

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2007.04.05**

(30) Prioridade(s): **2006.04.07 US 790506 P**
2006.05.09 US 798896 P

(43) Data de publicação do pedido: **2011.10.05**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.07.12**
204/2017

(73) Titular(es):

AERPIO THERAPEUTICS, INC.
9987 CARVER ROAD, SUITE 420 CINCINNATI,
OH 45242 **US**

(72) Inventor(es):

ROCCO JAMIE ROTELLO **US**
KEVIN GENE PETERS **US**
MICHAEL GLEN DAVIS **US**

(74) Mandatário:

ELSA MARIA BRUNO GUILHERME
RUA VICTOR CORDON, Nº 14 - 3º 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS QUE SE LIGAM À FOSFATASE TIROSINA DE PROTEÍNAS HUMANA BETA (FTPH-β) E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

ANTICORPOS QUE SE LIGAM À FOSFATASE TIROSINA DE PROTEÍNAS HUMANA (FTPH-β; ¿HUMAN PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE BETA¿, HPTP¿) E SEUS USOS. ANTICORPOS E SEUS FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO QUE SE LIGAM À FOSFATASE TIROSINA DE PROTEÍNAS HUMANA BETA (FTPH¿) E SUAS UTILIZAÇÕES.

RESUMO

"ANTICORPOS QUE SE LIGAM ã FOSFATASE TIROSINA DE PROTEPNAS
HUMANA BETA (FTPH-ó) E SUAS UTILIZAãõES "

Anticorpos que se ligam - fosfatase tirosina de
prote°nas humana ¢ (FTPH-ó; `human protein tyrosine
phosphatase beta_, HPTP¢) e seus usos. Anticorpos e seus
fragmentos de liga'2o ao antígeno que se ligam - fosfatase
tirosina de prote°nas humana beta (FTPH¢) e suas
utiliza'ões.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS QUE SE LIGAM À FOSFATASE TIROSINA DE PROTEÍNAS HUMANAS BETA (FTHP-β) E SUAS UTILIZAÇÕES"

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção está relacionada com anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam à fosfatase tirosina de proteínas humanas beta (FTHPβ; "human protein tyrosine phosphatase beta", HPTPβ) e suas utilizações.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A angiogênese, a produção de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente, desempenha um papel importante numa larga gama de processos fisiológicos e patológicos (Nguyen, L.L. et al, Int. Rev. Cytol., 204, 1-48, (2001)). A angiogênese é um processo complexo, mediado pela comunicação entre as células endoteliais que forram os vasos sanguíneos e o seu ambiente envolvente. Nas fases iniciais da angiogênese, tecido ou células tumorais produzem e secretam factores de crescimento pró-angiogênicos em resposta a estímulos ambientais, como seja hipóxia. Estes factores difundem-se para as células endoteliais próximas e estimulam receptores

que conduzem à produção e secreção de proteases que degradam a matriz extracelular envolvente. As células endoteliais activadas começam a migrar e a proliferar no tecido envolvente e em direcção à fonte destes factores de crescimento (Bussolino, F., Trends Biochem Sci., 22, 251-256, (1997)). As células endoteliais param então a proliferar e diferenciam-se em estruturas tubulares, que é o primeiro passo na formação de vasos sanguíneos estáveis maduros. Subsequentemente, as células peritendoteliais, tais como pericitos e células de músculo liso, são recrutadas para o novo vaso sanguíneo formado, num passo subsequente da maturação do vaso.

A angiogénese é regulada por um equilíbrio de factores naturais pró-angiogénicos e anti-angiogénicos. O factor de crescimento endotelial vascular, o factor de crescimento dos fibroblastos e a angiopoietina representam alguns dos muitos potenciais factores de crescimento pró-angiogénicos. Estes ligandos ligam-se ao respectivo receptor cinase de tirosina na superfície da célula endotelial e fazem a transdução de sinais que promovem a migração e proliferação celulares. Apesar de muitos factores reguladores terem sido identificados, os mecanismos moleculares que conduzem este processo ainda não estão totalmente compreendidos.

Existem muitos estados de doença conduzidos por angiogénese desregulada persistente ou inadequadamente regulada. Em tais estados de doença, a angiogénese

desregulada ou inadequadamente regulada pode ser a causa de uma doença particular ou exacerbar uma condição patológica existente. Por exemplo, a neovascularização vascular tem sido implicada como a causa mais comum de cegueira e está subjacente à patologia de aproximadamente 20 doenças dos olhos. Em determinadas condições pré-existentes, como seja artrite, os novos vasos capilares sanguíneos formados invadem as articulações e destroem a cartilagem. Na diabetes, os novos capilares formados na retina invadem o humor vítreo, causando hemorragia e cegueira.

Tanto o crescimento como a metastatização dos tumores sólidos podem também ser dependentes da angiogênese, Folkman et al., "Tumor Angiogenesis," Chapter 10, 206-32, in *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn et al., eds., W. B. Saunders, (1995). Foi demonstrado que os tumores que crescem para além dos 2 mm de diâmetro devem obter a sua própria fonte de sangue e fazem-no através da indução do crescimento de novos vasos capilares sanguíneos. Após estes novos vasos sanguíneos ficarem embutidos no tumor, eles proporcionam nutrientes e factores de crescimento essenciais para o crescimento dos tumores assim como um meio para a entrada de células tumorais na circulação e metastatização de locais distantes, tais como fígado, pulmão ou osso (Weidner, *New Eng. J. Med.*, 324, 1, 1-8 (1991)). Quando usados como fármacos nos animais portadores de tumores, os inibidores naturais da angiogênese podem prevenir o crescimento de pequenos tumores (O'Reilly et al., *Cell*, 79, 315-28 (1994)). Nalguns

protocolos, a aplica'2o de tais inibidores conduz - regress'2o e dormncia do tumor, mesmo ap'5 cessa'2o do tratamento (O'Reilly et al., Cell, 88, 277-85 (1997)). Ainda, o fornecimento de inibidores da angiog'inese a determinados tumores pode potenciar a sua resposta a outros regimes terap,uticos (ver, e.g., Teischer et al., Int. J. Cancer, 57, 920-25 (1994)).

Apesar de muitos estados de doen'a serem conduzidos por angiog'inese desregulada persistente ou inadequadamente regulada, alguns estados de doen'a podem ser tratados atrav's do aumento da angiog'inese. O crescimento e repara'2o de tecidos s'2o eventos biol'gicos em que ocorrem a prolifera'2o celular e angiog'inese. Assim, um aspecto importante da repara'2o de feridas ' a revasculariza'2o do tecido danificado atrav's de angiog'inese.

As feridas cr'nicas que n'2o cicatrizam s'2o uma das principais causas morbidade prolongada na popula'2o humana idosa. Este ' especialmente o caso em doentes acamados ou diab'ticos que desenvolvem lceras da pele graves que n'2o cicatrizam. Em muitos destes casos, o atraso na cicatriza'2o ' um resultado de fornecimento inadequado de sangue como resultado da press'2o cont'ua ou do bloqueio vascular. A m' circula'2o capilar devido a aterosclerose das art'rias pequenas ou a estase venosa contribui para a incapacidade de repara'2o dos tecidos danificados. Tais tecidos s'2o frequentemente infectados com microrganismos

que proliferam sem ser confrontados com os sistemas de defesa inatos do corpo, os quais requerem tecido bem vascularizado para eliminar eficazmente os organismos patogénicos. Como resultado, a maioria das intervenções terapêuticas centram-se na restauração do fluxo sanguíneo em tecidos isquémicos, permitindo assim que nutrientes e factores imunológicos tenham acesso ao local da ferida.

As lesões ateroscleróticas nos grandes vasos podem causar isquemia dos tecidos que pode ser melhorada através da modulação do crescimento de vasos sanguíneos no tecido afectado. Por exemplo, as lesões ateroscleróticas nas artérias coronárias podem causar angina e enfarte do miocárdio que poderão ser evitados caso se restaure o fluxo sanguíneo através da estimulação do crescimento de artérias colaterais. De forma semelhante, as lesões ateroscleróticas nas grandes artérias que fornecem as pernas podem causar isquemia no músculo esquelético, o que limita a mobilidade e, nalguns casos, requer amputação, o que também pode ser evitado através do melhoramento do fluxo sanguíneo com terapia angiogénica.

