *Biotechnology* 6:1204-1210 (1988), péptido que se une a estraptividina u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford y otros, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107 (1991). DNAs que codifican etiquetas de afinidad están disponibles de suministradores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

El término “variante alélica” se usa aquí para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutación y puede dar como resultado polimorfismo fenotípico dentro de poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambio

ES 2 267 814 T3

en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencia de aminoácidos alterada. El término variante alélica también se usa aquí para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

5 Los términos “aminoterminal” y “carboxilterminal” se usan aquí para indicar posiciones dentro de los polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia o porción particular de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia situada carboxilterminal a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está situada próxima al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

10 “Angiogénico” indica la capacidad de un compuesto para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes, actuando solo o junto con uno o más compuestos adicionales. La actividad angiogénica puede medirse como activación de células endoteliales, estimulación de secreción de proteasas por células endoteliales, migración de células endoteliales, formación de brotes de capilares y proliferación de células endoteliales.

15 El término “par complemento/anticomplemento” indica restos no idénticos que forman un par estable no asociado covalentemente bajo condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par complemento/anticomplemento. Otros pares complemento/anticomplemento ejemplares incluyen pares receptor-ligando, pares anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos de sentido/antisentido y similares. Cuando es deseable la disociación subsiguiente del par complemento/anticomplemento, el
20 par complemento/anticomplemento tiene preferiblemente una afinidad de unión de $<10^9 \text{ M}^{-1}$.

El término “complementos de una molécula polinucleotídica” es una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de bases complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia, por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria de 5' CCCGTGCAT 3'.

25 El término “cóntigo” indica un polinucleótido que tiene una extensión contigua de secuencia idéntica o complementaria con otro polinucleótido. Se dice que las secuencias contiguas se “solapan” una extensión dada de la secuencia polinucleotídica en su totalidad o a lo largo de una extensión parcial del polinucleótido. Por ejemplo, cóntigos representativos para la secuencia polinucleotídica 5'-ATGGCTTAGCTT-3' son 5'-TAGCTTgagtct-3' y 3'-gtcgacTACCGA-
30 5'.

El término “secuencia de nucleótidos degenerada” indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula polinucleotídica de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo de aminoácido
35 (es decir, los tripletes GAU y GAC codifican cada uno Asp).

El término “vector de expresión” se usa para indicar una molécula de DNA, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés conectado operablemente a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Tales segmentos adicionales incluyen secuencias promotoras y terminadoras y también pueden incluir
40 uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, etc. Los vectores de expresión se derivan generalmente de DNA plasmídico o viral o pueden contener elementos de ambos.

El término “aislado”, cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido se ha retirado de su medio genético natural y está así libre de otras secuencias de codificación extrañas o no deseadas, y está en una forma adecuada para usar dentro de sistemas de producción de proteínas manipulados genéticamente. Tales moléculas aisladas son las que se separan de su ambiente natural e incluyen clones de cDNA y genómicos. Las moléculas de DNA aisladas de la presente invención están libres de otros genes con los que habitualmente están asociadas, pero pueden incluir regiones no traducidas 5' y 3' presentes en la naturaleza tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para un experto normal en la especialidad (véase, por ejemplo, Dynan y Tijan, *Nature*
50 *316:774-78* (1985)).

Un polipéptido o una proteína “aislado” es un polipéptido o una proteína que se encuentra en una condición distinta a la de su ambiente natural, tal como separado de sangre y tejido animal. En una forma preferida, el polipéptido aislado está substancialmente libre de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal. Se prefiere proporcionar los polipéptidos en una forma altamente purificada, es decir más de 95% puros, más preferiblemente más de 99% puros. Cuando se usa en este contexto, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas alternativamente glicosiladas o derivadas.

60 El término “conectados operablemente”, cuando se refiere a segmentos de DNA, indica que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan de acuerdo con sus propósitos pretendidos, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y avanza a través del segmento de codificación hasta el terminador.

El término “ortólogo” indica un polipéptido o una proteína obtenidos a partir de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o una proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la especiación.

ES 2 267 814 T3

Los “parálogos” son proteínas distintas pero estructuralmente relacionadas elaboradas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen a través de la duplicación génica. Por ejemplo, la a-globina, la b-globina y la mioglobina son parálogos entre sí.

5 Un “polinucleótido” es un polímero de una sola hebra o de doble hebra de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas desde el extremo 5' hacia el 3'. Los polinucleótidos incluyen RNA y DNA y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan en pares de bases (abreviado “pb”), nucleótidos (“nt”) o kilobases (“kb”). Cuando el contexto lo permita, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que son de una sola hebra o de doble hebra. Cuando el término se aplica a moléculas de doble hebra, se usa para indicar longitud global y se entenderá que es equivalente al término “pares de bases”. Será reconocido por los expertos en la especialidad que las dos hebras de un polinucleótido de doble hebra pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos de las mismas pueden estar escalonados como resultado de segmentación enzimática; así, todos los nucleótidos dentro de una molécula polinucleotídica de doble hebra pueden no estar apareados. Tales extremos desapareados en general no superarán 20 nt de longitud.

Un “polipéptido” es un polímero de residuos de aminoácido enlazados por enlaces peptídicos, ya se produzcan naturalmente o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácido se denominan comúnmente “péptidos”.

El término “promotor” se usa aquí con su significado reconocido en la especialidad para indicar una porción de un gen que contiene secuencias de DNA que proporcionan la unión de RNA polimerasa y la iniciación de la transcripción. Las secuencias promotoras se encuentran comúnmente, pero no siempre, en las regiones no codificantes 5' de los genes.

Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser añadidos a una proteína por la célula en la que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen aquí en términos de sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; los substituyentes tales como grupos carbohidrato no se especifican generalmente, pero sin embargo pueden estar presentes.

El término “receptor” indica una proteína asociada a la célula que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media en el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura multidominio que comprende un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio efector intracelular que está típicamente implicado en la transducción de la señal. La unión de un ligando a un receptor da como resultado un cambio de conformación en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y otra molécula o moléculas en la célula. Esta interacción conduce a su vez a una alteración en el metabolismo de la célula. Episodios metabólicos que están conectados a interacciones receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, incrementos en la producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de lípidos de la membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser citosólicos o nucleares; monómeros (por ejemplo, receptor de hormona estimulante del tiroides, receptor β -adrenérgico) o multímeros (por ejemplo, receptor de PDGF, receptor de hormona del crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6).

El término “secuencia de señal secretora” indica una secuencia de DNA que codifica un polipéptido (un “péptido secretor”) que, como un componente de un polipéptido mayor, dirige al polipéptido mayor a través de una ruta secretora de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido mayor comúnmente se segmenta para retirar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

El término “variante de reparación” se usa aquí para indicar formas alternativas de RNA transcrito a partir de un gen. La variación por reparación surge naturalmente a través del uso de sitios de reparación alternativos dentro de una molécula de RNA transcrita, o menos comúnmente entre moléculas de RNA transcritas separadamente, y puede dar como resultado varios mRNAs transcritos a partir del mismo gen. Las variantes de reparación pueden codificar polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos alterada. El término variante de reparación también se usa aquí para indicar una proteína codificada por una variante de reparación de un mRNA transcrito a partir de un gen.

Se entenderá que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros determinados mediante métodos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis en gel) serán valores aproximados. Cuando tal valor se expresa como “alrededor de” X o “aproximadamente” X, se entenderá que el valor indicado de X será exacto hasta $\pm 10\%$.

Se ha descubierto un receptor que se une tanto a IL-19 como a mda7 y es un heterodímero comprendido por el polipéptido denominado “alfa-IL-20RA receptor de interleuquina-20” y un polipéptido denominado beta-IL-20RB receptor de interleuquina-20. El polipéptido IL-20RA, el ácido nucleico que lo codifica, los anticuerpos para IL-20RA y los métodos para producirlo se describen en Patente de EE.UU. N° 5.945.511 expedida el 31 de Agosto de 1999. Los N° ID SEC: 1-3 son los polinucleótidos y polipéptidos de IL-20RA. La secuencia extracelular madura de IL-20RA está comprendida por N° ID SEC: 3. El polipéptido IL-20RB, el ácido nucleico que lo codifica, los anticuerpos para

IL-20RB y los métodos para producirlos se describen en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US99/03735 (publicación N° WO 99/46379) presentada el 8 de Marzo de 1999. Una variante de IL-20RB (denominada en lo sucesivo aquí V-IL-20RB) se ha clonado y está definida por los N° ID SEC: 4-6, siendo el N° ID SEC: 6 el dominio extracelular.

5

La presente solicitud se dirige al uso de un polipéptido comprendido por el dominio extracelular de IL-20RA y el dominio extracelular de IL-20RB en la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación, regulando a la baja IL-19, en donde dicho IL-20RA comprende una secuencia seleccionada del N° ID SEC: 39 y el N° ID SEC: 40, o al uso de un polipéptido comprendido por el dominio extracelular de IL-20RA y el dominio extracelular de IL-20RB en la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación, neutralizando la actividad de IL-19, en donde dicho IL-20RA comprende una secuencia seleccionada del N° ID SEC: 39 y el N° ID SEC: 40, o al uso de un polipéptido comprendido por el dominio extracelular de IL-20RA y el dominio extracelular de IL-20RB en la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación, regulando a la baja IL-19, en donde dicho IL-20RB comprende una secuencia seleccionada del N° ID SEC: 41 y el N° ID SEC: 42, o al uso de un polipéptido comprendido por el dominio extracelular de IL-20RA y el dominio extracelular de IL-20RB en la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación, neutralizando la actividad de IL-19, en donde dicho IL-20RB comprende una secuencia seleccionada del N° ID SEC: 41 y el N° ID SEC: 42.

20

Preparación de un Receptor "IL-20RA/IL-20RB" Heterodímero Soluble de IL-20

25

El receptor heterodímero soluble está comprendido por el N° ID SEC: 3 (denominado aquí en lo sucesivo IL-20RA) y el dominio extracelular de IL-20RB o el dominio extracelular de una variante de IL-20RB (vIL-20RB, N° ID SEC: 4-6). Preferiblemente, el dominio extracelular del polipéptido IL-20RA y el dominio extracelular del polipéptido IL-20RB están unidos covalentemente entre sí. En una modalidad preferida, un polipéptido tiene la región constante de una cadena pesada de una inmunoglobulina fusionada a su extremo carboxi y el otro polipéptido tiene una cadena ligera constante de una inmunoglobulina (Ig) fusionada a su extremo carboxi de modo que los dos polipéptidos entran en contacto y se forma un enlace disulfuro entre las cadenas pesada y ligera para formar un heterodímero. En otro método, un conector peptídico podría estar fusionado a los dos extremos carboxi de los polipéptidos para formar un heterodímero unido covalentemente.

30

También se describe un método para producir dominios extracelulares dimerizados solubles de IL-20RA e IL-20RB, que comprende (a) introducir en una célula huésped una primera secuencia de DNA comprendida por un promotor transcripcional conectado operativamente a una primera secuencia de señal secretora seguido aguas abajo por y en el marco de lectura apropiado el DNA que codifica la porción extracelular de IL-20RA y el DNA que codifica una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina; (b) introducir en la célula huésped un segundo constructo de DNA comprendido por un promotor transcripcional conectado operablemente a una segunda señal secretora seguido aguas abajo por y en el marco de lectura apropiado una secuencia de DNA que codifica la porción extracelular de IL-20RB y una secuencia de DNA que codifica un dominio de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en C_H1, C_H2, C_H3 y C_H4; (c) hacer crecer la célula huésped en un medio de crecimiento apropiado bajo condiciones fisiológicas para permitir la secreción de una proteína de fusión heterodímera dimerizada comprendida por el dominio extracelular de IL-20RA? e IL-20RB; y (d) aislar el polipéptido dimerizado de la célula huésped. En una modalidad, la segunda secuencia de DNA codifica además una región de bisagra de la cadena pesada de la inmunoglobulina, en donde la región de bisagra está enlazada al dominio de la región constante de la cadena pesada. En otra modalidad, la segunda secuencia de DNA codifica además una región variable de inmunoglobulina enlazada aguas arriba de y en el marco de lectura apropiado con la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina.

35

También se describe un método para producir dominios extracelulares dimerizados solubles de IL-20RA e IL-20RB, que comprende (a) introducir en una célula huésped una primera secuencia de DNA comprendida por un promotor transcripcional conectado operativamente a una primera secuencia de señal secretora seguido aguas abajo por y en el marco de lectura apropiado el DNA que codifica la porción extracelular de IL-20RB y el DNA que codifica una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina; (b) introducir en la célula huésped un segundo constructo de DNA comprendido por un promotor transcripcional conectado operablemente a una segunda señal secretora seguido aguas abajo por y en el marco de lectura apropiado una secuencia de DNA que codifica la porción extracelular de IL-20RA y una secuencia de DNA que codifica un dominio de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en C_H1, C_H2, C_H3 y C_H4; (c) hacer crecer la célula huésped en un medio de crecimiento apropiado bajo condiciones fisiológicas para permitir la secreción de una proteína de fusión heterodímera dimerizada comprendida por el dominio extracelular de IL-20RA e IL-20RB; y (d) aislar el polipéptido dimerizado de la célula huésped. En una modalidad, la segunda secuencia de DNA codifica además una región de bisagra de la cadena pesada de la inmunoglobulina, en donde la región de bisagra está enlazada al dominio de la región constante de la cadena pesada. En otra modalidad, la segunda secuencia de DNA codifica además una región variable de inmunoglobulina enlazada aguas arriba de y en el marco de lectura apropiado con la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina. (Véase la Patente de EE.UU. N° 5.843.725).

65

Polinucleótidos

Generalmente, una secuencia de cDNA codifica los polipéptidos descritos aquí. Una secuencia de cDNA que codifica un polipéptido de la presente invención está comprendida por una serie de codones, estando codificado cada

ES 2 267 814 T3

residuo de aminoácido del polipéptido por un codón y estando comprendido cada codón por tres nucleótidos. Los residuos de aminoácido son codificados por sus codones respectivos como sigue.

5 La alanina (Ala) está codificada por GCA, GCC, GCG o GCT;

La cisteína (Cys) está codificada por TGC o TGT;

El ácido aspártico está codificado por GAC o GAT;

10 El ácido glutámico está codificado por GAA o GAG;

La fenilalanina (Phe) está codificada por TTC o TTT;

La glicina (Gly) está codificada por GGA, GGC, GGG o GGT;

15 La histidina (His) está codificada por CAC o CAT;

La isoleucina (Ile) está codificada por ATA, ATC o ATT;

20 La lisina (Lys) está codificada por AAA o AAG;

La leucina (Leu) está codificada por TTA, TTG, CTA, CTC, CTG o CTT;

La metionina (Met) está codificada por ATG;

25 La asparagina (Asn) está codificada por AAC o AAT;

La prolina (Pro) está codificada por CCA, CCC, CCG o CCT;

30 La glutamina (Gln) está codificada por CAA o CAG;

La arginina (Arg) está codificada por AGA, AGG, CGA, CGC, CGG o CGT;

La serina (Ser) está codificada por AGC, AGT, TCA, TCC, TCG o TCT;

35 La treonina (Thr) está codificada por ACA, ACC, ACG o ACT;

La valina (Val) está codificada por GTA, GTC, GTG o GTT;

40 El triptófano (Trp) está codificado por TGG; y

La tirosina (Tyr) está codificada por TAC o TAT.

Métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar tRNA son conocidos en la especialidad. La transcripción y la traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se llevan a cabo en un sistema libre de células que comprenda un extracto de S30 de *E. coli* y enzimas y otros reactivos disponibles comercialmente. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. Véanse, por ejemplo, Robertson y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722 (1991); Ellman y otros, *Methods Enzymol.* 202:301 (1991); Chung y otros, *Science* 259:806-809 (1993) y Chung y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10145-1019 (1993). En un segundo método, la traducción se lleva a cabo en *Xenopus oocytes* mediante microinyección de mRNA mutado y tRNAs supresores químicamente aminoacilados, Turcatti y otros, *J. Biol. Chem.* 271:19991-19998 (1996). Dentro de un tercer método, células de *E. coli* se cultivan en ausencia de un aminoácido natural que ha de reemplazarse (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido o aminoácidos no presentes en la naturaleza deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido no presente en la naturaleza se incorpora en la proteína en lugar de su homólogo natural. Véase Koide y otros, *Biochem.* 33:7470-6 (1994). Los residuos de aminoácido presentes en la naturaleza pueden convertirse en especies no presentes en la naturaleza mediante modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida al sitio para expandir adicionalmente la gama de sustituciones, Wynn y Richards, *Protein Sci.* 2:395-403 (1993).

60 Los residuos de aminoácido pueden substituirse por un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no son codificados por el código genético, aminoácidos no presentes en la naturaleza y aminoácidos no naturales.

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos usados de la presente invención pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la especialidad, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis por rastreo de alanina, Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989); Bass y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4498-502 (1991). En la última técnica, se introducen mutaciones simples de alanina en cada residuo de la molécula y las moléculas mutantes resultantes se prueban con respecto a la actividad biológica según se describe posteriormente para

identificar residuos de aminoácido que son críticos para la actividad de la molécula. Véase, además, Hilton y otros, *J. Biol. Chem.* 271:4699-708, 1996. Los sitios de interacción ligando-receptor también pueden determinarse mediante análisis físico de la estructura, según se determina mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcaje de fotoafinidad, junto con mutación de aminoácidos del sitio de contacto putativos. Véanse, por ejemplo, de Vos y otros, *Science* 255:306-12 (1992); Smith y otros, *J. Mol. Biol.* 224:899-904 (1992); Wlodaver y otros, *FEBS Lett.* 309:59-64 (1992).

Múltiples sustituciones de aminoácidos pueden realizarse y probarse usando métodos conocidos de mutagénesis y rastreo, tales como los descritos por Reidharr-Olson y Sauer, *Science* 241:53-7 (1988) o Bowie y Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-2156 (1989). Brevemente, estos autores describen métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar con respecto al polipéptido funcional y a continuación someter a secuenciación los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros métodos que pueden usarse incluyen presentación en fagos (por ejemplo, Lowman y otros, *Biochem.* 30:10832-10837 (1991); Ladner y otros, Patente de EE.UU. N° 5.223.409; Huse, Publicación WIPO WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a la región, Derbyshire y otros, *Gene* 46:145 (1986); Ner y otros, *DNA* 7:127 (1988).

Variantes del DNA y las secuencias polipeptídicas de IL-20RA e IL-20RB descritos pueden generarse a través de barajado de DNA según se describe por Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994), Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751 (1994) y la Publicación WIPO WO 97/20078. Brevemente, se generan DNAs variantes mediante recombinación homóloga *in vitro* mediante fragmentación aleatoria de un DNA parental seguido por reensamblaje usando PCR, dando como resultado mutaciones puntuales introducidas aleatoriamente. Esta técnica puede modificarse usando una familia de DNAs parentales, tales como variantes alélicas o DNAs de diferentes especies, para introducir variabilidad adicional en el procedimiento. La selección o el rastreo con respecto a la actividad deseada, seguido por iteraciones adicionales de mutagénesis y ensayo, proporciona la "evolución" rápida de secuencias seleccionando mutaciones deseables mientras que se seleccionan simultáneamente frente a cambios perjudiciales.

Los métodos de mutagénesis que se describen aquí pueden combinarse con métodos de rastreo automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos mutagenizados clonados en células huésped. Las moléculas de DNA mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células huésped y someterse a secuenciación rápidamente usando equipos modernos. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácido individuales en un polipéptido de interés, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

Producción de proteínas

Los polipéptidos pueden producirse en células huésped manipuladas genéticamente de acuerdo con técnicas convencionales. Células huésped adecuadas son aquellos tipos de células que pueden transformarse o transfectarse con DNA exógeno y desarrollarse en cultivo, e incluyen células bacterianas, fúngicas y células eucarióticas superiores cultivadas. Se prefieren las células eucarióticas, particularmente células cultivadas de organismos multicelulares. Técnicas para manipular moléculas de DNA clonadas e introducir DNA exógeno en una variedad de células huésped son descritas por Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y Ausubel y otros, eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987).

En general, una secuencia de DNA que codifica un polipéptido está conectada operablemente a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, incluyendo generalmente un promotor y un terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá comúnmente uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la especialidad reconocerán que dentro de ciertos sistemas los marcadores seleccionables pueden proporcionarse en vectores separados y la replicación del DNA exógeno puede proporcionarse mediante integración en el genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es un asunto de diseño habitual dentro del nivel de la experiencia normal en la especialidad. Muchos de tales elementos se describen en la literatura y están disponibles a través de suministradores comerciales.

Para dirigir un polipéptido a la ruta secretora de una célula huésped, una secuencia de señal secretora (también conocida como una secuencia líder, preprosecuencia o presecuencia) se proporciona en el vector de expresión. La secuencia de señal secretora puede ser la de polipéptidos naturales o puede derivarse de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA) o sintetizarse *de novo*. La secuencia de señal secretora está conectada operablemente a la secuencia de DNA, es decir, las dos secuencias están enlazadas en el marco de lectura correcto y situadas para dirigir el polipéptido recientemente sintetizado a la ruta secretora de la célula huésped. Las secuencias de señal secretora están situadas comúnmente 5' con respecto a la secuencia de DNA que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias de señal secretora pueden situarse en cualquier parte de la secuencia de DNA de interés (véanse, por ejemplo, Welch y otros, Patente de EE.UU. N° 5.037.743; Holland y otros, Patente de EE.UU. N° 5.143.830).

Alternativamente, la secuencia de señal secretora contenida en los polipéptidos de la presente invención se usa para dirigir a otros polipéptidos a la ruta secretora. La presente invención proporciona tales polipéptidos de fusión. La secuencia de señal secretora contenida en los polipéptidos de fusión de la presente invención preferiblemente está fusionada aminoterminalmente a un péptido adicional para dirigir al péptido adicional hacia la ruta secretora. Tales

constructos tienen numerosas aplicaciones conocidas en la especialidad. Por ejemplo, estos nuevos constructos de fusión de secuencia de señal secretora pueden dirigir la secreción de un componente activo de una proteína normalmente no secretada, tal como un receptor. Tales fusiones pueden usarse *in vivo* o *in vitro* para dirigir péptidos a través de la ruta secretora.

5 Las células de mamífero cultivadas son huéspedes adecuados dentro de la presente invención. Métodos para introducir DNA exógeno en células huésped de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato cálcico, Wigler y otros, *Cell* 14:725 (1978); Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603 (1981); Graham y Van der Eb, *Virology* 52:456 (1973), electroporación, Neumann y otros, *EMBO J.* 1:841-845 (1982), transfección mediada por DEAE-dextrano, 10 (Ausubel y otros, *ibid.*, y transfección mediada por liposomas, Hawley-Nelson y otros, *Focus* 15:73 (1993); Ciccarone y otros, *Focus* 15:80 (1993) y vectores virales, Miller y Rosman, *BioTechniques* 7:980 (1989); Wang y Finer, *Nature Med.* 2:714 (1996). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas es descrita, por ejemplo, por Levinson y otros, Patente de EE.UU. N° 4.713.339; Hagen y otros, Patente de EE.UU. N° 4.784.950; Palmiter y otros, Patente de EE.UU. N° 4.579.821 y Ringold, Patente de EE.UU. N° 4.656.134. Células de mamífero 15 cultivadas adecuadas incluyen las líneas celulares COS-1 (ATCC N° CRL 1650), COS-7 (ATCC N° CRL 1651), BHK (ATCC N° CRL 1632), BHK 570 (ATCC N° CRL 10314), 293 (ATCC N° CRL 1573; Graham y otros, *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977) y de ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1; ATCC N° CCL 61). Líneas celulares adecuadas adicionales son conocidas en la especialidad y están disponibles de depósitos públicos tales como the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. En general, se prefieren promotores de la transcripción fuertes, tales como 20 promotores de SV-40 o citomegalovirus. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los de genes de metalotioneína (Patentes de EE.UU. N° 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor tardío principal de adenovirus.

La selección de fármacos se usa generalmente para seleccionar células de mamífero cultivadas en las que se ha insertado DNA extraño. Tales células se denominan comúnmente "transfectantes". Las células que se han cultivado en presencia del agente selectivo y son capaces de pasar el gen de interés a su progenie se denominan "transfectantes estables". Un marcador seleccionable preferido es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección se lleva a cabo en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similares. Los sistemas de selección también pueden usarse para incrementar el nivel de expresión del gen de interés, un procedimiento denominado 30 "amplificación". La amplificación se lleva a cabo cultivando transfectantes en presencia de un bajo nivel del agente selectivo y a continuación incrementando la cantidad de agente selectivo para seleccionar células que producen altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable amplificable preferido es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia a metotrexato. También pueden usarse otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a higromicina, resistencia a múltiples fármacos, puromicina acetiltransferasa). Marcadores alternativos que introducen un fenotipo alterado, tales como proteína fluorescente verde o proteínas de la superficie celular 35 tales como CD4, CD8, MHC Clase I, fosfatasa alcalina placentaria, pueden usarse para clasificar células transfectadas a partir de células no transfectadas mediante medios tales como clasificación por FACS o tecnología de separación con cuentas magnéticas.

Otras células eucarióticas superiores también pueden usarse como huéspedes, incluyendo células de planta, células de insecto y células aviarias. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como un vector para expresar genes en células de planta ha sido revisado por Sinkar y otros, *J. Biosci. (Bangalore)* 11:47 (1987). La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos extraños en las mismas es descrita por Guarino y otros, Patente de EE.UU. N° 5.162.222 y publicación WIPO WO 94/06463. Las células de insecto pueden infectarse con baculovirus recombinante, comúnmente derivado de virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). DNA que codifica un polipéptido se inserta en el genoma baculoviral en lugar de la secuencia de codificación del gen de poliedrina de AcNPV mediante uno de dos métodos. El primero es el método tradicional de recombinación de DNA homólogo entre AcNPV silvestre y un vector de transferencia que contiene el gen flanqueado por secuencias de AcNPV. Células de insecto adecuadas, por ejemplo células de SF9, son infectadas con AcNPV silvestre y transfectadas con un vector de 50 transferencia que comprende un polinucléotido conectado operablemente a un promotor, un terminador y secuencias de flanco del gen de poliedrina de AcNPV. Véanse King, L.A. y Possee, R.D., *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, (Chapman & Hall, Londres); O'Reilly, D.R. y otros, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual* (Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, 1994) y Richardson, C.D., Ed., *Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology* (Humana Press, Totowa, NJ 1995). La recombinación natural dentro de una célula de insecto dará como resultado un baculovirus recombinante que contiene secuencias de codificación conducidas por el promotor de poliedrina. Se elaboran pies virales recombinantes mediante métodos usados comúnmente en la especialidad. 55

El segundo método para elaborar baculovirus recombinante utiliza un sistema basado en transposones descrito por Luckow, V.A. y otros, *J. Virol.* 67:4566 (1993). Este sistema es vendido en el estuche Bac-to-Bac (Life Technologies, Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, pFastBac1™ (Life Technologies), que contiene un transposón Tn7 para mover el DNA que codifica el polipéptido hacia un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande denominado un "bácmido". El vector de transferencia pFastBac1™ utiliza el promotor de poliedrina de AcNPV para conducir la expresión del gen de interés. Sin embargo, pFastBac1™ puede modificarse en un grado considerable. El promotor de poliedrina puede retirarse y substituirse por el promotor de proteína básica de baculovirus (también conocido como Pcor, p6.9 o promotor MP), se expresa anteriormente en la infección de baculovirus y se ha observado que es ventajoso para expresar proteínas secretadas. Véanse, Hill-Perkins, M.S. y Possee, R.D., *J. Gen. Virol.* 71:971 (1990); Bonning, B.C. y otros, *J. Gen. Virol.* 75:1551 (1994) y Chazenbalk, G.D. 65

y Rapoport, B., *J. Biol. Chem.* 270:1543 (1995). En tales constructos de vector de transferencia, puede usarse una versión corta o larga del promotor de proteína básica. Por otra parte, pueden construirse vectores de transferencia que reemplazan las secuencias de señal secretoras naturales por secuencias de señal secretoras derivadas de proteínas de insecto. Por ejemplo, una secuencia de señal secretora de ecdisteroide glucosiltransferasa (EGT), melitina de la abeja de la cera (Invitrogen, Carlsbad, CA) o baculovirus gp67 (PharMingen, San Diego, CA) puede usarse en constructos para reemplazar la secuencia de señal secretora natural. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en el marco con DNA que codifica una etiqueta epitópica en el extremo C o N del polipéptido expresado, por ejemplo, una etiqueta epitópica Glu-Glu, Grussenmeyer, T. y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:7952 (1985). Usando una técnica conocida en la especialidad, un vector de transferencia que contiene un gen recombinante se transforma en *E. coli*, y se rastrea con respecto a bácmidos que contienen un gen lacZ interrumpido indicativo de baculovirus recombinante. El DNA bacmídico que contiene el genoma de baculovirus recombinante se aísla, usando técnicas comunes, y se usa para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, por ejemplo células de Sf9. El virus recombinante que expresa el polipéptido se produce subsiguientemente. Se elaboran pies virales recombinantes mediante métodos usados comúnmente en la especialidad.

El virus recombinante se usa para infectar células huésped, típicamente una línea celular derivada del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*. Véase, en general, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press, Washington, D.C., 1994). Otra línea celular adecuada es la línea celular High FiveO™ (Invitrogen) derivada de *Trichoplusia ni* (Patente de EE.UU. N° 5.300.435). Se usan medios libres de suero disponibles comercialmente para hacer crecer y mantener las células. Medios adecuados son Sf900 II™ (Life Technologies) o ESF 921™ (Expression Systems) para las células de Sf9; y Ex-cellO405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) o Express FiveO™ (Life Technologies) para las células de *T. ni*. Las células se hacen crecer desde una densidad de inoculación de aproximadamente 2-5 x 10⁵ células hasta una densidad de 1-2 x 10⁶ células, momento en el cual un pie viral recombinante se añade a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 a 10, más típicamente cerca de 9. Las células infectadas con virus recombinante producen típicamente el polipéptido recombinante 12-72 horas después de la infección y lo secretan con eficacia variable al medio. El cultivo se recoge habitualmente 48 horas después de la infección. Se usa centrifugación para separar las células del medio (sobrenadante). El sobrenadante que contiene el polipéptido se filtra a través de filtros microporosos, habitualmente de 0,45 µm de tamaño de poro. Los procedimientos usados se describen generalmente en manuales de laboratorio disponibles (King, L.A. y Possee, R.D., *ibid.*; O'Reilly, D.R. y otros, *ibid.*; Richardson, C.D., *ibid.*). La purificación subsiguiente del polipéptido a partir del sobrenadante puede alcanzarse usando métodos descritos aquí.