Outras doenças tais como diabetes e hipertensão são caracterizadas por um decréscimo no número e densidade de pequenos vasos sanguíneos tais como arteríolas e capilares. Estes pequenos vasos sanguíneos são importantes para a entrega de oxigénio e nutrientes. Uma redução no número e densidade destes vasos contribui para as consequências adversas da hipertensão e diabetes incluindo

claudicaç²o, úlceras isqu²micas, hipertens²o acelerada e fal²ncia renal. Estes distúrbios comuns e muitas outras doen²as menos comuns, como seja a doen²a de Burgers, podem ser melhorados atrav²ls do aumento do n²mero e densidade de pequenos vasos sangu²neos usando terapia angiog²ni ca.

Assim mant²m-se a necessidade de identificar reguladores da angiog²nese.

Face ao que foi dito, existe a necessidade de identificar alvos bioqu²micos no tratamento dos distúrbios mediados por angiog²nese. No entanto, a angiog²nese envolve a actua²o de múltiplos factores de crescimento e dos seus receptores cognatos cinases de tirosina (RCT; `receptor tyrosine kinase_, RTKs), Yancopoulos et al., Nature, 407, 242-248, 2000). O factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), por exemplo, ² importante para a diferencia²o de c²lulas endoteliais em vasos sangu²neos nascentes na vasculatura embrion²ria. Ainda, VEGF estimula o desenvolvimento de vasos sangu²neos na vasculatura adulta. A administra²o de VEGF ex²geno estimula o desenvolvimento da vasculatura colateral e melhora o fluxo sangu²neo nos tecidos isqu²micos.

At² agora, foram identificados tr²s VEGF RTKs, VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (KDR) e VEGFR3 (FLT-4). Apesar destes receptores serem altamente conservados, baseado na caracteriza²o bioqu²mica e na actividade biol²gica, cada um possui fun²es espec²ficas e n²o sobrepon²veis. Dos tr²s

receptores, pensa-se que VEGFR2 desempenhe um papel predominante na mediação das acções de VEGF no desenvolvimento da vasculatura e durante a angiogénese em adultos. No entanto, tanto VEGFR1 como VEGFR3 são necessários para o desenvolvimento normal da vasculatura embrionária e podem também ser importantes para a angiogénese nos tecidos adultos. Quando da ligação e dimerização de VEGF, uma alteração conformacional no domínio cinase de VEGFR2 aumenta a sua actividade cinase resultando em "autofosforilação" do outro membro do par em resíduos tirosina específicos. Estes eventos de autofosforilação servem para estimular mais a actividade de cinase e proporcionam pontos de ancoragem para a associação de moléculas de sinalização intracelular.

Porém, a activação de uma única via angiogénica pode não ser suficiente para produzir vasos persistentes e funcionais que proporcionem perfusão adequada ao tecido isquémico. Estes resultados, juntamente com o facto de múltiplos RCTs estarem envolvidos na montagem da vasculatura embrionária, indicam que os alvos bioquímicos que modulam as múltiplas vias angiogénicas terão vantagens relativamente à administração de um único factor de crescimento.

As fosfatases de tirosina de proteínas (FTPs) compreendem uma grande família de enzimas estreitamente relacionadas que desfosforilam proteínas possuidoras de resíduos de fosfotirosina. Evidência recente sugere que uma

função das FTPs seja limitar a fosforilação e ativação de RCTs. Por exemplo, demonstrou-se que HCPTA, uma fosfatase tirosina de proteínas de massa molecular baixa, está associada a VEGFR2 e regula negativamente a sua ativação em células endoteliais em cultura e a sua actividade biológica nos ensaios de angiogénese, (Huang et al., Journal of Biological Chemistry, 274, 38183-38185, 1999).

Para além de VEGFR2, a sinalização de uma outra RCT, Tie-2, o receptor das angiopietinas (Ang1 e Ang2), é igualmente importante. A deleção do gene de Ang1 ou Tie-2 em murinhos pode resultar em letalidade embrionária subsequente a anormalidades na vasculatura em desenvolvimento (Yancopoulos et al., Nature, 407, 242-248, 2000). Ainda, a expressão excessiva de Ang1 na pele aumenta a vascularidade da pele e a administração de Ang1 exógena aumenta o fluxo sanguíneo no músculo esquelético isquémico (Surf et al., Science, 282, 468-471, 1998). Ainda, a inibição da ativação de Tie-2 inibe a angiogénese e limita a progressão de tumores em modelos animais de cancro, (Lin et al., J Clin. Invest., 100, 2072-2078, 1997). Para além das suas actividades angiogénicas, a ativação de Tie-2 através da administração exógena de Ang1 bloqueia o vazamento vascular mediado por VEGF e efeitos pró-inflamatórios, mas estimula os seus efeitos angiogénicos (Thurston et al., Nature Medicine, 6, 460-463, 2000). Assim, os alvos biológicos que modulam a sinalização via VEGFR2 e Tie-2 podem originar melhores terapias pró-angiogénicas ou antiangiogénicas.

FTPHbeta (descrito pela primeira vez em Krueger et al., EMBO J., 9, (1990)) foi sugerido para a modulaç²o da actividade da cinase de tirosina do tipo receptor da angiopoietina Tie-2, e.g., WO 00/65085). FTPHbeta foi igualmente sugerida para actividades reguladoras de VEGFR2, e.g., Pat. U.S. Pub. No. 2004/0077065.

Ser[®] deseja[®]vel desenvolver anticorpos, e.g. um anticorpo monoclonal humanizado, que regule selectivamente a actividade de FTPHbeta e assim potenciem a sinalizaç²o angiog[®]ni ca, estimule m o crescimento de vasos sangu[°]neos (angiog[®]lnese), e/ou aumentem o fluxo sangu[°]neo em tecido isqu[®]mico ou reduzam a sinalizaç²o angiog[®]ni ca, reduzam o crescimento de vasos sangu[°]neos, e/ou reduzam o fluxo sangu[°]neo do tecido afectado. S²o aqui descritos anticorpos e seus fragmentos que se ligam a FTPHbeta e regulam a sinalizaç²o celular angiog[®]ni ca que, por sua vez, regula a angiog[®]lnese.

SUMERIO DA INVEN[®]UO

A presente invenç²o est[®] relacionada com anticorpos que se ligam a fosfatase tirosina de prote[°]nas humana beta, FTPHbeta, e assim regulam a sinalizaç²o celular angiog[®]ni ca que, por sua vez, regula a angiog[®]lnese.

A invenç²o est[®] relacionada com um anticorpo monoclonal isolado de acordo com a Reivindicaç²o 1 ou com um fragmento de ligaç²o ao antig[®]ni o isolado de um

anticorpo monoclonal de acordo com a Reivindica'2o 5. O anticorpo e fragmento de liga'2o ao antigeno ligam-se a fosfatase tirosina de prote'as humana beta, em que o referido anticorpo ou seu fragmento de liga'2o ao antigeno regula a sinaliza'2o celular angiogenica que, por sua vez, regula a angiogenese.

A inven'2o est® relacionada com um anticorpo ou fragmento de liga'2o ao antigeno de um anticorpo que se liga - primeira repeti'2o FN3 da fosfatase tirosina de prote'as humana beta, em que a primeira repeti'2o FN3 da fosfatase tirosina de prote'as humana beta possui a sequencia mostrada em SEQ ID NO: 11.

Numa realiza'2o, a inven'2o est® relacionada com um anticorpo em que o anticorpo e o anticorpo monoclonal R15E6 (Hibridoma de murganho, celulas do ba'o de Balbc (celulas B) depositado na American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA em 04 de Maio de 2006, designado ATCC No. PTA-7580).

Numa outra realiza'2o, o anticorpo ou fragmento de liga'2o ao antigeno e humanizado.

Numa outra realiza'2o, a inven'2o est® relacionada com um anticorpo, em que o anticorpo compreende os res'duos da regi'2o de liga'2o ao antigeno do anticorpo monoclonal R15E6 e e humanizado.

Numa outra realiza^{ção}, a inven^{ção} está relacionada com um fragmento de liga^{ção} ao antígeno de um anticorpo monoclonal, em que o fragmento compreende as regiões variáveis das cadeias pesada e leve.

A inven^{ção} está relacionada com um fragmento de liga^{ção} ao antígeno de um anticorpo monoclonal, em que o fragmento de liga^{ção} ao antígeno é um fragmento Fab.

São aqui igualmente divulgados métodos de tratamento de um distúrbio regulado pela angiogénese num indivíduo, compreendendo: identifica^{ção} de um indivíduo necessitado de regula^{ção} da angiogénese; e administra^{ção} ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou seu fragmento de liga^{ção} ao antígeno que se liga a FTHbeta e regula a angiogénese.