También pueden usarse células fúngicas, incluyendo células de levadura, dentro de la presente invención. Especies de levadura de particular interés a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Métodos para transformar células de *S. cerevisiae* con DNA exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de las mismas son descritos, por ejemplo, por Kawasaki, Patente de EE.UU. N° 4.599.311; Kawasaki y otros, Patente de EE.UU. N° 4.931.373; Brake, Patente de EE.UU. N° 4.870.008; Welch y otros, Patente de EE.UU. N° 5.037.743 y Murray y otros, Patente de EE.UU. N° 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan mediante el fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente la resistencia a los fármacos o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema vectorial preferido para usar en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema vectorial *POT1* descrito por Kawasaki y otros (Patente de EE.UU. N° 4.931.373), que permite que las células transformadas se seleccionen mediante crecimiento en medios que contienen glucosa. Promotores y terminadores adecuados para usar en levadura incluyen los de genes de enzimas glicolíticas (véanse, por ejemplo, Kawasaki, Patente de EE.UU. N° 4.599.311; Kingsman y otros, Patente de EE.UU. N° 4.615.974 y Bitter, Patente de EE.UU. N° 4.977.092) y genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse, además, las Patentes de EE.UU. N° 4.990.446; 5.063.154; 5.139.936 y 4.661.454. Sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*, son conocidos en la especialidad. Véanse, por ejemplo, Gleeson y otros, *J. Gen. Microbiol.* 132:3459 (1986) y Cregg, Patente de EE.UU. N° 4.882.279. Pueden utilizarse células de *Aspergillus* de acuerdo con los métodos de McKnight y otros, Patente de EE.UU. N° 4.935.349. Métodos para transformar *Acremonium chrysogenum* son descritos por Sumino y otros, Patente de EE.UU. N° 5.162.228. Métodos para transformar *Neurospora* son descritos por Lambowitz, Patente de EE.UU. N° 4.486.533.

El uso de *Pichia methanolica* como huésped para la producción de proteínas recombinantes se describe en las Publicaciones WIPO WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 y WO 98/02565. Moléculas de DNA para usar al transformar *P. methanolica* se prepararán comúnmente como plásmidos circulares de doble hebra, que preferiblemente se linealizan antes de la transformación. Para la producción de polipéptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y el terminador en el plásmido sean los de un gen de *P. methanolica*, tal como un gen de utilización de alcohol de *P. methanolica* (*AUG1* o *AUG2*). Otros promotores útiles incluyen los de los genes de dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD) y catalasa (CAT). Para facilitar la integración del DNA en el cromosoma del huésped, se prefiere tener todo el segmento de expresión del plásmido flanqueado en ambos extremos por secuencias de DNA del huésped. Un marcador seleccionable preferido para usar en *Pichia methanolica* es un gen *ADE2* de *P. methanolica*, que codifica fosforribosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), que permite que las células huésped *ade2* crezcan en ausencia de adenina. Para procedimientos industriales a gran escala en los que es deseable minimizar el uso de metanol, se prefiere usar células huésped en las que ambos genes de utilización de metanol (*AUG1* y *AUG2*) se eliminan. Para la producción de proteínas secretadas, se prefieren células huésped deficientes en genes de proteasa vacuolar (*PEP4* y *PRB1*). La electroporación se usa para facilitar la introducción de un plásmido que contiene DNA que codifica un polipéptido de interés en células de *P. methanolica*. Se prefiere transformar células

de *P. methanolica* mediante electroporación usando un campo eléctrico pulsatorio que decae exponencialmente que tiene una intensidad de campo de 2,5 a 4,5 kV/cm, preferiblemente aproximadamente 3,75 kV/cm, y una constante de tiempo (τ) de 1 a 40 milisegundos, lo más preferiblemente alrededor de 20 milisegundos.

5 Células huésped procarióticas, incluyendo cepas de las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus* y otros géneros, también son células huésped útiles dentro de la presente invención. Técnicas para transformar estos huéspedes y expresar secuencias de DNA extraño clonadas en los mismos son bien conocidas en la especialidad (véase, por ejemplo Sam-
10 brook y otros, *ibid.*). Cuando se expresa un polipéptido en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede retenerse en el citoplasma, típicamente como gránulos insolubles, o puede dirigirse al espacio periplásmico mediante una se-
15 cuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se someten a lisis y los gránulos se recuperan y se desnaturalizan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado puede a conti-
nuación replegarse y dimerizarse diluyendo el desnaturalizante, tal como mediante diálisis contra una solución de urea y una combinación de glutatióna reducida y oxidada, seguido por diálisis frente una solución salina tamponada. En el
último caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional rompiendo
las células (mediante, por ejemplo, sonicación o choque osmótico) para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando de ese modo la necesidad de desnaturalización y replegamiento.

Las células huésped transformadas o transfectadas se cultivan de acuerdo con procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células hués-
20 ped elegidas. Una variedad de medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos, se conoce en la especialidad e incluyen generalmente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, viti-
minas y minerales. Los medios también pueden contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, según se requiera. El medio de crecimiento se seleccionará generalmente con respecto a células que contienen el DNA
25 exógenamente añadido mediante, por ejemplo, selección con fármacos o deficiencia en un nutriente esencial, que está complementado por el marcador seleccionable transportado en el vector de expresión o cotransfectado a la célula
huésped. Células de *P. methanolica* se cultivan en un medio que comprende fuentes adecuadas de carbono, nitrógeno y nutrientes traza a una temperatura de alrededor de 25°C a 35°C. Los cultivos líquidos se proveen de aireación sufici-
30 ente mediante medios convencionales, tales como batimiento de pequeños matraces o aspersión de fermentadores. Un medio de cultivo preferido para *P. methanolica* es YEPD (D-glucosa al 2%, peptona Bacto™ (Difco Laborato-
ries, Detroit, MI) al 2%, extracto de levadura Bacto™ al 1% (Difco Laboratories), adenina al 0,004% y L-leucina al
0,006%).

Aislamiento de Proteínas

35 Se prefiere purificar los polipéptidos usados en la presente invención hasta $\geq 80\%$ de pureza, más preferiblemente hasta $\geq 90\%$ de pureza, aún más preferiblemente $\geq 95\%$ de pureza y se prefiere particularmente un estado farmacéu-
ticamente puro, esto es, mayor que 99,9% puro con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras
40 proteínas y ácidos nucleicos, y libre de agentes infecciosos y pirógenos. Preferiblemente, un polipéptido purificado está substancialmente libre de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal.

Los polipéptidos recombinantes (o polipéptidos quiméricos) expresados pueden purificarse usando métodos y me-
dios de fraccionación y/o purificación convencional. La precipitación con sulfato amónico y ácido o la extracción
con caótrofos pueden usarse para la fraccionación de las muestras. Etapas de purificación ejemplares pueden in-
45 cluir hidroxipatito, exclusión por tamaños, FPLC y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa. Medios
cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices especializadas y
similares. Se prefieren derivados de PEI, DEAE, QAE y Q. Medios cromatográficos ejemplares incluyen los medios
derivados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso
50 Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) y similares; o resinas poliacrílicas, tales como Amberch-
rom CG 71 (Toso Haas) y similares. Soportes sólidos adecuados incluyen cuentas de vidrio, resinas basadas en sílice,
resinas celulósicas, cuentas de agarosa, cuentas de agarosa reticuladas, cuentas de poliestireno, resinas de poliacrila-
mida reticuladas y similares, que son insolubles bajo las condiciones en las que han de usarse. Estos soportes pueden
55 modificarse con grupos reactivos que permiten la ligazón de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos
sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de carbohidrato. Ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación
con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo,
60 activación con hidrazida y derivados carboxílicos y amínicos para químicas de acoplamiento de carbodiimidias. Estos
y otros medios sólidos son bien conocidos y ampliamente usados en la especialidad y están disponibles a partir de
suministradores comerciales. Métodos para unir polipéptidos receptores a medios de soporte son bien conocidos en
la especialidad. La selección de un método particular es un asunto de diseño habitual y está determinada en parte por
las propiedades del soporte elegido. Véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods* (Pharmacia
LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988).

Los polipéptidos pueden aislarse mediante la explotación de sus propiedades. Las proteínas que están fusionadas
a la región constante Fc de un anticuerpo pueden aislarse por medio de una columna de "Proteína A", *Methods in*
65 *Enzymol.*, Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), páginas 529-539 (Acad. Press, San Diego,
1990). Dentro de modalidades adicionales de la invención, puede construirse una fusión del polipéptido de interés
y una etiqueta de afinidad (por ejemplo, una proteína que se une a maltosa, un dominio de inmunoglobulina) para
facilitar la purificación.

Por otra parte, usando métodos descritos en la especialidad, se construyen fusiones polipeptídicas o proteínas híbridas usando regiones o dominios de polipéptidos, Sambrook y otros, Altschul y otros, *ibid*, Picard, *Cur. Opin. Biology*, 5:511 (1994). Estos métodos permiten la determinación de la importancia biológica de dominios o regiones mayores en un polipéptido de interés. Tales híbridos pueden alterar la cinética de reacción, la unión, constreñir o expandir la especificidad del sustrato o alterar la localización tisular y celular de un polipéptido, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

Las proteínas de fusión pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la especialidad preparando cada componente de la proteína de fusión y conjugándolos químicamente. Alternativamente, un polipéptido que codifica ambos componentes de la proteína de fusión en el marco de lectura apropiado puede generarse usando técnicas conocidas y expresarse mediante los métodos descritos aquí. Por ejemplo, parte o la totalidad de un dominio o dominios que confieren una función biológica puede intercambiarse entre un polipéptido de la presente invención con el dominio o los dominios funcionalmente equivalentes de otro miembro de la familia. Tales dominios incluyen, pero no se limitan a, la secuencia de señal secretora, conservada, y dominios o regiones significativos en esta familia. Se esperaría que tales proteínas de fusión tuvieran un perfil funcional biológico que fuera igual o similar a los polipéptidos de la presente invención u otras proteínas conocidas de la familia, dependiendo de la fusión construida. Por otra parte, tales proteínas de fusión pueden exhibir otras propiedades distintas a las descritas aquí.

La cantidad del receptor soluble IL-20RA/IL-20RB necesaria para inhibir IL-19 dependerá de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente y otras medicaciones administradas. Así, las dosificaciones de tratamiento se valorarán para optimizar seguridad y eficacia. Típicamente, las dosificaciones usadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para la administración *in vivo* de estos agentes. La prueba en animales de dosis eficaces para el tratamiento de trastornos particulares proporcionará una indicación predictiva adicional de la dosificación humana. Los métodos para la administración incluyen oral, intravenosa, peritoneal, intramuscular, transdérmica o administración al pulmón o la tráquea en forma de aerosol por medio de un nebulizador o atomizador. Portadores farmacéuticamente aceptables incluirán agua, solución salina, tampones, por nombrar solo unos pocos. Los intervalos de dosificación se esperarán habitualmente de 1 µg a 1000 µg por kilogramo de peso corporal al día. Sin embargo, las dosis pueden ser superiores o inferiores como puede ser determinado por un médico con experiencia normal en la especialidad. Para un análisis completo de formulaciones farmacológicas e intervalos de dosificación, véase *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Ed., (Mack Publishing Co., Easton, Penn, 1996) y *Goodman and Gilman's: The Pharmaceutical Bases of Therapeutics*, 9ª Ed. (Pergamon Press 1996).

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

Clonación de la Variante IL-20RB

1. *IL-20RB*

Dos nuevos miembros de la familia de receptores de citoquinas clase II fueron descritos en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US99/03735 presentada el 8 de marzo de 1999. IL-20RB comparte 31% de homología de secuencia con el receptor de citoquina clase II IL-20RA, Patente de EE.UU. N° 5.945.511, expedida el 31 de agosto de 1999. IL-20 es un homólogo de IL-10, que es un miembro de la familia de citoquinas clase II. El hecho de IL-20RB sea un receptor de citoquinas de clase II y se exprese en hígado fetal, intestino delgado fetal, ovario fetal, piel normal y piel con psoriasis hace al IL-20RB un candidato plausible para una subunidad receptora de IL-20.

2. *Clonación de la región de codificación de IL-20RB*

Se diseñaron dos cebadores de PCR basándose en la secuencia de la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US 99/03735 (publicación N° WO99/46379) presentada el 8 de marzo de 1999: ZC25480 (N° ID SEC: 7) contiene el codón ATG (Met1) con un sitio de restricción EcoRI, ZC25481 (N° ID SEC: 8) contiene el codón de parada (TAG) con un sitio de restricción XhoI. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando un DNA de biblioteca de cDNA de queratinocitos humanos (HaCat) como una plantilla y ZC25480 (N° ID SEC: 7) y ZC25481 (N° ID SEC: 8) como cebadores. La reacción de PCR se realizó como sigue: incubación a 94°C durante 1 minuto seguido por 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos, después de 68°C adicionales durante 4 minutos, la reacción se almacenó a 4°C. Los productos de PCR se trasladaron sobre gel de agarosa al 1% y se observó una banda de DNA de 1 kb. Los productos de PCR se cortaron del gel y el DNA se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). El DNA purificado se digirió con EcoRI y XhoI y se clonó en un vector pZP que se denominó pZP7N. Un plásmido pZP es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de metalotioneína 1 de ratón, el péptido líder de tPA humano, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes, una etiqueta Glu-Glu y un terminador de hormona del crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor SV40, un potenciador y un origen de replicación, así como un gen DHFR y el terminador de SV40. Se sometieron a secuenciación varios clones IL-20R?-pZP7N. Contendían todos tres mutaciones no conservativas en comparación con la secuencia patente de IL-20RB? en PCT/US99/03735: (secuencia IL-20R?-pZP7N), 146 Pro (CCC) - Thr (ACC), 148 His (CAT) - Asp (GAT) y 171 Thr (ACG) - Arg (AGG).

ES 2 267 814 T3

Para verificar las tres sustituciones en el clon IL-20R?-pZP7N, se llevó a cabo amplificación por PCR usando tres fuentes de cDNA diferentes - cDNA Marathon de piel fetal, DNA de biblioteca de cDNA de HaCaT y DNA de biblioteca de cDNA de músculo liso de próstata - como plantillas. Los productos de PCR se purificaron en gel y se sometieron a secuenciación. La secuencia de cada uno de los tres productos de PCR estaba de acuerdo con la del clon IL-20R?-pZP7N.

Ejemplo 2

Proteína de Fusión Receptor IL-20RA-Ig

El vector de expresión pEZE3 se usó para expresar la proteína de fusión receptor de IL-20 recombinante-Ig. pEZE3 se deriva de pDC312. pDC312 se obtuvo a través de licencia de Immunex Corporation. pDC312 y pEZE3 contienen un segmento EASE según se describe en WO97/25420. La presencia del segmento EASE en un vector de expresión puede mejorar la expresión de proteínas recombinantes de dos a ocho veces en fracciones reunidas celulares estables.

pEZE3 es un vector de expresión tricistrónico que puede usarse para expresar hasta tres proteínas diferentes en células de mamífero, preferiblemente en células de ovario de hámster chino (CHO). La unidad de expresión pEZE3 contiene el potenciador/promotor de CMV, la secuencia líder tripartita de adenovirus, un sitio de clonación múltiple para la inserción de la región de clonación para la primera proteína recombinante, el sitio de entrada interno al ribosoma de poliovirus tipo 2, un segundo sitio de clonación múltiple para la inserción de la región de codificación para la segunda proteína recombinante, un sitio interno de entrada al ribosoma del virus de la encefalomiocarditis, un segmento codificante para dihidrofolato reductasa de ratón y el terminador de la transcripción de SV40. Además, pEZE3 contiene un origen de replicación de *E. coli* y el gen de betalactamasa bacteriana.

La proteína de fusión receptor de IL-20-Ig es un heterotetrámero conectado por disulfuro que consiste en dos cadenas del dominio extracelular de IL-20RB humano fusionadas a la región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana silvestre y dos cadenas del dominio extracelular de la proteína de IL-20R humana fusionadas a una región constante gamma 1 de inmunoglobulina humana mutada. La región constante gamma 1 de inmunoglobulina humana contiene sustituciones de aminoácidos para reducir la unión a FcRI y la fijación del complemento C1q.

El constructo de fusión de dominio extracelular de IL-20RB humano-región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana se generó mediante PCR de solapamiento. El segmento de codificación de IL-20RB consiste en los aminoácidos 1 a 230. La plantilla usada para la amplificación por PCR del segmento de IL-20R era un constructo de expresión de IL-20RB-región constante de la cadena ligera kappa humana generado previamente. Se usaron cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 9 (zc27,522) y N° ID SEC: 10 (zc27,684) para amplificar el segmento de IL-20RB. Se usó toda la región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana silvestre. La plantilla usada para amplificación por PCR del segmento de la región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana silvestre era un constructo de expresión de IL-20RB-región constante de la cadena ligera kappa humana generado previamente. Se usaron los cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 11 (zc27,675) y N° ID SEC: 12 (zc27,685) para amplificar la región constante de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana silvestre. Los dos dominios de codificación de proteína se conectaron mediante PCR de solapamiento usando los oligonucleótidos N° ID SEC: 9 (zc27,522) y N° ID SEC: 12 (zc27,685). Se insertó un conector peptídico (Gly₄Ser)₃ entre los dos dominios proteínicos. El conector peptídico (Gly₄Ser)₃ se codificó en los cebadores de PCR N° ID SEC: 11 (zc27,675) y N° ID SEC: 10 (zc27,684).

El constructo dominio extracelular de IL-20RA humano/región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana se generó mediante PCR de solapamiento de cuatro fragmentos de DNA separados, cada uno generado mediante reacciones de amplificación por PCR separadas.

El primer fragmento contenía una secuencia de señal de tPA (activador del plasminógeno tisular) optimizada. La secuencia de señal otPA se amplificó usando los cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 13 (zc27,525) y N° ID SEC: 14 (zc27,526) usando un vector de expresión generado previamente en las propias instalaciones como la plantilla.

El segundo fragmento contenía la región de codificación del dominio extracelular de IL-20RA que consiste en los aminoácidos 1 a 214. Se usaron los cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 15 (zc27,524) y N° ID SEC: 16 (zc27,674) para amplificar este segmento de IL-20RA? usando un clon de IL-20RA generado previamente como la plantilla.

La región constante de la cadena pesada gamma 1 humana se generó a partir de dos segmentos. El primer segmento que contenía el dominio C_H1 se amplificó usando los cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 17 (zc27,676) y N° ID SEC: 18 (zc28,077) usando un clon de la región constante de la cadena pesada gamma 1 humana de tipo silvestre como la plantilla. El segundo segmento que contenía los dominios de bisagra, C_H2 y C_H3 restantes de la región constante de cadena pesada gamma 1 de inmunoglobulina humana se generó mediante amplificación por PCR usando los cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 19 (zc28,076) y N° ID SEC: 20 (zc27,523).

Los cuatro dominios de codificación de proteínas se conectaron mediante PCR de solapamiento usando los oligonucleótidos N° ID SEC: 13 (zc27,525) y N° ID SEC: 20 (zc27,523). Un conector peptídico (Gly₄Ser)₃ se insertó entre

ES 2 267 814 T3

los dominios proteínicos zcytor7 y CH1. El conector peptídico (Gly₄Ser)₃ se codificó en los cebadores de PCR N° ID SEC: 17 (zc27,676) y N° ID SEC: 16 (zc27,674).

5 El segmento de codificación de la fusión del dominio extracelular de IL-20RB/región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana se clonó en el segundo MCS mientras que el segmento que codifica la fusión de dominio extracelular de IL-20RA humano/región constante de la cadena pesada gamma 1 de inmunoglobulina humana se clonó en el primer MCS de pEZE3.

10 El plásmido se usó para transfectar células CHO. Las células se seleccionaron en medio sin hipoxantina o timidina y el transgén se amplificó usando metotrexato. La presencia de proteína se ensayó mediante transferencia Western usando anticuerpos anti-región constante de la cadena pesada gamma 1 humana y anti-cadena ligera kappa humana.

15 La proteína de fusión de dominio extracelular de IL-20RB/región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana y la secuencia de DNA se muestran en los N° ID SEC: 21 y 22.

La proteína de fusión del dominio extracelular de IL-20RA/región constante pesada gamma 1 de inmunoglobulina humana y la secuencia de DNA se muestran en los N° ID SEC: 23 y 24.

Ejemplo 3

20 *Proteína de Fusión Receptor IL-20RA/B-Ig*

El vector de expresión pEZE3 se usó para expresar la proteína de fusión recombinante receptor IL-20RA/B-Ig. pEZE3 se deriva de pDC312. pDC312 se obtuvo a través de licencia de Immunex Corporation. pDC312 y pEZE3 contienen un segmento EASE según se describe en WO97/25420. La presencia del segmento EASE en un vector de expresión puede mejorar la expresión de proteínas recombinantes de dos a ocho veces en fracciones reunidas celulares estables.

30 pEZE3 es un vector de expresión tricistrónico que puede usarse para expresar hasta tres proteínas diferentes en células de mamífero, preferiblemente en células de ovario de hámster chino (CHO). La unidad de expresión pEZE3 contiene el potenciador/promotor de CMV, la secuencia líder tripartita de adenovirus, un sitio de clonación múltiple para la inserción de la región de clonación para la primera proteína recombinante, el sitio de entrada interno al ribosoma de poliovirus tipo 2, un segundo sitio de clonación múltiple para la inserción de la región de codificación para la segunda proteína recombinante, un sitio interno de entrada al ribosoma del virus de la encefalomiocarditis, un segmento codificante para dihidrofolato reductasa de ratón y el terminador de la transcripción de SV40. Además, pEZE3 contiene un origen de replicación de *E. coli* y el gen de betalactamasa bacteriana.

40 La proteína de fusión receptor IL-20RA/B es un heterotetrámero conectado por disulfuro que consiste en dos cadenas del dominio extracelular de proteína de IL-20RB humana fusionadas a la región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana silvestre y dos cadenas del dominio extracelular de la proteína de IL-20RA humana fusionadas a una región constante gamma 1 de inmunoglobulina humana mutada. La región constante gamma 1 de inmunoglobulina humana contiene sustituciones de aminoácidos para reducir la unión a FcγRI y la fijación del complemento C1q.

45 El constructo de fusión de dominio extracelular de IL-20RB humano-región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana se generó mediante PCR de solapamiento. El segmento de codificación de IL-20RB consiste en los aminoácidos 1 a 230. La plantilla usada para la amplificación por PCR del segmento de IL-20R era un constructo de expresión de IL-20RB-región constante de la cadena ligera kappa humana generado previamente. Se usaron cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 9 (zc27,522) y N° ID SEC: 10 (zc27,684) para amplificar el segmento de IL-20RB. Se usó toda la región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana silvestre. La plantilla usada para amplificación por PCR del segmento de la región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana silvestre era un constructo de expresión de IL-20RB-región constante de la cadena ligera kappa humana generado previamente. Se usaron los cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 11 (zc27,675) y N° ID SEC: 12 (zc27,685) para amplificar la región constante de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana silvestre. Los dos dominios de codificación de proteína se conectaron mediante PCR de solapamiento usando los oligonucleótidos N° ID SEC: 9 (zc27,522) y N° ID SEC: 12 (zc27,685). Se insertó un conector peptídico (Gly₄Ser)₃ entre los dos dominios proteínicos. El conector peptídico (Gly₄Ser)₃ se codificó en los cebadores de PCR N° ID SEC: 11 (zc27,675) y N° ID SEC: 10 (zc27,684).

60 El constructo dominio extracelular de IL-20RA humano/región constante de cadena pesada gamma 1 de inmunoglobulina humana se generó mediante PCR de solapamiento de cuatro fragmentos de DNA separados, cada uno generado mediante reacciones de amplificación por PCR separadas.

65 El primer fragmento contenía una secuencia de señal de tPA (activador del plasminógeno tisular) optimizada. La secuencia de señal otPA se amplificó usando los cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 13 (zc27,525) y N° ID SEC: 14 (zc27,526) usando un vector de expresión generado previamente en las propias instalaciones como la plantilla.

ES 2 267 814 T3

El segundo fragmento contenía la región de codificación del dominio extracelular de IL-20RA que consiste en los aminoácidos 1 a 214. Se usaron los cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 15 (zc27,524) y N° ID SEC: 16 (zc27,674) para amplificar este segmento de IL-20RA usando un clon de IL-20RA generado previamente como la plantilla.

La región constante de la cadena pesada gamma 1 humana se generó a partir de dos segmentos. El primer segmento que contenía el dominio C_H1 se amplificó usando los cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 17 (zc27,676) y N° ID SEC: 18 (zc28,077) usando un clon de la región constante de la cadena pesada gamma 1 humana de tipo silvestre como la plantilla. El segundo segmento que contenía los dominios de bisagra, C_H2 y C_H3 restantes de la región constante de la cadena pesada gamma 1 de inmunoglobulina humana se generó mediante amplificación por PCR usando los cebadores oligonucleotídicos N° ID SEC: 19 (zc28,076) y N° ID SEC: 20 (zc27,523).

Los cuatro dominios de codificación de proteínas se conectaron mediante PCR de solapamiento usando los oligonucleótidos N° ID SEC: 13 (zc27,525) y N° ID SEC: 20 (zc27,523). Un conector peptídico (Gly₄Ser)₃ se insertó entre los dominios proteínicos zcytor7 y CH1. El conector peptídico (Gly₄Ser)₃ se codificó en los cebadores de PCR N° ID SEC: 17 (zc27,676) y N° ID SEC: 16 (zc27,674).

El segmento de codificación de la fusión del dominio extracelular de IL-20RB/la región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana se clonó en el segundo MCS mientras que el segmento que codifica la fusión de dominio extracelular de IL-20RA humano/región constante de la cadena pesada gamma 1 de inmunoglobulina humana se clonó en el primer MCS de pEZE3.

El plásmido se usó para transfectar células CHO. Las células se seleccionaron en medio sin hipoxantina o timidina y el transgén se amplificó usando metotrexato. La presencia de proteína se ensayó mediante transferencia Western usando anticuerpos anti-región constante de la cadena pesada gamma 1 humana y anti-cadena ligera kappa humana.

La proteína de fusión de dominio extracelular de IL-20RB/región constante de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana y la secuencia de DNA se muestran en los N° ID SEC: 21 y 22, cuya secuencia polipeptídica madura es el N° ID SEC: 41.

La proteína de fusión del dominio extracelular de IL-20RA/la región constante pesada gamma 1 de inmunoglobulina humana y la secuencia de DNA se muestran en los N° ID SEC: 23 y 24, cuya secuencia polipeptídica madura es el N° ID SEC: 39.

Ejemplo 4

Construcción de un Heterodímero de Receptor de IL-20

Se construyó un vector que expresa un heterodímero hIL-20RA/hIL-20B secretado. En este constructo, el dominio extracelular de hIL-20RA se fusionó a la cadena pesada gamma 1 de IgG (IgGγ1), mientras que la porción extracelular de IL-20RB se fusionó a la cadena ligera kappa humana (cadena ligera κ humana).

Construcción de vectores de fusión de gamma 1 de IgG y κ ligera humana

La cadena pesada de IgGγ1 se clonó en el vector de expresión de mamífero Zem229R (depósito del ATCC N° 69447) de modo que cualquier porción extracelular de un receptor que tuviera un sitio EcoRI 5' y NheI 3' pudiera clonarse, dando como resultado una fusión de dominio extracelular N-terminal-IgGγ1 C-terminal. El fragmento de IgGγ1 usado en este constructo se elaboró usando PCR para aislar la secuencia de IgGγ1 de una biblioteca de cDNA de hígado fetal humano de Clontech como plantilla. Una reacción de PCR usando los oligonucleótidos (N° ID SEC: 25) ZC11,450 y (N° ID SEC: 26) ZC11,443 se efectuó como sigue: 40 ciclos de 94°C durante 60 segundos, 53°C durante 60 segundos y 72°C durante 120 segundos y 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaron usando un estuche de extracción en gel QiaQuick™ (Qiagen). El fragmento de DNA de 990 pb aislado se digirió con MluI y EcoRI (Boehringer-Mannheim), se precipitó con etanol y se ligó con los oligonucleótidos (N° ID SEC: 27) ZC11,440 y (N° ID SEC: 28) ZC11,441, que comprenden un conector MluI/EcoRI, en Zem229R previamente digerido con MluI y EcoRI usando técnicas de biología molecular estándar descritas aquí. Este vector de clonación genérico se denominó Vector # 76 hIgGgamma1 w/Ch1 # 786 Zem229R (Vector N° 76). La secuencia polinucleotídica del dominio extracelular de hIL-20RA fusionado a la cadena pesada gamma 1 de IgG se muestra en el N° ID SEC: 29 y la secuencia polipeptídica correspondiente se muestra en el N° ID SEC: 30, cuya secuencia madura es el N° ID SEC: 40.

La cadena ligera κ humana se clonó en el vector de expresión de mamífero Zem228R (N° de depósito del ATCC 69446) de modo que cualquier porción extracelular de un receptor que tuviera un sitio EcoRI 5' y un sitio KpnI 3' pudiera clonarse, dando como resultado una fusión de dominio extracelular N-terminal-cadena ligera κ humana C-terminal. El fragmento de cadena ligera κ humana usado en este constructo se elaboró usando PCR para aislar la secuencia de la cadena ligera κ humana de la misma biblioteca de cDNA de hígado fetal humano de Clontech usada anteriormente. Una reacción de PCR usando los oligonucleótidos (N° ID SEC: 31) ZC11,501 y (N° ID SEC: 32) ZC11,451 se efectuó bajo la condición descrita anteriormente. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaron usando un estuche de extracción en gel QiaQuick™ (Qiagen). El

ES 2 267 814 T3

fragmento de DNA de 315 pb aislado se digirió con MluI y EcoRI (Boehringer-Mannheim), se precipitó con etanol y se ligó con el conector MluI/EcoRI descrito anteriormente, en Zem228R previamente digerido con MluI y EcoRI usando técnicas de biología molecular estándar descritas aquí. El vector de clonación genérico se denominó Vector# 77 hκlight #774 Zem228R (Vector N° 77). La secuencia polinucleotídica de la porción extracelular de IL-20RB fusionada a la cadena ligera kappa humana se muestra en el N° ID SEC: 33 y la secuencia polipeptídica correspondiente se muestra en el N° ID SEC: 34, cuya secuencia madura es el N° ID SEC: 42.

Inserción de dominios extracelulares de hIL-20RA e IL-20RB en constructos vectoriales de fusión

Usando los vectores de construcción anteriores, se elaboró un constructo que tenía IL-20RA humano fusionado a IgGγ1. Esta construcción se realizó sometiendo a PCR receptor IL-20RA humano a partir de hIL-20RA/IgG Vector N° 102 con los oligonucleótidos (N° ID SEC: 35) ZC12,909 y (N° ID SEC: 36) ZC26,564 bajo condiciones descritas como sigue: 30 ciclos a 94°C durante 60 segundos, 57°C durante 60 segundos y 72°C durante 120 segundos; y 72°C durante 7 minutos. El producto de PCR resultante se digirió con EcoRI y NheI, se purificó en gel, según se describe aquí, y se ligó en un Vector N° 76 (anterior) previamente digerido con EcoRI y NheI y purificado por bandas. El vector resultante se sometió a secuenciación para confirmar que la fusión IL-20Rα humana/IgG gamma 1 (hIL-20RA/Ch1 IgG) era correcta. El vector hIL-20RA/Ch1 IgG gamma 1 # 182 Zem229R se denominó Vector N° 195.