São também descritos métodos de tratamento de um distúrbio regulado por angiogénese num indivíduo, em que o distúrbio regulado pela angiogénese é um distúrbio por angiogénese elevada e é seleccionado do grupo que consiste em retinopatia diabética, degenerescência macular, cancro, anemia das células falciformes, sarcoidose, sífilis, pseudoxantoma elástico, doença de Paget, oclusão das veias, oclusão das artérias, doença obstrutiva das carótidas, uveíte crónica/vitrite, infecções por micobactérias, doença de Lyme, lúpus sistémico eritematoso, retinopatia de prematuridade, doença de Eales, doença de Behcet, infecções causadores de uma retinite ou coroidite, presumível

histoplasmose ocular, doença de Best, miopia, fossetas colobomatosas, doença de Stargardt, pars planite, descolamento crônico da retina, síndrome da hiperviscosidade, toxoplasmose, trauma e complicações pós-laser, doenças associadas com rubeose e vótreo-retinopatia proliferativa.

São igualmente descritos métodos de tratamento de um distúrbio regulado por angiogênese num indivíduo, em que o distúrbio regulado por angiogênese é um distúrbio por angiogênese elevada e é selecionado do grupo que inclui, mas não lhes está limitado, retinopatia diabética, degenerescência macular, cancro, artrite reumatóide, hemangiomas, doença de Osler-Weber-Rendu ou telangiectasia hemorrágica hereditária, e tumores sólidos ou do sangue.

São igualmente descritos métodos de tratamento de um distúrbio regulado por angiogênese num indivíduo, em que o distúrbio regulado por angiogênese é um distúrbio por angiogênese elevada e é selecionado do grupo de doenças inflamatórias intestinais como sejam doença de Crohn e colite ulcerativa, psoríase, sarcoidose, artrite reumatóide, hemangiomas, doença de Osler-Weber-Rendu ou telangiectasia hemorrágica hereditária, e tumores sólidos ou do sangue e síndrome da imunodeficiência adquirida.

São igualmente descritos métodos de tratamento de um distúrbio regulado por angiogênese num indivíduo, em que o distúrbio regulado por angiogênese é um distúrbio por angiogênese reduzida e é selecionado do grupo que inclui,

mas não lhes está limitado, isquemia do músculo esquelético ou do miocárdio, derrame cerebral, doença das artérias coronárias, doença vascular periférica, doença das artérias coronárias, doença cerebrovascular, neuropatia diabética e cicatriza'ção de feridas.

São igualmente descritos métodos de tratamento de um distúrbio regulado por angiogénese num indivíduo, em que o distúrbio regulado por angiogénese é um distúrbio por angiogénese reduzida e é seleccionado do grupo consistindo isquemia do músculo esquelético ou do miocárdio, derrame cerebral, doença das artérias coronárias, doença vascular periférica, doença das artérias coronárias.

São igualmente descritos métodos de tratamento de um distúrbio regulado por angiogénese reduzida num indivíduo, em que o distúrbio por angiogénese reduzida é doença vascular periférica.

São igualmente descritos métodos de tratamento de um distúrbio regulado por angiogénese reduzida num indivíduo, em que o distúrbio por angiogénese reduzida é doença das artérias coronárias.

Também são aqui descritas composições farmacêuticas, compreendendo: um anticorpo ou um seu fragmento que se liga a fosfatase tirosina de proteínas humana beta; e um veículo aceitável em termos farmacêuticos.

Também são aqui descritas composições

farmac,uticas, compreendendo: um anticorpo ou um seu fragmento que se liga a fosfatase tirosina de prote^onas humana beta, em que o anticorpo Ψ o anticorpo monoclonal R15E6; e um ve^oculo aceit^ovel em termos farmac,uticos.

S²o igualmente descritas composi^oes farmac,uticas, compreendendo: um anticorpo ou um seu fragmento que se liga a fosfatase tirosina de prote^onas humana beta, em que o anticorpo Ψ um anticorpo monoclonal tendo as mesmas, ou substancialmente as mesmas, caracter^osticas biol^ogicas de R15E6; e um ve^oculo aceit^ovel em termos farmac,uticos.

S²o igualmente descritas composi^oes farmac,uticas, compreendendo: um anticorpo ou um seu fragmento que se liga a fosfatase tirosina de prote^onas humana beta, em que o anticorpo ou o seu fragmento de liga^o ao antig^oni^o Ψ humanizado; e um ve^oculo aceit^ovel em termos farmac,uticos.

S²o igualmente descritas composi^oes farmac,uticas, compreendendo: um anticorpo ou um seu fragmento que se liga a fosfatase tirosina de prote^onas humana beta, em que o anticorpo compreende os res^oduos da regi^o de liga^o ao antig^oni^o do anticorpo monoclonal R15E6 e Ψ humanizado; e um ve^oculo aceit^ovel em termos farmac,uticos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Desenho e produção da proteína FTPH₃ ECD. (Painel A) Representação esquemática de FTPH₃ de tamanho completo e da proteína de fusão do domínio extracelular de FTPH₃-6His. (Painel B) Coloração com prata dos eluatos de imidazole de uma coluna de Ni-NTA carregada com o sobrenadante de células HEK293 transfectadas com um vector que dirige a expressão de ϕ ECD-6His. É detectada uma única banda de alto peso molecular consistente com a proteína HPTP-3 de células extracelulares-6His.

Figura 2. R15E6 reconhece FTPH₃ endógeno em células endoteliais. (Painel A) Lisados de células endoteliais foram imunoprecipitados com um anticorpo controlo (Pista 1), com R15E6 (Pista 2) ou com uma mistura de anticorpos anti-Tie2 e anti-VEGFR2 (Pista 3). Os imunoprecipitados foram resolvidos por SDS-PAGE, transferidos para uma membrana de PVDF e testados por transferência western com uma mistura de anticorpos R15E6, anti-Tie2 e anti-VEGFR2. Observou-se uma única banda de massa molecular elevada consistente com FTPH₃ usando R15E6 (Pista 2) e não com o anticorpo controlo (Pista 1) ou com a mistura de anti-Tie2 e anti-VEGFR2 (Pista 3). (Painel B) As células endoteliais foram sujeitas a análise por FACS com R15E6 (pico branco) ou com controlo sem anticorpo primário (pico preto). A alteração robusta na fluorescência indica que R15E6 se liga a FTPH₃ na superfície das células endoteliais intactas.

Figura 3. R15E6 estimula a activa'ção do receptor Tie2 em HUVEC. A activa'ção de Tie2 foi medida em células endoteliais humanas como descrito no Exemplo 4. R15E6 aumenta, de forma dependente da dose, tanto a activa'ção de Tie2 basal como a induzida por Ang1.

Figura 4. R15E6 estimula a sobrevivência de HUVEC. A sobrevivência de células endoteliais humanas com jejum de soro foi medida como descrito no Exemplo 4. Consistente com os seus efeitos sobre a activa'ção de Tie2, R15E6 aumenta, de forma dependente da dose, a sobrevivência células endoteliais basais e induzidas por Ang1 (Painel A). Ainda, R15E6 também aumenta, de forma dependente da dose, a sobrevivência de células endoteliais mediada por VEGF e FGF (Painéis B e C). Um anticorpo controlo é incapaz de aumentar a sobrevivência de células endoteliais (Painel D).

Figura 5. R15E6 estimula a migração de HUVEC. A migração das células endoteliais humanas foi medida como descrito no Exemplo 4. R15E6, numa forma dependente da dose, estimula a migração de células endoteliais basais e das induzidas por VEGF.

Figura 6. R15E6 estimula a morfogénese de capilares no ensaio de HUVEC/Formação de rebentos em esferas. A morfogénese de capilares de células endoteliais humanas foi medida no ensaio de formação de rebentos em

esferas como descrito no Exemplo 4. R15E6 estimula a morfogênese basal de capilares e a induzida por VEGF.

Figura 7. A análise por transferências Western localiza o epitopo de ligação a R15E6 na repetição N-terminal FN3 do domínio extracelular de FTPH β (Painel A) Por análise de transferências Western, R15E6 liga-se a todos os mutantes de truncagem C-terminal demonstrando que o epitopo de ligação está situado nas 2 repetições FN3 N-terminais. (Painel B) Análise de proteínas quiméricas murganho/humano também localiza o epitopo de ligação do R15E6 na repetição FN3 N-terminal de FTPH β .

Figura 8. A análise MSD confirma a localização do epitopo de ligação a R15E6 na repetição FN3 N-terminal do domínio extracelular de FTPH β . (Painel A) Através da análise MSD, R15E6 liga-se a todos os mutantes de truncagem C-terminal, confirmando que o epitopo de ligação está localizado nas 2 repetições FN3 N-terminais. (Painel B) A análise de proteínas quiméricas murganho/humano ainda confirma a localização do epitopo de ligação a R15E6 na repetição FN3 N-terminal de FTPH β .

Figura 9. A análise MSD demonstra que o fragmento Fab monovalente de R15E6 também se liga à repetição FN3 N-terminal de FTPH β . (Painel A) de modo semelhante ao anticorpo R15E6, o fragmento Fab de R15E6 liga-se a todos os mutantes de truncagem C-terminal confirmando que o epitopo de ligação está localizado nas 2 repetições FN3 N-

terminais. (Painel B) A análise das proteínas quiméricas murganho/humano ainda localiza o epítipo de ligação do fragmento Fab do R15E6 na repetição FN3 N-terminal de FTH6.

Figura 10. O fragmento Fab monovalente de R15E6 não estimula a activação de Tie2 e bloqueia a activação de Tie2 por R15E6 intacto.

Figura 11. O fragmento Fab de R15E6 potencialmente inibe a sobrevivência de células endoteliais. (Painel A) Comparativamente com o fragmento Fab controlo, o fragmento Fab de R15E6 potencialmente inibe a sobrevivência de células endoteliais. (Painel B) O efeito inibidor do fragmento Fab do R15E6 é reduzido por competição com R15E6 intacto.

Figura 12. O fragmento Fab de R15E6 inibe a migração de células endoteliais mediada por VEGF.

DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

Cada uma das sequências de nucleótidos e proteínas na listagem de sequências, juntamente com o correspondente número ou números de acesso Genbank ou Derwent, quando aplicável, e espécie de onde derivam, estão mostrados na Tabela I.

Tabela I

Descrição da sequência	SEQ ID NOS: Nucleotídeos, Proteína	Espécie	Equivalente No. de Acesso Genbank
Domínio extracelular de FTPHbeta com cauda de His e Gly	1, 2	Homo Sapiens	
Domínio extracelular de FTPHbeta de tamanho completo	3	Homo Sapiens	X54131 NM_002837
1/2 (AA1-730, FN3's) 775 aa	4	Homo Sapiens	
1/4 (AA1-376, FN3's) 421 aa	5	Homo Sapiens	
1/8 (AA1-202, FN3's) 247 aa	6	Homo Sapiens	
ECD1632 aa de murganho de tamanho completo	7	Mus musculus	NM_029928
Primeira FN3 humana- Murganho ✕	8	Quimer a Humano-murganho	
Segunda FN3 humana- Murganho ✕	9	Quimer a Humano-murganho	
Primeiras duas FN3 humanas, - Murganho ✕	10	Quimer a Humano-murganho	
Primeira repetição FN3, humana	11	Homo sapiens	

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada com anticorpos que se ligam a FTHbeta e suas utilizações.

Técnicas padronizadas podem ser usadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeos, e cultura de tecidos e transformação (e.g. electroporação, lipofecção). As técnicas de reação enzimática e purificação podem ser realizadas de acordo com as especificações do fabricante ou como normalmente realizado na arte ou como aqui descrito. As técnicas e procedimentos são, de um modo geral, realizadas de acordo com métodos convencionais conhecidos na arte e como descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo da presente especificação. A menos que definições específicas sejam dadas, a nomenclatura utilizada neste contexto e os procedimentos laboratoriais e técnicas de química analítica, química de síntese orgânica e química médica e farmacêutica aqui descritas são as conhecidas e normalmente usadas na arte. Podem ser usadas técnicas convencionais para a síntese química, análise química, preparação farmacêutica, formulação e entrega, e tratamento de doentes.

Os termos que se seguem, a menos que de outra forma seja indicado, deverão ser entendidos como possuindo os seguintes significados:

"Proteína," aqui usada de forma permutável com peptídeo e polipeptídeo. FTHbeta é fosfatase tirosina de

proteínas humana como definida na listagem de sequências. Nalgumas realizações, são usados vários fragmentos de FTPHbeta. Homólogos, ortólogos, fragmentos, variantes e mutantes da proteína e gene de FTPHbeta, como descrito abaixo, são considerados dentro do âmbito do termo "FTPHbeta".

Por "fragmento" pretende-se significar uma porção da sequência de nucleótidos ou de proteína. Os fragmentos podem manter a actividade biológica da proteína nativa. Os fragmentos de uma sequência nucleotídica são também úteis como sondas de hibridação e sequências iniciadoras ou para regular a expressão de um gene, e.g., RNA anti-sentido, siRNA ou micro RNA. Uma porção biologicamente activa pode ser preparada através do isolamento de uma porção de uma das sequências nucleotídicas da invenção, expressão da porção codificada (e.g., por expressão recombinante in vitro) e avaliação da actividade da proteína codificada.

Os familiarizados com a arte também reconhecerão que os genes e proteínas de espécies diferentes das listadas na listagem de sequências, particularmente espécies de vertebrados, podem ser úteis. Tais espécies incluem mas não lhes estão limitadas, murganhos, ratos, cobaias, coelhos, cães, porcos, cabras, vacas, macacos, chimpanzés, ovelhas, hamsters e peixe zebra. Os familiarizados com a arte ainda reconhecerão que para utilização de sondas das sequências de espécies conhecidas, cDNA ou sequências genómicas homólogas da sequência conhecida

podem ser obtidas da mesma espécie ou de uma espécie alternativa por métodos de clonagem conhecidos. Tais homólogos e ortólogos são considerados como úteis na realização da invenção.

Por "variantes" pretende-se significar sequências similares. Por exemplo, variantes conservadas podem incluir as sequências que, devido à degenerescência do código genético, codificam a sequência de aminoácidos de um dos polipeptídeos da invenção. Variantes alélicas naturais e variantes de "splicing" podem ser identificadas com o uso de técnicas conhecidas, e.g. com reação em cadeia da polimerase (PCR), análise de polimorfismos de nucleotídeos isolados (SNP) e técnicas de hibridação. Para isolar ortólogos e homólogos, são geralmente utilizadas condições de hibridação restritivas, ditadas por sequências específicas, comprimento da sequência, teor de guanina + citosina (GC) e outros parâmetros. Sequências nucleotídicas variantes também incluem sequências nucleotídicas obtidas por síntese química, e.g. derivadas através da utilização de mutagenese dirigida. As variantes podem conter sequências adicionais apenas do locus genómico ou em combinação com outras sequências.

As moléculas da invenção também incluem proteínas truncadas e/ou mutadas em que regiões da proteína não necessárias para a ligação do ligando ou sinalização foram deletadas ou modificadas. De forma semelhante, podem ser mutadas para modificar a sua ligação ao ligando ou

actividades de sinalização. Tais mutações podem envolver mutações não conservadas, deleções ou adições de aminoácidos ou domínios da proteína. As proteínas variantes podem ou não reter a actividade biológica. Tais variantes podem resultar de, e.g., polimorfismo genético ou da manipulação humana.

As proteínas de fusão são igualmente aqui consideradas. Usando métodos conhecidos, os familiarizados com a arte serão capazes de fazer proteínas de fusão das proteínas da invenção; estas, ainda que diferentes da forma nativa, podem ser úteis. Por exemplo, o parceiro de fusão pode ser uma sequência de polipept do sinal (ou líder) que emco-tradução ou emp s-tradução dirige a transferência da proteína do seu local de síntese para um outro local (e.g., o líder do factor α de levedura). Como alternativa, pode ser adicionado para facilitar a purificação ou identificação da proteína da invenção (e.g., poli-His, pept do Flag ou proteínas fluorescentes).

O termo "antigénio" refere-se a uma molécula ou uma por  o de uma molécula capaz de ser ligada por um agente de ligação selectivo, como seja um anticorpo, e ainda é capaz de ser usado num animal para produzir anticorpos capazes de se ligarem a um epitopo daquele antigénio. Um antigénio pode ter um ou mais epitopos.

O termo "epitopo" inclui qualquer determinante antig nico, de preferência um determinante polipeptídico,

capaz de se ligar especificamente a uma imunoglobulina ou a um receptor de células T. Em determinadas realizações, os determinantes epitópicos incluem grupos de superfície quimicamente activos como sejam aminoácidos, açúcares, lípidos, fosforilo ou sulfonilo e, em determinadas realizações, podem ter características de estrutura tridimensional específica, e/ou características de carga específicas. Um epitopo é uma região de um antígeno que é ligada por um anticorpo. Em determinadas realizações, um anticorpo é referido como se ligando especificamente a um antígeno quando ele preferencialmente reconhece o seu antígeno alvo numa mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas. Um anticorpo é também referido como se ligando especificamente a um antígeno quando apresenta maior afinidade para o antígeno que para outras moléculas relacionadas e/ou não relacionadas.