También se construyó un constructo separado que tenía IL-20RB fusionado a κ ligera. La construcción de IL-20RB/cadena ligera κ humana se realizó como anteriormente sometiendo a PCR a partir de DR1/7N-4 con los oligonucleótidos (N° ID SEC: 37) ZC26,602 y (N° ID SEC: 38) ZC26,599, digiriendo la banda resultante con EcoRI y KpnI y a continuación ligando este producto en un Vector N° 77 (anterior) digerido con EcoRI y KpnI y purificado por bandas. El vector resultante se sometió a secuenciación para confirmar que la fusión IL-20RB/cadena ligera κ humana (IL-20RB/κlight) era correcta. El vector IL-20RB/κlight # 1833 Zem228R se denominó Vector N° 194.

Coexpresión de los receptores IL-20RA humano e IL-20RB humano

Aproximadamente 16 μg de cada uno de los vectores N° 194 y N° 195, anteriores, se contransfectó en células BHK-570 (N° del ATCC CRL-10314) usando reactivo LipofectaminePlus™ (Gibco/BRL), según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron durante 10 días en DMEM + FBS al 5% (Gibco/BRL) que contenía 1 μM de metotrexato (MTX) (Sigma, St. Louis, MO) y 5 mg/ml de G418 (Gibco/BRL) durante 10 días. La fracción reunida resultante de transfectantes se seleccionó frente a MTX 10 μM y 0,5 mg/ml de G418 durante 10 días.

La fracción reunida resultante de células doblemente seleccionadas se usó para generar proteína. Se usaron tres fábricas (Nunc, Dinamarca) de esta fracción reunida para generar 8 l de medio acondicionado libre de suero. Este medio acondicionado se hizo pasar a lo largo de una columna de proteína A de 1 ml y se eluyó en (10) fracciones de 750 microlitros. Cuatro de estas fracciones que se encontró que tenían la concentración más alta se reunieron y se dializaron (10 kD de corte de PM) frente a PBS. Finalmente, el material dializado se analizó mediante BCA (Pierce) y se encontró que tenía una concentración de 317 μg/ml. Se obtuvieron un total de 951 μg a partir de esa purificación de 8 l.

Ejemplo 5

Ensayo de Proliferación sobre Líneas Celulares Estables Baf3/IL-20RA/IL-20RB

Objetivo del Ejemplo:

El objetivo del presente ejemplo era determinar si IL-19 podía unirse a líneas celulares que expresan el receptor heterodímero IL-20RA/IL-20RB.

IL-19 se sometió a un ensayo de proliferación de respuesta a la dosis en líneas celulares estables Baf3/IL-20RA/IL-20RB. El ensayo de proliferación era como sigue:

- Día 1: Una placa de 96 pocillos con 5000 células/pocillo se sembró con una respuesta a la dosis de IL-19 de 6 ng/ml hasta 0,01 ng/ml y controles y las células se incubaron a 37°C.

- Día 4: 20 μl de Alamar Blue se pusieron en cada pocillo y se dejó que las células se incubaran a 37°C durante la noche.

- Día 5: La placa se puso en el lector de placas robótico en unidades fluorescentes (554 nm ex./590 nm em.). Los datos se muestran anteriormente.

Resultados: Los datos siguientes son el número de células en cada pocillo e indican que las células proliferaban en una respuesta a IL-19 dependiendo de la dosis.

Tabla 1

	0,01 ng/ml	0,02 ng/ml	0,05 ng/ml	0,09 ng/ml	0,19 ng/ml	0,38 ng/ml	0,75 ng/ml	1,5 ng/ml	3 ng/ml	6 ng/ml
Basal										
351	952	1463	2415	3406	4110	4528	4962	5194	5499	5664
15,76368	114,4513	156,6867	265,7708	122,874	33,92484	172,5072	185,7348	177,8779	92,49958	83,41251
15,76	59,29149	93,94366	74,18359	144,9331	136,9183	84,89956	49,76869	83,2038	49,12525	43,42404

Tabla 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6528,9	5722,8	5619,8	5492,3	5338,3	4896,2	4285,9	3621	3563,9	2104	1443,5	373,79
B	6544,8	5540,1	5421,6	5133,1	4976,4	4676,9	4376,6	3933,5	3240,5	2221,8	1149,4	351,74
C	6554,7	5541,9	5402,7	5160,9	4981,9	4646,2	4325,9	3908,5	3029,9	2071,4	1181	321,27
D	6457,9	5689,5	5397,3	5012,6	4835,6	4409,4	4304,4	3831,3	2849,4	1794,4	1276,7	368,39
E	6537,7	5627,4	5496,6	5304	4962,9	4622	4341,3	3573,1	2521,7	1390,6	921,81	340,1
F	6494,5	5708	5532,4	5235,2	4880,5	4603,9	4055,3	3433,2	2416,2	1423,1	872,13	341,37
G	6492,6	5613,8	5419,6	5082,8	5002	4445,3	4061,1	3173,9	2312,1	1413,5	989,98	352,52
H	6562,8	5705,8	5546,2	5154,9	5002,8	4442	3983,1	3444,6	2408,8	1624,3	1025	359,24

ES 2 267 814 T3

Ejemplo 6

Ensayo de Neutralización de IL-19

5 Objetivo del Ejemplo:

El objetivo del presente ejemplo era determinar si el receptor heterodímero IL-20RA/IL-20RB soluble podía neutralizar IL-19.

10 - Día 1: Células de riñón de hámster recién nacido (BHK) que expresan el receptor heterodímero IL-20RA/IL-20RB se cultivaron en placas a 1000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos.

- Día 2: Las células se volvieron a cultivar en placas en medio libre de suero para regular a la baja su respuesta.

15 - Día 3: Se elaboraron tres soluciones diferentes que contenían IL-19, teniendo una una concentración de 0,1 ng/ml, teniendo la segunda solución una concentración de 1 ng/ml y teniendo la tercera una concentración de 10 ng/ml.

20 Como un experimento de control, partes alícuotas de 100 μ l de cada una de las soluciones de IL-19 se cultivaron en placas en diferentes pocillos que contenían células para determinar el nivel de proliferación de las células provocado por IL-19.

25 En un segundo experimento, 100 μ l de una solución que contenía el receptor heterodímero soluble IL-20A/IL-20B que tenía una concentración de 10 μ g/ml se mezclaron con partes alícuotas de 100 μ l de cada una de las soluciones de IL-19 y se sometieron a turbulencia para mezclar a fondo las soluciones. A continuación se dejó que las soluciones se asentaran a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las soluciones mezcladas se cargaron a continuación por triplicado a los pocillos que contenían las células BHK que expresan los receptores IL-20RA/IL-20RB. Las placas de microvaloración que contenían las células se incubaron a continuación a 37°C durante 4 horas, a continuación se leyeron en un luminómetro y los datos se recogieron.

30 Los datos de las tablas posteriores indican el número de células presente al final del experimento. Como puede observarse, el receptor soluble neutralizaba algo de la actividad de IL-19 a las tres concentraciones (especialmente, la concentración superior) en comparación con la actividad de IL-19 sola.

TABLA 3

35

	Basal	0,1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml
zmda1 Solo	3370	11488	18648	25148,33
40 Receptor Soluble (A442F) 10 μ g/ml	80,06664	282,8722	223,1457	770,5052

TABLA 4

45

	Basal	0,1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml
Receptor Soluble (A442F) 10 μ g/ml	3574,667	6115,333	13160,67	20687
50 + Zmda1	105,3291	435,0788	672,2645	582,3624

55

60

65

ES 2 267 814 T3

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido comprendido por el dominio extracelular de IL-20RA y el dominio extracelular de IL-20RB en la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación, regulando a la baja IL-19, en donde dicho IL-20RA comprende una secuencia seleccionada del N° ID SEC: 39 y el N° ID SEC: 40.

2. Uso de un polipéptido comprendido por el dominio extracelular de IL-20RA y el dominio extracelular de IL-20RB en la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación, neutralizando la actividad de IL-19, en donde dicho IL-20RA comprende una secuencia seleccionada del N° ID SEC: 39 y el N° ID SEC: 40.

3. Uso de un polipéptido comprendido por el dominio extracelular de IL-20RA y el dominio extracelular de IL-20RB en la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación, regulando a la baja IL-19, en donde dicho IL-20RB comprende una secuencia seleccionada del N° ID SEC: 41 y el N° ID SEC: 42.

4. Uso de un polipéptido comprendido por el dominio extracelular de IL-20RA y el dominio extracelular de IL-20RB en la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación, neutralizando la actividad de IL-19, en donde dicho IL-20RB comprende una secuencia seleccionada del N° ID SEC: 41 y el N° ID SEC: 42.

5. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dicho IL-20RB comprende una secuencia seleccionada del N° ID SEC: 41 y el N° ID SEC: 42.

6. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación previa, en el que la inflamación conduce a una enfermedad inflamatoria seleccionada de diabetes, aterosclerosis, cataratas, lesión por reperfusión y cáncer.

ES 2 267 814 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics. Inc.

5 <120> Método para Tratar la Inflamación

<130> 00-88PC

10 <160> 42

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

15 <210> 1

<211> 3516

<212> DNA

20 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

25 <222> (237)...(1895)

<400> 1

```
30 tccagctggg tagccggggg agcgcgcgtg ggggctccgc gagtcgctcg cccttggttt 60
ctgggaagc ctgggggacg cggctgtggc ggaggcggc tggactcag gtcgcctgga 120
gcgtggcagc cagagcccca ggcgcggagc tgaggccgcg cggccgcgct tggccccagc 180
gggcgtggga ctgagcagtc tgctgcccc cgacatgtga cccagccccg ccgccc atg 239
Met
35 1

cgg gct ccc ggc cgc ccg gcc ctg cgg ccg ctg ccg ctg ccg ccg ctg 287
Arg Ala Pro Gly Arg Pro Ala Leu Arg Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu
5 10 15

ctg ctg ttg ctc ctg gcg gcg cct tgg gga cgg gca gtt ccc tgt gtc 335
Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Pro Trp Gly Arg Ala Val Pro Cys Val
20 25 30

tct ggt ggt ttg cct aaa cct gca aac atc acc ttc tta tcc atc aac 383
Ser Gly Gly Leu Pro Lys Pro Ala Asn Ile Thr Phe Leu Ser Ile Asn
35 40 45
```

55

60

65

ES 2 267 814 T3

atg aag aat gtc cta caa tgg act cca cca gag ggt ctt caa gga gtt 431
 Met Lys Asn Val Leu Gln Trp Thr Pro Pro Glu Gly Leu Gln Gly Val
 50 55 60 65
 5
 aaa gtt act tac act gtg cag tat ttc ata tat ggg caa aag aaa tgg 479
 Lys Val Thr Tyr Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Gln Lys Lys Trp
 70 75 80
 10
 ctg aat aaa tca gaa tgc aga aat atc aat aga acc tac tgt gat ctt 527
 Leu Asn Lys Ser Glu Cys Arg Asn Ile Asn Arg Thr Tyr Cys Asp Leu
 85 90 95
 15
 tct gct gaa act tct gac tac gaa cac cag tat tat gcc aaa gtt aag 575
 Ser Ala Glu Thr Ser Asp Tyr Glu His Gln Tyr Tyr Ala Lys Val Lys
 100 105 110
 20
 gcc att tgg gga aca aag tgt tcc aaa tgg gct gaa agt gga cgg ttc 623
 Ala Ile Trp Gly Thr Lys Cys Ser Lys Trp Ala Glu Ser Gly Arg Phe
 115 120 125
 25
 tat cct ttt tta gaa aca caa att ggc cca cca gag gtg gca ctg act 671
 Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Gln Ile Gly Pro Pro Glu Val Ala Leu Thr
 130 135 140 145
 30
 aca gat gag aag tcc att tct gtt gtc ctg aca gct cca gag aag tgg 719
 Thr Asp Glu Lys Ser Ile Ser Val Val Leu Thr Ala Pro Glu Lys Trp
 150 155 160
 35
 aag aga aat cca gaa gac ctt cct gtt tcc atg caa caa ata tac tcc 767
 Lys Arg Asn Pro Glu Asp Leu Pro Val Ser Met Gln Gln Ile Tyr Ser
 165 170 175
 40
 aat ctg aag tat aac gtg tct gtg ttg aat act aaa tca aac aga acg 815
 Asn Leu Lys Tyr Asn Val Ser Val Leu Asn Thr Lys Ser Asn Arg Thr
 180 185 190
 45
 tgg tcc cag tgt gtg acc aac cac acg ctg gtg ctc acc tgg ctg gag 863
 Trp Ser Gln Cys Val Thr Asn His Thr Leu Val Leu Thr Trp Leu Glu
 195 200 205
 50
 ccg aac act ctt tac tgc gta cac gtg gag tcc ttc gtc cca ggg ccc 911
 55
 60
 65

ES 2 267 814 T3

	Pro Asn Thr Leu Tyr Cys Val His Val Glu Ser Phe Val Pro Gly Pro				
	210	215	220	225	
5	cct cgc cgt gct cag cct tct gag aag cag tgt gcc agg act ttg aaa		959		
	Pro Arg Arg Ala Gln Pro Ser Glu Lys Gln Cys Ala Arg Thr Leu Lys				
		230	235	240	
10	gat caa tca tca gag ttc aag gct aaa atc atc ttc tgg tat gtt ttg		1007		
	Asp Gln Ser Ser Glu Phe Lys Ala Lys Ile Ile Phe Trp Tyr Val Leu				
		245	250	255	
15	ccc ata tct att acc gtg ttt ctt ttt tct gtg atg ggc tat tcc atc		1055		
	Pro Ile Ser Ile Thr Val Phe Leu Phe Ser Val Met Gly Tyr Ser Ile				
		260	265	270	
20	tac cga tat atc cac gtt ggc aaa gag aaa cac cca gca aat ttg att		1103		
	Tyr Arg Tyr Ile His Val Gly Lys Glu Lys His Pro Ala Asn Leu Ile				
		275	280	285	
25	ttg att tat gga aat gaa ttt gac aaa aga ttc ttt gtg cct gct gaa		1151		
	Leu Ile Tyr Gly Asn Glu Phe Asp Lys Arg Phe Phe Val Pro Ala Glu				
		290	295	300	305
30	aaa atc gtg att aac ttt atc acc ctc aat atc tcg gat gat tct aaa		1199		
	Lys Ile Val Ile Asn Phe Ile Thr Leu Asn Ile Ser Asp Asp Ser Lys				
		310	315	320	
35	att tct cat cag gat atg agt tta ctg gga aaa agc agt gat gta tcc		1247		
	Ile Ser His Gln Asp Met Ser Leu Leu Gly Lys Ser Ser Asp Val Ser				
		325	330	335	
40	agc ctt aat gat cct cag ccc agc ggg aac ctg agg ccc cct cag gag		1295		
	Ser Leu Asn Asp Pro Gln Pro Ser Gly Asn Leu Arg Pro Pro Gln Glu				
		340	345	350	
45	gaa gag gag gtg aaa cat tta ggg tat gct tcg cat ttg atg gaa att		1343		
	Glu Glu Glu Val Lys His Leu Gly Tyr Ala Ser His Leu Met Glu Ile				
		355	360	365	
50	ttt tgt gac tct gaa gaa aac acg gaa ggt act tct ttc acc cag caa		1391		
	Phe Cys Asp Ser Glu Glu Asn Thr Glu Gly Thr Ser Phe Thr Gln Gln				
		370	375	380	385

ES 2 267 814 T3

5 gag tcc ctc agc aga aca ata ccc ccg gat aaa aca gtc att gaa tat 1439
 Glu Ser Leu Ser Arg Thr Ile Pro Pro Asp Lys Thr Val Ile Glu Tyr
 390 395 400

10 gaa tat gat gtc aga acc act gac att tgt gcg ggg cct gaa gag cag 1487
 Glu Tyr Asp Val Arg Thr Thr Asp Ile Cys Ala Gly Pro Glu Glu Gln
 405 410 415

15 gag ctc agt ttg cag gag gag gtg tcc aca caa gga aca tta ttg gag 1535
 Glu Leu Ser Leu Gln Glu Glu Val Ser Thr Gln Gly Thr Leu Leu Glu
 420 425 430

20 tcg cag gca gcg ttg gca gtc ttg ggc ccg caa acg tta cag tac tca 1583
 Ser Gln Ala Ala Leu Ala Val Leu Gly Pro Gln Thr Leu Gln Tyr Ser
 435 440 445

25 tac acc cct cag ctc caa gac tta gac ccc ctg gcg cag gag cac aca 1631
 Tyr Thr Pro Gln Leu Gln Asp Leu Asp Pro Leu Ala Gln Glu His Thr
 450 455 460 465

30 gag tcg gag gag ggg ccg gag gaa gag cca tcg acg acc ctg gtc gac 1679
 Asp Ser Glu Glu Gly Pro Glu Glu Glu Pro Ser Thr Thr Leu Val Asp
 470 475 480

35 tgg gat ccc caa act ggc agg ctg tgt att cct tcg ctg tcc agc ttc 1727
 Trp Asp Pro Gln Thr Gly Arg Leu Cys Ile Pro Ser Leu Ser Ser Phe
 485 490 495

40 gag cag gat tca gag ggc tgc gag cct tct gag ggg gat ggg ctc gga 1775
 Asp Gln Asp Ser Glu Gly Cys Glu Pro Ser Glu Gly Asp Gly Leu Gly
 500 505 510

45 gag gag ggt ctt cta tct aga ctc tat gag gag ccg gct cca gac agg 1823
 Glu Glu Gly Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Glu Glu Pro Ala Pro Asp Arg
 515 520 525

50 cca cca gga gaa aat gaa acc tat ctc atg caa ttc atg gag gaa tgg 1871
 Pro Pro Gly Glu Asn Glu Thr Tyr Leu Met Gln Phe Met Glu Glu Trp
 530 535 540 545

55 ggg tta tat gtg cag atg gaa aac tga tgc caa c acttcctttt gccttttgtt 1925
 Gly Leu Tyr Val Gln Met Glu Asn
 550

ES 2 267 814 T3

tcctgtgcaa acaagtgagt caccctttg atcccagcca taaagtacct gggatgaaag 1985
 aagttttttc cagtttgca gtgtctgtga gaattaccta tttcttttct ctattctcat 2045
 5 agcacgtgtg tgattggtc atgcatgtag gtctcttaac aatgatggtg ggcctctgga 2105
 gtccaggggc tggccggtg ttctatgcag agaaagcagt caataaatgt ttgccagact 2165
 ggggtgcagaa tttattcagg tgggtgtact ctggcctctt ggttcattat tttcaaaaca 2225
 gcacacttgt acaattattt tctgggtact tcccatatgc acatagcact gtaaaaaata 2285
 10 tttcccaaag atcactcatt ttataaatac cactttttca gaattgggtt tattgcgagc 2345
 aggaggagat acttaaaaca tgcacatata ccaggttggt ggtaagttgg tcacatgtga 2405
 aaacctcaac tatttaatca tcatgattca ttttttgagt gaatacatca ggcacagacc 2465
 ttcatgatat cacacactct tggctacttt aagaggccat ctttaatact ttatgagttag 2525
 15 ttctggagtg taaacataaa cgagtattct tttgtagtca gaaaagtgtc ctctcaataa 2585
 tttagtaggg gcttattgtc tctcaaaact aacctaaaag aaaatgacac attttataat 2645
 agaatattac atttatttct ggaagtgtgt tttcaaaaag atatttaccat agtctgtaaa 2705
 ctagaaaagtg ttaggtaaaag ctctagggtta ctgtgttact attataatat taaacattcg 2765
 aataggcagt cgttcaaaga ctctttggaa tatctatgaa tgaatattct ctattcttat 2825
 20 aatattaaaa cccataagta aatataggac atacaagaga aatgagttaa atgactatgt 2885
 aaggggagagt ttattaaaat ttgatgaaat ttaactgtagg aactaaacta tgccataaaa 2945
 caatagcttt ctagttcatt tccagtaact gttcccatct cctttaccac ttgttaagaa 3005
 aattaaattc ttcagtcacg ctgctttaa atgggacaaa atctattaag ttgaaccata 3065
 25 tataattgtg gatatttggc tgtttttaat ctgacaagca gtaacttcat atggtttgcc 3125
 ttaatatata tttgttttag tcatgaactc ataatccatt gatgctcttt catgagaaga 3185
 gatatgacc atatttcctt attgatatta ttggtacagg cagacaacce tggtaggaga 3245
 gatggattct ggggtcatga cctttcgtga ttatccgcaa atgcaaacag tttcagatct 3305
 30 aatggtttaa tttagggagt aattatatta atcagagtgt tctgttattc tcaatcttta 3365
 tagaaacgat tctgctggtt ttgaagaaca gatgtattac actaactgta aaagtatctc 3425
 aagagtgaga aagaataaat tgttattaag agcaaaaaga aaataaagtg attgatgata 3485
 aaaaaaaaaa aaaaaaagcg gccgcctcga g 3516

35 <210> 2
 <211> 553
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

45 Met Arg Ala Pro Gly Arg Pro Ala Leu Arg Pro Leu Pro Leu Pro Pro
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Pro Trp Gly Arg Ala Val Pro Cys
 20 25 30
 50 Val Ser Gly Gly Leu Pro Lys Pro Ala Asn Ile Thr Phe Leu Ser Ile
 35 40 45

55
 60
 65

ES 2 267 814 T3

Asn Met Lys Asn Val Leu Gln Trp Thr Pro Pro Glu Gly Leu Gln Gly
 50 55 60
 5 Val Lys Val Thr Tyr Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Gln Lys Lys
 65 70 75 80
 Trp Leu Asn Lys Ser Glu Cys Arg Asn Ile Asn Arg Thr Tyr Cys Asp
 85 90 95
 10 Leu Ser Ala Glu Thr Ser Asp Tyr Glu His Gln Tyr Tyr Ala Lys Val
 100 105 110
 Lys Ala Ile Trp Gly Thr Lys Cys Ser Lys Trp Ala Glu Ser Gly Arg
 115 120 125
 15 Phe Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Gln Ile Gly Pro Pro Glu Val Ala Leu
 130 135 140
 Thr Thr Asp Glu Lys Ser Ile Ser Val Val Leu Thr Ala Pro Glu Lys
 145 150 155 160
 20 Trp Lys Arg Asn Pro Glu Asp Leu Pro Val Ser Met Gln Gln Ile Tyr
 165 170 175
 Ser Asn Leu Lys Tyr Asn Val Ser Val Leu Asn Thr Lys Ser Asn Arg
 180 185 190
 25 Thr Trp Ser Gln Cys Val Thr Asn His Thr Leu Val Leu Thr Trp Leu
 195 200 205
 Glu Pro Asn Thr Leu Tyr Cys Val His Val Glu Ser Phe Val Pro Gly
 210 215 220
 30 Pro Pro Arg Arg Ala Gln Pro Ser Glu Lys Gln Cys Ala Arg Thr Leu
 225 230 235 240
 Lys Asp Gln Ser Ser Glu Phe Lys Ala Lys Ile Ile Phe Trp Tyr Val
 245 250 255
 35 Leu Pro Ile Ser Ile Thr Val Phe Leu Phe Ser Val Met Gly Tyr Ser
 260 265 270
 40 Ile Tyr Arg Tyr Ile His Val Gly Lys Glu Lys His Pro Ala Asn Leu
 275 280 285
 Ile Leu Ile Tyr Gly Asn Glu Phe Asp Lys Arg Phe Phe Val Pro Ala
 290 295 300
 45 Glu Lys Ile Val Ile Asn Phe Ile Thr Leu Asn Ile Ser Asp Asp Ser
 305 310 315 320
 Lys Ile Ser His Gln Asp Met Ser Leu Leu Gly Lys Ser Ser Asp Val
 325 330 335
 50 Ser Ser Leu Asn Asp Pro Gln Pro Ser Gly Asn Leu Arg Pro Pro Gln
 340 345 350
 Glu Glu Glu Glu Val Lys His Leu Gly Tyr Ala Ser His Leu Met Glu
 355 360 365
 55 Ile Phe Cys Asp Ser Glu Glu Asn Thr Glu Gly Thr Ser Phe Thr Gln
 370 375 380

60

65

ES 2 267 814 T3

5 Gln Glu Ser Leu Ser Arg Thr Ile Pro Pro Asp Lys Thr Val Ile Glu
 385 390 395 400
 Tyr Glu Tyr Asp Val Arg Thr Thr Asp Ile Cys Ala Gly Pro Glu Glu
 405 410 415
 10 Gln Glu Leu Ser Leu Gln Glu Glu Val Ser Thr Gln Gly Thr Leu Leu
 420 425 430
 Glu Ser Gln Ala Ala Leu Ala Val Leu Gly Pro Gln Thr Leu Gln Tyr
 435 440 445
 15 Ser Tyr Thr Pro Gln Leu Gln Asp Leu Asp Pro Leu Ala Gln Glu His
 450 455 460
 Thr Asp Ser Glu Glu Gly Pro Glu Glu Glu Pro Ser Thr Thr Leu Val
 465 470 475 480
 20 Asp Trp Asp Pro Gln Thr Gly Arg Leu Cys Ile Pro Ser Leu Ser Ser
 485 490 495
 Phe Asp Gln Asp Ser Glu Gly Cys Glu Pro Ser Glu Gly Asp Gly Leu
 500 505 510
 25 Gly Glu Glu Gly Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Glu Glu Pro Ala Pro Asp
 515 520 525
 Arg Pro Pro Gly Glu Asn Glu Thr Tyr Leu Met Gln Phe Met Glu Glu
 530 535 540
 30 Trp Gly Leu Tyr Val Gln Met Glu Asn
 545 550

<210> 3

<211> 221

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

40 Val Pro Cys Val Ser Gly Gly Leu Pro Lys Pro Ala Asn Ile Thr Phe
 1 5 10 15
 45 Leu Ser Ile Asn Met Lys Asn Val Leu Gln Trp Thr Pro Pro Glu Gly
 20 25 30
 Leu Gln Gly Val Lys Val Thr Tyr Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly
 35 40 45
 50 Gln Lys Lys Trp Leu Asn Lys Ser Glu Cys Arg Asn Ile Asn Arg Thr
 50 55 60
 Tyr Cys Asp Leu Ser Ala Glu Thr Ser Asp Tyr Glu His Gln Tyr Tyr
 65 70 75 80
 55 Ala Lys Val Lys Ala Ile Trp Gly Thr Lys Cys Ser Lys Trp Ala Glu
 85 90 95
 60 Ser Gly Arg Phe Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Gln Ile Gly Pro Pro Glu
 100 105 110

65

ES 2 267 814 T3

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

20 <210> 4
 <211> 971
 <212> DNA
 25 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CDS
 30 <222> (18)...(950)
 <400> 4

35 gaattcgagt ctaccaa atg cag act ttc aca atg gtt cta gaa gaa atc 50
 Met Gln Thr Phe Thr Met Val Leu Glu Glu Ile
 1 5 10
 40 tgg aca agt ctt ttc atg tgg ttt ttc tac gca ttg att cca tgt ttg 98
 Trp Thr Ser Leu Phe Met Trp Phe Phe Tyr Ala Leu Ile Pro Cys Leu
 15 20 25
 45 ctc aca gat gaa gtg gcc att ctg cct gcc cct cag aac ctc tct gta 146
 Leu Thr Asp Glu Val Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val
 30 35 40
 50 ctc tca acc aac atg aag cat ctc ttg atg tgg agc cca gtg atc gcg 194
 Leu Ser Thr Asn Met Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala
 45 50 55
 55 cct gga gaa aca gtg tac tat tct gtc gaa tac cag ggg gag tac gag 242

60

65

ES 2 267 814 T3

	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Tyr	Tyr	Ser	Val	Glu	Tyr	Gln	Gly	Glu	Tyr	Glu	
	60					65				70						75	
5	agc	ctg	tac	acg	agc	cac	atc	tgg	atc	ccc	agc	agc	tgg	tgc	tca	ctc	290
	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ser	His	Ile	Trp	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Cys	Ser	Leu	
				80					85					90			
10	act	gaa	ggt	cct	gag	tgt	gat	gtc	act	gat	gac	atc	acg	gcc	act	gtg	338
	Thr	Glu	Gly	Pro	Glu	Cys	Asp	Val	Thr	Asp	Asp	Ile	Thr	Ala	Thr	Val	
				95				100						105			
15	cca	tac	aac	ctt	cgt	gtc	agg	gcc	aca	ttg	ggc	tca	cag	acc	tca	gcc	386
	Pro	Tyr	Asn	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Thr	Leu	Gly	Ser	Gln	Thr	Ser	Ala	
			110				115						120				
20	tgg	agc	atc	ctg	aag	cat	ccc	ttt	aat	aga	aac	tca	acc	atc	ctt	acc	434
	Trp	Ser	Ile	Leu	Lys	His	Pro	Phe	Asn	Arg	Asn	Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	
		125				130						135					
25	cga	cct	ggg	atg	gag	atc	acc	aaa	gat	ggc	ttc	cac	ctg	gtt	att	gag	482
	Arg	Pro	Gly	Met	Glu	Ile	Thr	Lys	Asp	Gly	Phe	His	Leu	Val	Ile	Glu	
	140				145					150					155		
30	ctg	gag	gac	ctg	ggg	ccc	cag	ttt	gag	ttc	ctt	gtg	gcc	tac	tgg	agg	530
	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Pro	Gln	Phe	Glu	Phe	Leu	Val	Ala	Tyr	Trp	Arg	
				160				165						170			
35	agg	gag	cct	ggt	gcc	gag	gaa	cat	gtc	aaa	atg	gtg	agg	agt	ggg	ggt	578
	Arg	Glu	Pro	Gly	Ala	Glu	Glu	His	Val	Lys	Met	Val	Arg	Ser	Gly	Gly	
				175				180						185			
40	att	cca	gtg	cac	cta	gaa	acc	atg	gag	cca	ggg	gct	gca	tac	tgt	gtg	626
	Ile	Pro	Val	His	Leu	Glu	Thr	Met	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Tyr	Cys	Val	
			190					195					200				
45	aag	gcc	cag	aca	ttc	gtg	aag	gcc	att	ggg	agg	tac	agc	gcc	ttc	agc	674
	Lys	Ala	Gln	Thr	Phe	Val	Lys	Ala	Ile	Gly	Arg	Tyr	Ser	Ala	Phe	Ser	
		205				210					215						
50	cag	aca	gaa	tgt	gtg	gag	gtg	caa	gga	gag	gcc	att	ccc	ctg	gta	ctg	722
	Gln	Thr	Glu	Cys	Val	Glu	Val	Gln	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Leu	
	220				225					230					235		

ES 2 267 814 T3

5 gcc ctg ttt gcc ttt gtt ggc ttc atg ctg atc ctt gtg gtc gtg cca 770
 Ala Leu Phe Ala Phe Val Gly Phe Met Leu Ile Leu Val Val Val Pro
 240 245 250

10 ctg ttc gtc tgg aaa atg ggc cgg ctg ctc cag tac tcc tgt tgc ccc 818
 Leu Phe Val Trp Lys Met Gly Arg Leu Leu Gln Tyr Ser Cys Cys Pro
 255 260 265