O termo "anticorpo" (Ab) como aqui usado inclui anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multi-específicos (e.g. anticorpos bispecíficos), anticorpos de cadeia simples, e.g. anticorpos de lama e camelo, fragmentos de anticorpo, e.g. fragmentos das regiões variáveis e/ou constantes, desde que apresentem uma actividade biológica pretendida, e.g. actividade de ligação ao antígeno. O termo "imunoglobulina" (Ig) é aqui usado de forma permutável com "anticorpo".

Um "anticorpo isolado" é um que foi identificado, e/ou separado, e/ou recuperado do seu ambiente natural.

A unidade básica do anticorpo de quatro cadeias é uma glicoproteína heterotetramérica composta por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas (um anticorpo IgM consiste em 5 unidades básicas de heterotetrameros juntamente com um polipeptídeo adicional designado cadeia J, e portanto contém 10 locais de ligação ao antígeno, enquanto os anticorpos IgA secretados podem polimerizar para formar montagens polivalentes compreendendo 2-5 das unidades básicas de 4 cadeias juntamente com uma cadeia J. No caso das IgGs, a unidade de quatro cadeias tem geralmente, cerca de 150 kilo Daltons (kDa). Cada cadeia L está ligada a uma cadeia H através de uma ligação covalente dissulfureto, ao mesmo tempo que as duas cadeias H estão ligadas uma à outra através de uma ou mais ligações dissulfureto, dependendo do isotipo da cadeia H. Cada cadeia H e L também possui pontes dissulfureto intracadeia regularmente espaçadas. Cada cadeia H possui no seu extremo N, um domínio variável (V_H) seguido de três domínios constantes (C_H) para cada uma das cadeias e $\therefore$ e quatro domínios C_H para os isotipos μ e δ . Cada cadeia L possui no extremo N, um domínio variável (V_L) seguido de um domínio constante (C_L) no seu outro extremo. V_L está alinhada com V_H e C_L está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada (C_H1). Crê-se que resíduos de aminoácidos particulares formem uma interface entre os domínios variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada. O emparelhamento de V_H e V_L em conjunto forma um único local de ligação ao antígeno. Para a estrutura e propriedades das diferentes classes de anticorpos, ver, e.g., Basic and

Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, 1994, página 71 e Capítulo 6.

A cadeia L de qualquer uma das espécies de vertebrado pode ser classificada como um de dois tipos claramente distintos, designados κ e λ , com base nas sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes. Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas (C_H), as imunoglobulinas podem ser classificadas em classes ou isotipos diferentes. Existem cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM possuidoras de cadeias pesadas designadas μ , δ , ϵ , γ e α , respectivamente. As classes γ e α são ainda divididas em subclasses com base em diferenças relativamente menores na sequência e função de C_H , e.g. os seres humanos expressam as seguintes subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Os membros da família Camelidae, e.g. lama, camelo e dromedários, possuem um único tipo de anticorpo, sem cadeias leves e ainda sem o domínio C_{H1} (Muyldermans, S., Rev. Mol. Biotechnol., 74, 277-302 (2001)). A região variável destes anticorpos de cadeia pesada é designada V_{HH} ou VHH, e constitui o fragmento de ligação ao antígeno intacto mais pequeno que se conhece (15 kDa) derivado de uma imunoglobulina funcional.

O termo "variável" refere-se ao facto de deter-

minados segmentos dos domínios variáveis diferem extensivamente em termos de sequência entre os diferentes anticorpos. O domínio V medeia a ligação ao antígeno e define a especificidade de um anticorpo particular para o seu antígeno. No entanto, a variabilidade não está aleatoriamente distribuída ao longo dos 110 aminoácidos dos domínios variáveis. Pelo contrário, as regiões V consistem segmentos relativamente invariantes designados regiões estruturais ('framework', FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiões curtas de extrema variabilidade designadas "regiões hipervariáveis" que têm cada uma 9-12 aminoácidos de comprimento. Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leve nativas compreendem cada um quatro FRs, largamente adoptando uma configuração de folha β , ligados por três regiões hipervariáveis, as quais formam ansas que ligam e nalguns casos fazem parte, a estrutura de folha β . As regiões hipervariáveis em cada uma das cadeias são mantidas juntas em estreita proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação ao antígeno dos anticorpos. Os domínios constantes não estão directamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas apresentam várias funções efectoras, como seja a participação do anticorpo na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

O termo "região hipervariável" quando aqui usado refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região

hipervariável geralmente compreende resíduos de aminoácidos de uma "região determinante de complementaridade" ou "CDR" (e.g. aproximadamente por volta dos resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) em V_L, e aproximadamente por volta dos resíduos 1-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) em V_H; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) e/ou os resíduos de uma região da "ansa hipervariável".

O termo "anticorpo monoclonal" como aqui usado refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, i.e., os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos excepto as possíveis mutações naturais que possam estar presentes em quantidades muito pequenas. Ao contrário das preparações de anticorpos policlonais, que incluem diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único epítopo, i.e. um único determinante antigénico. Para alcançar a sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos por poderem ser sintetizados sem contaminação com outros anticorpos. O adjectivo "monoclonal" não deve ser considerado como requerendo a produção do anticorpo através de qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais feitos na presente invenção podem ser preparados através da metodologia de hibridomas ou podem ser produzidos usando métodos de DNA recombinante em células bacterianas, animais eucarióticos ou células

vegetais (ver, e.g., Pat. U.S. No. 4,816,567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas fágicas de anticorpos, usando as técnicas disponíveis, e.g. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991).

Os anticorpos monoclonais aqui tratados incluem anticorpos "quiméricos" em que uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga de sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencentes a uma classe ou subclasse de anticorpos particulares, enquanto o restante das cadeias é idêntico ou homólogo de sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma outra espécie ou pertencente a uma outra classe ou subclasse de anticorpos, assim como fragmentos de tais anticorpos, desde que apresentem a actividade biológica pretendida (ver Pat. U.S. No. 4,816,567; e Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855 (1984)).

Um "fragmento de anticorpo" compreende uma porção de um anticorpo multimerico, de preferência a região de ligação ao antígeno ou variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem Fab, Fab', F(ab')₂, dímeros e trómeros de conjugados Fab, Fv, scFv, minicorpos,; diacorpos, triacorpos e tetracorpos; anticorpos lineares (Ver Hudson et al, Nature Med. 9, 129-134 (2003)).

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que possui um local de ligação ao antígeno completo. Este fragmento consiste num dígito de um domínio da região variável de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve em associação estreita não covalente. Do enrolamento destes dois domínios surgem seis ansas hipervariáveis (3 ansas de cada uma das cadeias H e L) que contribuem com resíduos de aminoácidos para a ligação ao antígeno e conferem ao anticorpo especificidade da ligação ao antígeno. No entanto, mesmo um domínio variável simples (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicas de um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e se ligar ao antígeno, e é capaz de portanto estar incluído na definição de Fv.

"Fv de cadeia simples" também abreviado como "sFv" ou "scFv" são fragmentos de anticorpos que compreendem os domínios V_H e V_L de anticorpos ligados numa única cadeia polipeptídica. De preferência, o polipeptídeo sFv ainda compreende um elemento de ligação peptídico entre os domínios V_H e V_L que permite ao sFv formar a estrutura pretendida para ligação ao antígeno.

Os termos "diacorpos, triacorpos e tetracorpos" referem-se a pequenos fragmentos de anticorpos preparados através da construção de fragmentos de sFv com pequenos elementos de ligação (cerca de 5-10 resíduos) entre os domínios V_H e V_L de modo que é conseguido o emparelhamento intercadeias mas não intracadeias dos domínios V , resultando num fragmento multivalente.