15 gtg gtg gtc ctc cca gac acc ttg aaa ata acc aat tca ccc cag aag 866
 Val Val Val Leu Pro Asp Thr Leu Lys Ile Thr Asn Ser Pro Gln Lys
 270 275 280

20 tta atc agc tgc aga agg gag gag gtg gat gcc tgt gcc acg gct gtg 914
 Leu Ile Ser Cys Arg Arg Glu Glu Val Asp Ala Cys Ala Thr Ala Val
 285 290 295

25 atg tct cct gag gaa ctc ctc agg gcc tgg atc tca taggtttgcg 960
 Met Ser Pro Glu Glu Leu Leu Arg Ala Trp Ile Ser
 300 305 310

gaaggctcga g 971

30 <210> 5
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 5

40 Met Gln Thr Phe Thr Met Val Leu Glu Glu Ile Trp Thr Ser Leu Phe
 1 5 10 15
 Met Trp Phe Phe Tyr Ala Leu Ile Pro Cys Leu Leu Thr Asp Glu Val
 20 25 30
 Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val Leu Ser Thr Asn Met
 35 40 45
 Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala Pro Gly Glu Thr Val
 50 55 60
 Tyr Tyr Ser Val Glu Tyr Gln Gly Glu Tyr Glu Ser Leu Tyr Thr Ser
 65 70 75 80
 His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu Thr Glu Gly Pro Glu
 85 90 95
 Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr Asn Leu Arg
 100 105 110

55

60

65

ES 2 267 814 T3

Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala Trp Ser Ile Leu Lys
 115 120 125
 5 His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr Arg Pro Gly Met Glu
 130 135 140
 Ile Thr Lys Asp Gly Phe His Leu Val Ile Glu Leu Glu Asp Leu Gly
 145 150 155 160
 10 Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Arg Arg Glu Pro Gly Ala
 165 170 175
 Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro Val His Leu
 180 185 190
 15 Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala Gln Thr Phe
 195 200 205
 Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr Glu Cys Val
 210 215 220
 20 Glu Val Gln Gly Glu Ala Ile Pro Leu Val Leu Ala Leu Phe Ala Phe
 225 230 235 240
 Val Gly Phe Met Leu Ile Leu Val Val Val Pro Leu Phe Val Trp Lys
 245 250 255
 25 Met Gly Arg Leu Leu Gln Tyr Ser Cys Cys Pro Val Val Val Leu Pro
 260 265 270
 Asp Thr Leu Lys Ile Thr Asn Ser Pro Gln Lys Leu Ile Ser Cys Arg
 275 280 285
 30 Arg Glu Glu Val Asp Ala Cys Ala Thr Ala Val Met Ser Pro Glu Glu
 290 295 300
 Leu Leu Arg Ala Trp Ile Ser
 35 305 310

<210> 6

<211> 203

40 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Asp Glu Val Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val Leu Ser
 1 5 10 15
 50 Thr Asn Met Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala Pro Gly
 20 25 30
 Glu Thr Val Tyr Tyr Ser Val Glu Tyr Gln Gly Glu Tyr Glu Ser Leu
 35 40 45
 55 Tyr Thr Ser His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu Thr Glu
 50 55 60
 Gly Pro Glu Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr
 65 70 75 80

65

ES 2 267 814 T3

	<i><210></i> 11		
	<i><211></i> 53		
	<i><212></i> DNA		
5	<i><213></i> <i>Homo sapiens</i>		
	<i><400></i> 11		
10	gtggaggcgg cggtagcggg ggcgggtggca gtcgaactgt ggctgcacca tct		53
	<i><210></i> 12		
	<i><211></i> 38		
15	<i><212></i> DNA		
	<i><213></i> <i>Homo sapiens</i>		
	<i><400></i> 12		
20	ggcgccctc tagattaaca ctctcccctg ttgaagct		38
	<i><210></i> 13		
25	<i><211></i> 30		
	<i><212></i> DNA		
	<i><213></i> <i>Homo sapiens</i>		
30	<i><400></i> 13		
	gtcgaccatg gatgcaatga agagagggct		30
35	<i><210></i> 14		
	<i><211></i> 30		
	<i><212></i> DNA		
40	<i><213></i> <i>Homo sapiens</i>		
	<i><400></i> 14		
45	cacaggaac tctacgaag cgtctcaact		30
	<i><210></i> 15		
	<i><211></i> 33		
	<i><212></i> DNA		
50	<i><213></i> <i>Homo sapiens</i>		
	<i><400></i> 15		
55	cttcgtaga gttccctgtg tctctgtgg ttt		33
	<i><210></i> 16		
60	<i><211></i> 53		
	<i><212></i> DNA		
	<i><213></i> <i>Homo sapiens</i>		
65	<i><400></i> 16		
	gccagagcca cctccgctg aaccgctcc acctgatct ttaaagtcc tgg		53

ES 2 267 814 T3

	<i><210> 17</i>	
	<i><211> 51</i>	
	<i><212> DNA</i>	
5	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 17</i>	
10	caggcggagg tggctctggc ggtggcggat cggcctccac caagggccca t	51
	<i><210> 18</i>	
	<i><211> 20</i>	
15	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 18</i>	
20	ctgggcacgg tgggcatgtg	20
	<i><210> 19</i>	
25	<i><211> 20</i>	
	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
30	<i><400> 19</i>	
	cacatgccca ccgtgccag	20
35	<i><210> 20</i>	
	<i><211> 31</i>	
	<i><212> DNA</i>	
40	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 20</i>	
45	agatctagat tatttaccg gagacaggga g	31
	<i><210> 21</i>	
	<i><211> 1081</i>	
	<i><212> DNA</i>	
50	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><220></i>	
55	<i><221> CDS</i>	
	<i><222> (9)...(1067)</i>	
60		
65		

ES 2 267 814 T3

<400> 21

5 ggccggcc atg cag act ttc aca atg gtt cta gaa gaa atc tgg aca agt 50
Met Gln Thr Phe Thr Met Val Leu Glu Glu Ile Trp Thr Ser
1 5 10

10 ctt ttc atg tgg ttt ttc tac gca ttg att cca tgt ttg ctc aca gat 98
Leu Phe Met Trp Phe Phe Tyr Ala Leu Ile Pro Cys Leu Leu Thr Asp
15 20 25 30

15 gaa gtg gcc att ctg cct gcc cct cag aac ctc tct gta ctc tca acc 146
Glu Val Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val Leu Ser Thr
35 40 45

20 aac atg aag cat ctc ttg atg tgg agc cca gtg atc gcg cct gga gaa 194
Asn Met Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala Pro Gly Glu
50 55 60

25 aca gtg tac tat tct gtc gaa tac cag ggg gag tac gag agc ctg tac 242
Thr Val Tyr Tyr Ser Val Glu Tyr Gln Gly Glu Tyr Glu Ser Leu Tyr
65 70 75

30 acg agc cac atc tgg atc ccc agc agc tgg tgc tca ctc act gaa ggt 290
Thr Ser His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu Thr Glu Gly
80 85 90

35 cct gag tgt gat gtc act gat gac atc acg gcc act gtg cca tac aac 338
Pro Glu Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr Asn
95 100 105 110

40 ctt cgt gtc agg gcc aca ttg ggc tca cag acc tca gcc tgg agc atc 386
Leu Arg Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala Trp Ser Ile
115 120 125

45 ctg aag cat ccc ttt aat aga aac tca acc atc ctt acc cga cct ggg 434

ES 2 267 814 T3

Leu Lys His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr Arg Pro Gly
 130 135 140

5
 atg gag atc ccc aaa cat ggc ttc cac ctg gtt att gag ctg gag gac 482
 Met Glu Ile Pro Lys His Gly Phe His Leu Val Ile Glu Leu Glu Asp
 145 150 155

10
 ctg ggg ccc cag ttt gag ttc ctt gtg gcc tac tgg acg agg gag cct 530
 Leu Gly Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Thr Arg Glu Pro
 160 165 170

15
 ggt gcc gag gaa cat gtc aaa atg gtg agg agt ggg ggt att cca gtg 578
 Gly Ala Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro Val
 175 180 185 190

20
 cac cta gaa acc atg gag cca ggg gct gca tac tgt gtg aag gcc cag 626
 His Leu Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala Gln
 195 200 205

25
 aca ttc gtg aag gcc att ggg agg tac agc gcc ttc agc cag aca gaa 674
 Thr Phe Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr Glu
 210 215 220

30
 tgt gtg gag gtg caa gga gag gcc gga ggt ggt ggc agt gga ggc ggc 722
 Cys Val Glu Val Gln Gly Glu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 225 230 235

35
 ggt agc gga ggc ggt ggc agt cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc 770
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 240 245 250

40
 atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt 818
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 255 260 265 270

45
 gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg 866
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 275 280 285

50
 aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca 914
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 290 295 300

55

60

65

ES 2 267 814 T3

gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg 962
 Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 305 310 315
 5
 ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc 1010
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 320 325 330
 10
 acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga 1058
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 335 340 345 350
 15
 gag tgt taa tctagaggcg cgcc 1081
 Glu Cys *

20 <210> 22
 <211> 352
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22

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

55
 60
 65

ES 2 267 814 T3

Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Thr Arg Glu Pro Gly Ala
 165 170 175
 5 Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro Val His Leu
 180 185 190
 Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala Gln Thr Phe
 195 200 205
 10 Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr Glu Cys Val
 210 215 220
 Glu Val Gln Gly Glu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 15 Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 245 250 255
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 260 265 270
 20 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 275 280 285
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 290 295 300
 25 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 305 310 315 320
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 325 330 335
 30 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 340 345 350

- <210> 23
- 35 <211> 1801
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- 40 <220>
- <221> CDS
- <222> (8)...(1789)
- 45 <400> 23

gtcgacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg 49
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu
 1 5 10

tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg 97
 Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu
 15 20 25 30

60

65

ES 2 267 814 T3

aga cgc ttc cgt aga gtt ccc tgt gtc tct ggt ggt ttg cct aaa cct 145
 Arg Arg Phe Arg Arg Val Pro Cys Val Ser Gly Gly Leu Pro Lys Pro
 35 40 45

5
 gca aac atc acc ttc tta tcc atc aac atg aag aat gtc cta caa tgg 193
 Ala Asn Ile Thr Phe Leu Ser Ile Asn Met Lys Asn Val Leu Gln Trp
 50 55 60

10
 act cca cca gag ggt ctt caa gga gtt aaa gtt act tac act gtg cag 241
 Thr Pro Pro Glu Gly Leu Gln Gly Val Lys Val Thr Tyr Thr Val Gln
 65 70 75

15
 tat ttc ata tat ggg caa aag aaa tgg ctg aat aaa tca gaa tgc aga 289
 Tyr Phe Ile Tyr Gly Gln Lys Lys Trp Leu Asn Lys Ser Glu Cys Arg
 80 85 90

20
 aat atc aat aga acc tac tgt gat ctt tct gct gaa act tct gac tac 337
 Asn Ile Asn Arg Thr Tyr Cys Asp Leu Ser Ala Glu Thr Ser Asp Tyr
 95 100 105 110

25
 gaa cac cag tat tat gcc aaa gtt aag gcc att tgg gga aca aag tgt 385
 Glu His Gln Tyr Tyr Ala Lys Val Lys Ala Ile Trp Gly Thr Lys Cys
 115 120 125

30
 tcc aaa tgg gct gaa agt gga cgg ttc tat cct ttt tta gaa aca caa 433
 Ser Lys Trp Ala Glu Ser Gly Arg Phe Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Gln
 130 135 140

35
 att ggc cca cca gag gtg gca ctg act aca gat gag aag tcc att tct 481
 Ile Gly Pro Pro Glu Val Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys Ser Ile Ser
 145 150 155

40
 gtt gtc ctg aca gct cca gag aag tgg aag aga aat cca gaa gac ctt 529
 Val Val Leu Thr Ala Pro Glu Lys Trp Lys Arg Asn Pro Glu Asp Leu
 160 165 170

45
 cct gtt tcc atg caa caa ata tac tcc aat ctg aag tat aac gtg tct 577
 Pro Val Ser Met Gln Gln Ile Tyr Ser Asn Leu Lys Tyr Asn Val Ser
 175 180 185 190

50
 gtg ttg aat act aaa tca aac aga acg tgg tcc cag tgt gtg acc aac 625
 Val Leu Asn Thr Lys Ser Asn Arg Thr Trp Ser Gln Cys Val Thr Asn
 195 200 205

55

60

65

ES 2 267 814 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

cac acg ctg gtg ctc acc tgg ctg gag ccg aac act ctt tac tgc gta 673
 His Thr Leu Val Leu Thr Trp Leu Glu Pro Asn Thr Leu Tyr Cys Val
 210 215 220
 cac gtg gag tcc ttc gtc cca ggg ccc cct cgc cgt gct cag cct tct 721
 His Val Glu Ser Phe Val Pro Gly Pro Pro Arg Arg Ala Gln Pro Ser
 225 230 235
 gag aag cag tgt gcc agg act ttg aaa gat caa ggt gga ggc ggt tca 769
 Glu Lys Gln Cys Ala Arg Thr Leu Lys Asp Gln Gly Gly Gly Ser
 240 245 250
 ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gcc tcc acc aag ggc cca 817
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 255 260 265 270
 tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca 865
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 275 280 285
 gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg 913
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 290 295 300
 gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg 961
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 305 310 315
 gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc 1009
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 320 325 330
 gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat 1057
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 335 340 345 350
 cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct 1105
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 355 360 365
 tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag 1153

ES 2 267 814 T3

	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu			
	370	375	380	
5	ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc	1201		
	Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
	385	390	395	
10	atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc	1249		
	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
	400	405	410	
15	cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag	1297		
	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
	415	420	425	430
20	gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg	1345		
	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
	435	440	445	
25	tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat	1393		
	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
	450	455	460	
30	ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc	1441		
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser			
	465	470	475	
35	atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag	1489		
	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
	480	485	490	
40	gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc	1537		
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val			
	495	500	505	510
45	agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg	1585		
	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
	515	520	525	
50	gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct	1633		
	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
	530	535	540	

ES 2 267 814 T3

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc 1681
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 545 550 555

5

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg 1729
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 560 565 570

10

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg 1777
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 575 580 585 590

15

tct ccg ggt aaa taatctagat ct 1801
 Ser Pro Gly Lys

20 <210> 24
 <211> 594
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 24

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

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 267 814 T3

Ser Met Gln Gln Ile Tyr Ser Asn Leu Lys Tyr Asn Val Ser Val Leu
 180 185 190
 5 Asn Thr Lys Ser Asn Arg Thr Trp Ser Gln Cys Val Thr Asn His Thr
 195 200 205
 Leu Val Leu Thr Trp Leu Glu Pro Asn Thr Leu Tyr Cys Val His Val
 210 215 220
 10 Glu Ser Phe Val Pro Gly Pro Pro Arg Arg Ala Gln Pro Ser Glu Lys
 225 230 235 240
 Gln Cys Ala Arg Thr Leu Lys Asp Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255
 15 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 260 265 270
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 275 280 285
 20 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 290 295 300
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 305 310 315 320
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 325 330 335
 30 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 340 345 350
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 355 360 365
 35 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala
 370 375 380
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 385 390 395 400
 40 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 405 410 415
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 420 425 430
 45 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 435 440 445
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 450 455 460
 50 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 465 470 475 480
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 485 490 495
 55 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 500 505 510

60

65

ES 2 267 814 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1713)