O termo "anticorpo humanizado" ou "anticorpo humano" refere-se a anticorpos que compreendem sequências das regiões variáveis das cadeias pesada e leve de uma espécie não humana (e.g. um murganhão) mas em que pelo menos uma porção da sequência V_H e/ou V_L foi alterada para ser mais do "tipo humano", i.e. mais semelhante a sequências variáveis da linha germinativa humana. Um tipo de anticorpo humanizado é um anticorpo enxertado com CDR, em que as sequências CDR humanas são introduzidas em sequências V_H e V_L não humanas para substituir as correspondentes sequências CDR não humanas. Os meios para a preparação de anticorpos quiméricos enxertados com CDR e humanizados são conhecidos dos familiarizados com a arte (ver, e.g., Pat. U.S. Nos. 4,816,567 e 5,225,539). Um método para a preparação de anticorpos humanos emprega o uso de animais transgênicos, como seja um murganhão transgênico. Estes animais transgênicos possuem uma porção substancial do genoma produtor do anticorpo humano inserido no seu próprio genoma e a produção dos anticorpos endógenos do animal é tornada deficiente relativamente à produção de anticorpos. Métodos para a preparação de tais animais transgênicos são conhecidos na arte. Tais animais transgênicos podem ser produzidos usando tecnologia XenoMouse^{RTM} ou usando uma abordagem de "minilocus". Métodos para a produção de XenoMouse^{RTM} estão descritos nas Patentes U.S. Nos. 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598 e 6,075,181. Métodos para a produção de animais transgênicos usando a abordagem de "minilocus" estão descritos nas Patentes U.S. Nos. 5,545,807, 5,545,806 e 5,625,825, e WO 93/12227.

A humanização de um anticorpo não humano tornou-se rotina nos últimos anos, e está agora dentro do conhecimento dos familiarizados com a arte. Várias companhias oferecem serviços para produzir um anticorpo humanizado, e.g. Xoma, Aries, Medarex, PDL, e Cambridge Antibody Technologies. Os protocolos de humanização estão extensivamente descritos na literatura técnica, e.g., Kipriyanov and Le Gall, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26, pp 39-60 (2004), Humana Press, Totowa, NJ; Lo, *Métodos Mol. Biol.*, Vol. 248, pp 135-159 (2004), Humana Press, Totowa, NJ; Wu et al, *J. Mol. Biol.* 294, 151-162 (1999).

Em determinadas realizações, os anticorpos da presente invenção podem ser expressos em linhas celulares diferentes das linhas celulares de hibridomas. Sequências codificadoras de anticorpos particulares podem ser usadas para transformação de uma célula hospedeira de mamífero adequada por métodos conhecidos para a introdução de polinucleotídeos numa célula hospedeira, incluindo, por exemplo, encapsulação do polinucleotídeo num vírus (ou num vector viral) e transdução de uma célula hospedeira com o vírus (ou vector) ou através de processos de transfecção conhecidos na arte, como exemplificado nas Pat. U.S. Nos. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, e 4,959,455. O processo de transformação usado pode depender do hospedeiro a ser transformado. Métodos para a introdução de polinucleotídeos heterólogos em células de mamífero são conhecidos na arte e incluem mas não lhes estão limitados, transfecção mediada por dextrano, precipitação com fosfato de cálcio,

transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, electroporação, encapsulação de um ou mais polinucleótidos em lipossomas, mistura de ácidos nucleicos com lípidos carregados positivamente e microinjecção directa do DNA nos núcleos.

Uma molécula de ácido nucleico codificadora da sequência de aminoácidos da região constante da cadeia pesada, uma região variável da cadeia pesada, uma região constante da cadeia leve, ou uma região variável da cadeia leve de um anticorpo ou um seu fragmento numa combinação adequada caso se pretenda, é/são inseridos num vector de expressão adequado usando técnicas de ligação convencionais. A região constante da cadeia pesada ou da cadeia leve do anticorpo pode ser apenas ao extremo C da região variável adequada e é ligada a um vector de expressão. O vector é tipicamente seleccionado para ser funcional na célula hospedeira particular empregue (i.e. o vector é compatível com a maquinaria da célula hospedeira de modo que a amplificação do gene e/ou expressão do gene possam ocorrer). Para uma revisão dos vectores de expressão, ver Métodos Enzymol. vol. 185 (Goeddel, ed.), 1990, Academic Press.

Os anticorpos e seus fragmentos da presente invenção ligam-se a FTHbeta e regulam a angiogénese. Como definido acima, o termo anticorpo é usado para significar um fragmento de ligação ao antígeno. Os usos de tais

anticorpos e fragmentos de ligação ao antigénio são ainda descritos abaixo.

Ensaio de rastreio que usam modelos in vitro e in vivo de angiogénese

Os anticorpos da invenção podem ser testados em ensaios de angiogénese que são conhecidos na arte. Tais ensaios incluem ensaios in vitro que medem substitutos do crescimento de vasos sanguíneos em células em cultura ou formação de estruturas vasculares de explantes de tecidos e ensaios in vivo que medem o crescimento de vasos sanguíneos directamente ou indirectamente (Auerbach, R., et al. (2003). Clin Chem 49, 32-40, Vailhe, B., et al. (2001). Lab Invest 81, 439-452).

Modelos in vitro de angiogénese.

A maioria destes ensaios emprega células endoteliais em cultura ou explantes de tecidos e medição do efeito dos agentes nas respostas celulares "angiogénicas" ou na formação de estruturas do tipo capilares sanguíneos. Exemplos de ensaios de angiogénese in vitro incluem, mas não lhes estão limitados, migração e proliferação de células endoteliais, formação de tubos capilares, formação de rebentos endoteliais, o ensaio do explante do anel aórtico e o ensaio do arco aórtico de pintos.

Modelos in vivo de angiogénese

Nestes ensaios, os agentes ou anticorpos são administrados localmente ou sistemicamente na presença ou ausência de factores de crescimento (i.e. VEGF ou angiopoietina 1) e o crescimento de novos vasos sanguíneos é medido através da observação directa ou através da medição de um marcador substituto como seja o teor de hemoglobina ou um indicador fluorescente. Exemplos de angiogénese, incluem mas não lhes estão limitados, ensaio da membrana corioalantóica de pintos, ensaio de angiogénese da córnea e o ensaio do tapão de MATRIGEL.

Tratamento de distúrbios regulados por angiogénese

O termo "regular" é definido de acordo com os seus significados aceites dos dicionários. Assim, o significado do termo "regular" inclui, mas não lhes está limitado, regular positivamente ou regular negativamente, fixar, ordenar ou uniformizar, governar, ou dirigir através de vários meios. Num caso, um anticorpo pode ser usado num método para o tratamento de um "distúrbio por angiogénese elevada" ou "distúrbio por angiogénese reduzida". Como aqui usado, um "distúrbio por angiogénese elevada" é aquele que envolve angiogénese indesejada ou elevada nas manifestações biológicas da doença, distúrbio e/ou condição; na cascata biológica que conduz ao distúrbio; ou como um sintoma do distúrbio. De forma semelhante, o "distúrbio por angiogénese reduzida" é aquele que envolve angiogénese indesejada ou reduzida nas manifestações biológicas da doença, distúrbio e/ou condição; na cascata biológica que conduz ao distúrbio; ou como um sintoma do distúrbio.

gênese reduzida" é um que envolve angiogênese desejável ou angiogênese reduzida nas manifestações biológicas. Este "envolvimento" da angiogênese num distúrbio por angiogênese elevada/reduzida inclui, mas não lhes estão limitados, os seguintes:

(1) A angiogênese como uma "causa" do distúrbio ou manifestação biológica, em que o nível de angiogênese é elevado ou reduzido geneticamente, por infecção, por auto-imunidade, trauma, causas bioquímicas, estilo de vida ou por outras causas.

(2) A angiogênese como parte da manifestação observável da doença ou distúrbio. Ou seja, a doença ou distúrbio é medida em termos da angiogênese aumentada ou reduzida. De um ponto de vista clínico, a angiogênese indica a doença; no entanto, a angiogênese não necessita de ser "marca registrada" da doença ou distúrbio.

(3) A angiogênese é parte da cascata bioquímica ou celular que resulta na doença ou distúrbio. Neste contexto, a regulação da angiogênese pode interromper a cascata e pode controlar a doença. Exemplos não limitantes de distúrbios regulados por angiogênese que podem ser tratados pela presente invenção são aqui descritos abaixo.

Os anticorpos da presente invenção podem ser usados para tratar doenças associadas a neovascularização retinal/corooidal que incluem, mas não lhes estão limitadas,

retinopatia diabética, degenerescência macular, cancro, anemia das células falciformes, sarcoidose, sífilis, pseudoxantoma elástico, doença de Paget, oclusão das veias, oclusão das artérias, doença obstrutiva das carótidas, uveíte crônica/vitrite, infecções por micobactérias, doença de Lyme, lúpus sistêmico eritematoso, retinopatia de prematuridade, doença de Eales, doença de Behcet, infecções causadores de uma retinite ou coroidite, presumível histoplasmose ocular, doença de Best, miopia, fossetas colobomatosas, doença de Stargardt, pars planite, descolamento crônico da retina, síndrome da hiperviscosidade, toxoplasmose, trauma e complicações pós-laser. Outras doenças incluem mas não lhes estão limitadas, doenças associadas a rubeose (neovascularização da íris) e doenças causadas pela proliferação anormal de tecido fibrovascular ou fibroso incluindo todas as formas de vitreo-retinopatia proliferativa, associada ou não a diabetes.

Os anticorpos da presente invenção podem ser usados para tratar doenças associadas a inflamação crônica. As doenças com sintomas de inflamação crônica incluem doenças inflamatórias intestinais, como doença de Crohn e colite ulcerativa, psoríase, sarcoidose e artrite reumatóide. A angiogênese é um elemento chave que estas doenças inflamatórias crônicas possuem em comum. A inflamação crônica depende da formação contínua de rebentos capilares para manter um influxo de células inflamatórias. O influxo e presença das células inflamatórias produzem granulomas e, assim, mantêm o estado inflamatório crônico.

A inibição da angiog nese pelas composi es e métodos da presente invenção evitar  a formação dos granulomas e aliviam a doença.

A doença de Crohn e a colite ulcerativa são caracterizadas por inflamação cr nica e angiog nese em vários locais no tracto gastrointestinal. A doença de Crohn caracteriza-se por inflamação granulomatosa cr nica ao longo do tracto gastrointestinal consistindo em novos rebentos capilares rodeados por um cilindro de células inflam t rias. A prevenção da angiog nese inibe a formação dos rebentos e evita a formação de granulomas. A doença de Crohn ocorre como uma doença inflam t ria cr nica transmural que afecta principalmente o  leo distal e o cólon mas pode também ocorrer em qualquer parte do tracto gastrointestinal desde a boca até ao  nus e área perianal. Os doentes com doença de Crohn geralmente possuem diarreia cr nica associada a dor abdominal, febre, anorexia, perda de peso e inchaço abdominal. A colite ulcerativa é igualmente uma doença inflam t ria cr nica e ulcerativa, não específica, que surge na mucosa do cólon e que se caracteriza pela presença de diarreia com sangue.

As doenças inflam t rias intestinais também apresentam manifesta es extra-intestinais tais como lesões da pele. Tais lesões são caracterizadas por inflamação e angiog nese e podem ocorrer em muitos locais para além do tracto gastrointestinal. Os anticorpos da presente invenção podem ser capazes de tratar estas lesões através da

prevenção da angiogénese, reduzindo assim o influxo de células inflamatórias e a formação da lesão.

Sarcoidose é uma outra doença inflamatória crónica que se caracteriza por um distribuição granulomatosa multi-sistema. Os granulomas desta doença podem formar-se em qualquer local do corpo e assim os sintomas dependem da localização dos granulomas e se a doença está activa. Os granulomas são criados pelos rebentos angiogénicos de capilares que proporcionam um fornecimento constante de células inflamatórias.

Os anticorpos da presente invenção podem também tratar as condições inflamatórias crónicas associadas com psoríase. A psoríase, uma doença da pele, é uma outra doença crónica e recorrente que se caracteriza por pápulas e placas de vários tamanhos. A prevenção da formação de novos vasos sanguíneos, necessária para manter as lesões características, conduz ao alívio dos sintomas.

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crónica que se caracteriza pela inflamação não específica das articulações periféricas. Pensa-se que os vasos sanguíneos no forro sinovial das articulações sofram angiogénese. Para além de serem formadas novas redes de vasculatura, as células endoteliais libertam factores e espécies de oxigénio reactivas que conduzem ao crescimento de pannus (tecido fibrovascular) e destruição da cartilagem. Os factores envolvidos na angiogénese podem

contribuir activamente para o estado de inflamação crónica da artrite reumatóide e ajudar a mantê-lo. Outras doenças que podem ser tratadas de acordo com a presente invenção são os hemangiomas, doença de Osler-Weber-Rendu ou telangiectasia hemorrágica hereditária, e tumores sólidos ou do sangue e síndrome da imunodeficiência adquirida.

Os anticorpos da presente invenção podem também ser usados para tratar um "distúrbio por angiogénese reduzida". Como aqui usado, um "distúrbio por angiogénese reduzida" é aquele em que a angiogénese seria considerada benéfica para tratar uma doença, distúrbio e/ou condição. O distúrbio é um que se caracteriza por tecido que sofre ou está em risco de sofrer danos isquémicos, infecção, e/ou má cicatrização, que resulta quando o tecido é desprovido de um fornecimento adequado de sangue oxigenado devido a circulação inadequada. Como aqui usado, "tecido" é usado no seu sentido mais lato, para incluir, mas não lhes está limitado, o seguinte: tecido cardíaco, como sejam miocárdio e ventrículos cardíacos; tecido erétil; músculo esquelético; tecido neurológico, como seja o do cerebelo; órgãos internos, como sejam o cérebro, coração, pâncreas, fígado, bado e pulmão; ou áreas generalizadas do corpo como sejam os membros na sua totalidade, um pé ou apêndices distais tais como os dedos da mão ou do pé.

Métodos de vascularização de tecido isquémico

Os anticorpos da presente invenção podem ser

usados num método de vascularização de tecido isquémico. Como aqui usado, "tecido isquémico," significa tecido desprovido de fluxo sanguíneo adequado. Exemplos de tecido isquémico incluem, mas não lhes estão limitados, tecido sem fornecimento de sangue adequado resultante de enfartes do miocárdio e cerebrais, isquemia mesentérica ou dos membros, ou o resultado de uma oclusão vascular ou estenose. Num exemplo, a interrupção do fornecimento de sangue oxigenado pode ser causada por oclusão vascular. Tal oclusão vascular pode ser causada por arteriosclerose, trauma, procedimentos cirúrgicos, doença e/ou outras etiologias. Técnicas de rotina convencionais estão disponíveis para determinar se um tecido está em risco de sofrer danos isquêmicos derivados de oclusão vascular indesejável. Por exemplo, na doença do miocárdio estes métodos incluem uma variedade de técnicas de imagiologia (e.g., metodologias com marcadores radioactivos, raios x, e MRI) e testes fisiológicos. Assim a indução de angiogénese é um meio eficaz de prevenir ou atenuar isquemia em tecidos afectados ou em risco de serem afectados por oclusão vascular. Ainda, o tratamento de isquemia do músculo esquelético e do miocárdio, derrame cerebral, doença das artérias coronárias, doença vascular periférica, doença das artérias coronárias, é totalmente contemplado.

Os familiarizados com a arte de utilização de técnicas convencionais podem medir a vascularização do tecido. Exemplos não limitantes da medição da vascularização de tecidos num indivíduo incluem SPECT (tomografia

computadorizada por emissão de fot o  nico); PET (tomografia por emissão de positrões); MRI (imagiologia de ressonância magnética); e combinação dos mesmos, através da medição do fluxo sanguíneo para o tecido antes e após o tratamento. A angiografia pode ser usada como uma avaliação da vascularidade macroscópica. A avaliação histológica pode ser usada para quantificar a vascularidade ao nível dos pequenos vasos. Estas e outras técnicas estão discutidas em Simons, et al., "Clinical trials in coronary angiogenesis," Circulation, 102, 73-86 (2000).

Métodos de reparação de tecidos

Os anticorpos da presente invenção podem ser usados num método de reparação de tecidos. Como aqui usado, "reparação de tecidos" significa promoção da reparação de tecidos, regeneração, crescimento e/ou manutenção incluindo, mas não lhes estando limitados, reparação de feridas ou engenharia de tecidos. Os familiarizados com a arte saberão que a formação de novos vasos sanguíneos   necessária para a reparação de tecidos. Por sua vez, o tecido pode ser danificado através de lesões traumáticas ou condições incluindo artrite, osteoporose e outros distúrbios esqueléticos e queimaduras, mas não lhes estão limitados. O tecido pode também ser danificado por lesões causadas por procedimentos cirúrgicos, irradiação, laceração, químicos tóxicos, infecções virais ou bacterianas ou queimaduras. Tecido necessitado de reparação também inclui feridas não cicatrizantes. Exemplos de feridas não cicatrizantes

incluem úlceras da pele que não cicatrizam resultantes de patologia diabética; ou fracturas que não cicatrizam facilmente.