5

<400> 29

	atg cgg gct ccc ggc cgc ccg gcc ctg cgg ccg ctg ctg ctg ttg ctc	48
	Met Arg Ala Pro Gly Arg Pro Ala Leu Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu	
10	1 5 10 15	
	ctg gcg gcg cct tgg gga cgg gca gtt ccc tgt gtc tct ggt ggt ttg	96
	Leu Ala Ala Pro Trp Gly Arg Ala Val Pro Cys Val Ser Gly Gly Leu	
15	20 25 30	
	cct aaa cct gca aac atc acc ttc tta tcc atc aac atg aag aat gtc	144
	Pro Lys Pro Ala Asn Ile Thr Phe Leu Ser Ile Asn Met Lys Asn Val	
20	35 40 45	
	cta caa tgg act cca cca gag ggt ctt caa gga gtt aaa gtt act tac	192
25	Leu Gln Trp Thr Pro Pro Glu Gly Leu Gln Gly Val Lys Val Thr Tyr	
	50 55 60	
	act gtg cag tat ttc ata tat ggg caa aag aaa tgg ctg aat aaa tca	240
	Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Gln Lys Lys Trp Leu Asn Lys Ser	
30	65 70 75 80	
	gaa tgc aga aat atc aat aga acc tac tgt gat ctt tct gct gaa act	288
	Glu Cys Arg Asn Ile Asn Arg Thr Tyr Cys Asp Leu Ser Ala Glu Thr	
35	85 90 95	
	tct gac tac gaa cac cag tat tat gcc aaa gtt aag gcc att tgg gga	336
	Ser Asp Tyr Glu His Gln Tyr Tyr Ala Lys Val Lys Ala Ile Trp Gly	
40	100 105 110	
	aca aag tgt tcc aaa tgg gct gaa agt gga cgg ttc tat cct ttt tta	384
	Thr Lys Cys Ser Lys Trp Ala Glu Ser Gly Arg Phe Tyr Pro Phe Leu	
45	115 120 125	

50

55

60

65

ES 2 267 814 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

gaa aca caa att ggc cca cca gag gtg gca ctg act aca gat gag aag 432
 Glu Thr Gln Ile Gly Pro Pro Glu Val Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys
 130 135 140

tcc att tct gtt gtc ctg aca gct cca gag aag tgg aag aga aat cca 480
 Ser Ile Ser Val Val Leu Thr Ala Pro Glu Lys Trp Lys Arg Asn Pro
 145 150 155 160

gaa gac ctt cct gtt tcc atg caa caa ata tac tcc aat ctg aag tat 528
 Glu Asp Leu Pro Val Ser Met Gln Gln Ile Tyr Ser Asn Leu Lys Tyr
 165 170 175

aac gtg tct gtg ttg aat act aaa tca aac aga acg tgg tcc cag tgt 576
 Asn Val Ser Val Leu Asn Thr Lys Ser Asn Arg Thr Trp Ser Gln Cys
 180 185 190

gtg acc aac cac acg ctg gtg ctc acc tgg ctg gag ccg aac act ctt 624
 Val Thr Asn His Thr Leu Val Leu Thr Trp Leu Glu Pro Asn Thr Leu
 195 200 205

tac tgc gta cac gtg gag tcc ttc gtc cca ggg ccc cct cgc cgt gct 672
 Tyr Cys Val His Val Glu Ser Phe Val Pro Gly Pro Pro Arg Arg Ala
 210 215 220

cag cct tct gag aag cag tgt gcc agg act ttg aaa gat caa tca tca 720
 Gln Pro Ser Glu Lys Gln Cys Ala Arg Thr Leu Lys Asp Gln Ser Ser
 225 230 235 240

gag gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc 768
 Glu Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 245 250 255

aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac 816
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 260 265 270

tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc 864
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 275 280 285

agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac 912

ES 2 267 814 T3

	Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr	
	290	295 300
5	tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag	960
	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln	
	305	310 315 320
10	acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac	1008
	Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp	
		325 330 335
15	aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg	1056
	Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro	
		340 345 350
20	tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc	1104
	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	
		355 360 365
25	cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca	1152
	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr	
		370 375 380
30	tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac	1200
	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn	
		385 390 395 400
35	tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg	1248
	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	
		405 410 415
40	gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc	1296
	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val	
		420 425 430
45	ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc	1344
	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser	
		435 440 445
50	aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa	1392
	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	
		450 455 460

55

60

65

ES 2 267 814 T3

5 ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat 1440
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 465 470 475 480

10 gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc 1488
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 485 490 495

15 tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag 1536
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 500 505 510

20 aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc 1584
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 515 520 525

25 ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg 1632
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 530 535 540

30 aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac 1680
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 545 550 555 560

35 acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tgaccgcg 1720
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 565 570

40 <210> 30
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 30

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

ES 2 267 814 T3

Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Gln Lys Lys Trp Leu Asn Lys Ser
 65 70 75 80
 5 Glu Cys Arg Asn Ile Asn Arg Thr Tyr Cys Asp Leu Ser Ala Glu Thr
 85 90 95
 Ser Asp Tyr Glu His Gln Tyr Tyr Ala Lys Val Lys Ala Ile Trp Gly
 100 105 110
 10 Thr Lys Cys Ser Lys Trp Ala Glu Ser Gly Arg Phe Tyr Pro Phe Leu
 115 120 125
 Glu Thr Gln Ile Gly Pro Pro Glu Val Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys
 130 135 140
 15 Ser Ile Ser Val Val Leu Thr Ala Pro Glu Lys Trp Lys Arg Asn Pro
 145 150 155 160
 Glu Asp Leu Pro Val Ser Met Gln Gln Ile Tyr Ser Asn Leu Lys Tyr
 165 170 175
 20 Asn Val Ser Val Leu Asn Thr Lys Ser Asn Arg Thr Trp Ser Gln Cys
 180 185 190
 Val Thr Asn His Thr Leu Val Leu Thr Trp Leu Glu Pro Asn Thr Leu
 195 200 205
 25 Tyr Cys Val His Val Glu Ser Phe Val Pro Gly Pro Pro Arg Arg Ala
 210 215 220
 Gln Pro Ser Glu Lys Gln Cys Ala Arg Thr Leu Lys Asp Gln Ser Ser
 225 230 235 240
 30 Glu Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 245 250 255
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 260 265 270
 35 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 275 280 285
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 290 295 300
 40 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 305 310 315 320
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 325 330 335
 45 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 340 345 350
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 355 360 365
 50 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 370 375 380
 55 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 385 390 395 400

60

65

ES 2 267 814 T3

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 405 410 415
 5 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 420 425 430
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 435 440 445
 10 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 450 455 460
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 465 470 475 480
 15 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 485 490 495
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 500 505 510
 20 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 515 520 525
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 530 535 540
 25 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 545 550 555 560
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 565 570

30 <210> 31

<211> 37

<212> DNA

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

40 gtcacttgaa ttcggtaccg cctctgttgt gtgcctg

37

<210> 32

<211> 32

45 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

50 gacctgaacg cgtctaacac tctcccctgt tg

32

<210> 33

55 <211> 1011

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

60 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(1011)

65

ES 2 267 814 T3

<400> 33

5	atg cag act ttc aca atg gtt cta gaa gaa atc tgg aca agt ctt ttc Met Gln Thr Phe Thr Met Val Leu Glu Glu Ile Trp Thr Ser Leu Phe 1 5 10 15	48
10	atg tgg ttt ttc tac gca ttg att cca tgt ttg ctc aca gat gaa gtg Met Trp Phe Phe Tyr Ala Leu Ile Pro Cys Leu Leu Thr Asp Glu Val 20 25 30	96
15	gcc att ctg cct gcc cct cag aac ctc tct gta ctc tca acc aac atg Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val Leu Ser Thr Asn Met 35 40 45	144
20	aag cat ctc ttg atg tgg agc cca gtg atc gcg cct gga gaa aca gtg Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala Pro Gly Glu Thr Val 50 55 60	192
25	tac tat tct gtc gaa tac cag ggg gag tac gag agc ctg tac acg agc Tyr Tyr Ser Val Glu Tyr Gln Gly Glu Tyr Glu Ser Leu Tyr Thr Ser 65 70 75 80	240
30	cac atc tgg atc ccc agc agc tgg tgc tca ctc act gaa ggt cct gag His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu Thr Glu Gly Pro Glu 85 90 95	288
35	tgt gat gtc act gat gac atc acg gcc act gtg cca tac aac ctt cgt Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr Asn Leu Arg 100 105 110	336
40	gtc agg gcc aca ttg ggc tca cag acc tca gcc tgg agc atc ctg aag Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala Trp Ser Ile Leu Lys 115 120 125	384
45	cat ccc ttt aat aga aac tca acc atc ctt acc cga cct ggg atg gag His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr Arg Pro Gly Met Glu 130 135 140	432
50	atc acc aaa gat ggc ttc cac ctg gtt att gag ctg gag gac ctg ggg	480

50

55

60

65

ES 2 267 814 T3

Ile Thr Lys Asp Gly Phe His Leu Val Ile Glu Leu Glu Asp Leu Gly
 145 150 155 160
 5
 ccc cag ttt gag ttc ctt gtg gcc tac tgg agg agg gag cct ggt gcc 528
 Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Arg Arg Glu Pro Gly Ala
 165 170 175
 10
 gag gaa cat gtc aaa atg gtg agg agt ggg ggt att cca gtg cac cta 576
 Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro Val His Leu
 180 185 190
 15
 gaa acc atg gag cca ggg gct gca tac tgt gtg aag gcc cag aca ttc 624
 Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala Gln Thr Phe
 195 200 205
 20
 gtg aag gcc att ggg agg tac agc gcc ttc agc cag aca gaa tgt gtg 672
 Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr Glu Cys Val
 210 215 220
 25
 gag gtg caa gga gag gcc act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc 720
 Glu Val Gln Gly Glu Ala Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 30
 ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct ggt acc gcc tct gtt gtg tgc 768
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 245 250 255
 35
 ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg 816
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 260 265 270
 40
 gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag 864
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 275 280 285
 45
 gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc 912
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 290 295 300
 50
 aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat 960
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 305 310 315 320
 55
 cag gcc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 1008
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325 330 335
 60
 tag 1011
 65
 <210> 34
 <211> 336

ES 2 267 814 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 34

```

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

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
45          245          250          255
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
          260          265          270
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
50          275          280          285
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
          290          295          300
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
55          305          310          315          320
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          325          330          335

```

60 <210> 35

<211> 38

<212> DNA

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 267 814 T3

<400> 35
 tcagtcggaa ttcgcagaag ccatgcgggc tcccggcc 38
 5
 <210> 36
 <211> 35
 <212> DNA
 10 <213> *Homo sapiens*
 <400> 36
 15 ctgtgacgct agcctctgat gattgatctt tcaaa 35
 <210> 37
 <211> 43
 20 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 37
 25 gatgtctgaa ttcgcagaag ccatgcagac ttcacaatg gtt 43
 <210> 38
 30 <211> 86
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 38
 aagacggtac cagatttcaa ctgctcatca gatggcggga agatgaagac agatggtgca 60
 gccacagtgg cctctccttg cacctc 86
 40
 <210> 39
 <211> 559
 45 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 55
 60
 65

ES 2 267 814 T3

<400> 39

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

45

50

55

60

65

ES 2 267 814 T3

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 275 280 285
 5 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 290 295 300
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 305 310 315 320
 10 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 325 330 335
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val
 340 345 350
 15 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 355 360 365
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 370 375 380
 20 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 385 390 395 400
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 405 410 415
 25 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 420 425 430
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 435 440 445
 30 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 450 455 460
 35 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 465 470 475 480
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 485 490 495
 40 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 500 505 510
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 515 520 525
 45 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 530 535 540
 50 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 545 550 555

<210> 40

<211> 547

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 267 814 T3

<400> 40

Val Pro Cys Val Ser Gly Gly Leu Pro Lys Pro Ala Asn Ile Thr Phe
 1 5 10 15
 5 Leu Ser Ile Asn Met Lys Asn Val Leu Gln Trp Thr Pro Pro Glu Gly
 20 25 30
 10 Leu Gln Gly Val Lys Val Thr Tyr Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly
 35 40 45
 Gln Lys Lys Trp Leu Asn Lys Ser Glu Cys Arg Asn Ile Asn Arg Thr
 50 55 60
 15 Tyr Cys Asp Leu Ser Ala Glu Thr Ser Asp Tyr Glu His Gln Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Ala Lys Val Lys Ala Ile Trp Gly Thr Lys Cys Ser Lys Trp Ala Glu
 85 90 95
 20 Ser Gly Arg Phe Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Gln Ile Gly Pro Pro Glu
 100 105 110
 Val Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys Ser Ile Ser Val Val Leu Thr Ala
 115 120 125
 25 Pro Glu Lys Trp Lys Arg Asn Pro Glu Asp Leu Pro Val Ser Met Gln
 130 135 140
 Gln Ile Tyr Ser Asn Leu Lys Tyr Asn Val Ser Val Leu Asn Thr Lys
 145 150 155 160
 30 Ser Asn Arg Thr Trp Ser Gln Cys Val Thr Asn His Thr Leu Val Leu
 165 170 175
 Thr Trp Leu Glu Pro Asn Thr Leu Tyr Cys Val His Val Glu Ser Phe
 180 185 190
 35 Val Pro Gly Pro Pro Arg Arg Ala Gln Pro Ser Glu Lys Gln Cys Ala
 195 200 205
 Arg Thr Leu Lys Asp Gln Ser Ser Glu Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 210 215 220
 40 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 225 230 235 240
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 245 250 255
 45 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 260 265 270
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 275 280 285
 50 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 290 295 300
 55 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 305 310 315 320
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 325 330 335

60

65

ES 2 267 814 T3

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 340 345 350
 5 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 355 360 365
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 370 375 380
 10 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 385 390 395 400
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 405 410 415
 15 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 420 425 430
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 435 440 445
 20 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 450 455 460
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 465 470 475 480
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 485 490 495
 30 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 500 505 510
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 515 520 525
 35 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 530 535 540
 Pro Gly Lys
 40 545

<210> 41

<211> 323

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 41

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

65

ES 2 267 814 T3

5 Gly Pro Glu Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala Trp Ser
 85 90 95
 Ile Leu Lys His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr Arg Pro
 100 105 110
 10 Gly Met Glu Ile Pro Lys His Gly Phe His Leu Val Ile Glu Leu Glu
 115 120 125
 Asp Leu Gly Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Thr Arg Glu
 130 135 140
 15 Pro Gly Ala Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro
 145 150 155 160
 Val His Leu Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala
 165 170 175
 20 Gln Thr Phe Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr
 180 185 190
 Glu Cys Val Glu Val Gln Gly Glu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 195 200 205
 25 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 210 215 220
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 225 230 235 240
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 245 250 255
 35 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 275 280 285
 40 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 290 295 300
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 305 310 315 320
 45 Gly Glu Cys

<210> 42

<211> 307

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 42

55 Asp Glu Val Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val Leu Ser
 1 5 10 15

60

65

ES 2 267 814 T3

Thr Asn Met Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala Pro Gly
 20 25 30
 5 Glu Thr Val Tyr Tyr Ser Val Glu Tyr Gln Gly Glu Tyr Glu Ser Leu
 35 40 45
 Tyr Thr Ser His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu Thr Glu
 50 55 60
 10 Gly Pro Glu Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala Trp Ser
 85 90 95
 15 Ile Leu Lys His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr Arg Pro
 100 105 110
 Gly Met Glu Ile Thr Lys Asp Gly Phe His Leu Val Ile Glu Leu Glu
 115 120 125
 20 Asp Leu Gly Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Arg Arg Glu
 130 135 140
 Pro Gly Ala Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro
 145 150 155 160
 25 Val His Leu Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala
 165 170 175
 Gln Thr Phe Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr
 180 185 190
 30 Glu Cys Val Glu Val Gln Gly Glu Ala Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 195 200 205
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 210 215 220
 35 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 225 230 235 240
 40 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 245 250 255
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 260 265 270
 45 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 275 280 285
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 290 295 300
 50 Gly Glu Cys
 305

55

60

65