Os anticorpos podem também ser utilizados na reparaç²o de tecidos no contexto de procedimentos de regeneraç²o de tecidos guiados (GTR). Tais procedimentos s²o actualmente usados pelos familiarizados com a arte para acelerar a cicatrizaç²o de feridas após procedimentos cirúrgicos invasivos.

Os anticorpos podem ser usados num método de promoç²o da reparaç²o de tecidos caracterizado pela estimulaç²o do crescimento de tecidos durante o processo de engenharia de tecidos. Como aqui usado, "engenharia de tecidos" é definido como a criaç²o, desenho e fabricaç²o de dispositivos próstéticos biológicos, em combinaç²o com materiais sintéticos ou naturais, para aumentar ou substituir tecidos e órgãos do corpo. Assim o presente método pode ser usado para aumentar o desenho e crescimento de tecidos humanos fora do corpo para posterior implantaç²o na reparaç²o ou substituiç²o de tecidos doentes. Por exemplo, os anticorpos podem ser úteis na promoç²o do crescimento de substituíveis de enxertos de pele que s²o usados como terapia no tratamento de queimaduras.

Num outro caso de engenharia de tecidos, os anticorpos da presente invenç²o podem ser incluídos em dispositivos, com células ou sem células, que induzem a

regenera'2o de tecidos humanos funcionais quando implantados num local que requer regenera'2o. Como anteriormente discutido, a regenera'2o de tecidos conduzida por biomateriais pode ser usada para promover novo crescimento 6sseo, por exemplo em doen'a periodontal. Assim os anticorpos podem ser usados para promover o crescimento de tecidos reconstitu'2os montados em configura'2es tridimensionais no local de uma ferida ou outro tecido necessitado de tal repara'2o.

Num outro caso de engenharia de tecidos, os anticorpos podem ser inclu'2os em sistemas externos ou internos contendo tecidos humanos destinados a substituir a fun'2o de tecidos internos doentes. Esta abordagem envolve isolamento de c6llulas do corpo, sua substitui'2o com matrizes estruturais e implanta'2o do novo sistema dentro do corpo ou usando o sistema fora do corpo. Por exemplo, os anticorpos podem ser inclu'2os num enxerto vascular forrado de c6llulas para promover o crescimento das c6llulas contidas no enxerto. Prev, -se que os m6todos da inven'2o possam ser usados para aumentar a repara'2o, regenera'2o e engenharia de tecidos em produtos tais como cartilagem e osso, tecidos do sistema nervoso central, m6sculo, f6gado e c6llulas dos ilh6us pancre@ticos (produtoras de insulina).

Formula'2es farmac,uticas e m6todos para o seu uso

Os anticorpos da inven'2o podem ser administrados a indiv'2os para tratar ou prevenir doen'as ou dist6rbios

que s²o regulados pelos genes e prote^onas da inven²o. O termo "tratamento" $\P$ aqui usado para significar que a administra²o de um composto da presente inven²o mitiga uma doen^a ou um dist^orbio num hospedeiro. Assim, o termo "tratamento" inclui preven²o da ocorr^encia de um dist^orbio num hospedeiro, particularmente quando o hospedeiro tem predisposi²o para adquirir a doen^a mas ainda n²o foi diagnosticado com a doen^a; inibi²o do dist^orbio; e/ou al^ovio ou revers²o do dist^orbio. Na medida em que os m^ultodos da presente inven²o s²o dirigidos $\bar{}$ preven²o de dist^orbios, $\P$ entendido que o termo "prevenir" n²o requer que o estado da doen^a seja completamente contrariado. (Ver Webster' s Ninth Collegiate Dictionary.) Em vez disso, como aqui usado, o termo preven²o refere-se $\bar{}$ capacidade do familiarizado com a arte identificar uma popula²o que que $\P$ suscept^ovel aos dist^orbios, de modo que a administra²o dos compostos da presenta inven²o pode acontecer antes do estabelecimento de uma doen^a. O termo n²o implica que o estado de doen^a seja completamente evitado. Os compostos identificados atrav^us dos m^ultodos de rastreio da presente inven²o podem ser administrados conjuntamente com outros compostos.

A seguran^a e a efic^acia terap^utica dos compostos identificados podem ser determinadas atrav^us de procedimentos convencionais usando tecnologias in vitro ou in vivo. Os compostos que apresentam grandes ^ondices terap^uticos podem ser preferidos, ainda que compostos com ^ondices terap^uticos mais baixos possam ser β teis se o

nºvel de efeitos secundários for aceitável. Os dados obtidos a partir das técnicas toxicológicas de farmacológicas in vitro e in vivo podem ser usados para formular a gama das doses.

A eficácia de um composto pode ainda ser avaliada em modelos animais ou em ensaios clínicos de doentes com angiogénese desregulada ou inadequadamente regulada.

Como aqui usado, "veículo aceitável em termos farmacêuticos" destina-se a incluir todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e retardadores da absorção e similares, compatíveis com a administração farmacêutica. O uso de tais meios e agentes para substâncias activas em termos farmacêuticos é conhecido na arte. Excepto se qualquer meio ou agente convencional for incompatível com o composto activo, tais meios podem ser usados nas composições da invenção. Compostos activos suplementares podem ser igualmente incorporados nas composições. Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com a via de administração a que se destina. Exemplos de vias de administração incluem a administração parentérica, e.g. intravenosa, intradérmica, subcutânea, a oral (e.g., inalação), transdérmica (tópica), transmucosal e rectal. As soluções ou suspensões usadas para aplicação parentérica, intradérmica ou subcutânea podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril, como seja água para injeção, soro fisiológico,

Às vezes fixados, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou metilparabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminotetracético; também tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para ajustar a tonicidade como seja cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, como seja ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parentérica pode ser usada para encher ampolas, seringas descartáveis ou reservatórios de múltiplas doses feitos em vidro ou plástico.

As composições farmacêuticas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Para administração intravenosa, veículos adequados incluem soro fisiológico, água bacteriostática, CREMOPHOR ELÚ (BASF, Parsippany, N.J.) ou soro fisiológico tamponado com fosfatos (PBS). Em todos os casos, a composição deve ser estável e deverá ser fluida até ao ponto de existir fácil seringabilidade. Deve ser estável nas condições de produção e armazenamento e deve estar preservada contra a acção contaminante de microrganismos tais como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, e polietilenoglicol líquido e similares), e suas misturas adequadas. A fluidez correcta

pode ser mantida, por exemplo, através do uso de um revestimento como seja a lecitina, através da manutenção do tamanho de partículas necessário no caso da dispersão e através do uso de tensioactivos. A prevenção da acção de microrganismos pode ser conseguida através de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, e similares. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, poliósmóticos tais como manitol, sorbitol e cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injectáveis pode ser conseguida através da inclusão na composição de um agente que retarde a absorção, por exemplo, monostearato de alumínio e gelatina.

As soluções injectáveis estéreis podem ser preparadas através da incorporação do composto activo na quantidade necessária num solvente adequado com um ou uma combinação dos ingredientes acima enumerados, conforme necessário, seguido de esterilização por filtração. De um modo geral, as dispersões são preparadas através da incorporação do composto activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários. No caso dos fármacos estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são a secagem sob vácuo e liofilização que dão um fármaco do ingrediente activo mais qualquer ingrediente adicionado pretendido a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração.

A administração sistêmica pode também ser através de meios transmucosais ou transdérmicos. Para administração transmucosal ou transdérmica, são usados na formulação penetrantes adequados - barreira a ser permeada. Tais penetrantes são de modo geral conhecidos na arte e incluem, por exemplo, para administração transmucosal, detergentes, sais biliares e derivados do ácido fusídico. A administração transmucosal pode ser conseguida usando sprays nasais ou supositórios. Para administração transdérmica, os compostos activos são formulados em pomadas, bálsamos, géis ou cremes como conhecido de modo geral na arte.

Os compostos podem também ser preparados na forma de supositórios (e.g. com bases convencionais para supositórios como sejam manteiga de cacau e outros glicéridos) ou enemas de retenção para entrega rectal.

Numa realização, os compostos activos são preparados com veículos que proteger o composto contra a eliminação rápida do corpo, como seja uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes e sistemas de entrega microencapsulados. Podem ser usados polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, como sejam acetato de etileno vinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Métodos para a preparação de tais formulações serão aparentes para os familiarizados com a arte. Os materiais podem também ser obtidos comercialmente - Alza Corporation e - Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensões de lipossomas (incluindo

lipossomas direccionados para células infectadas com anticorpos monoclonais contra antigenos virais) podem ser igualmente usados como veículos aceitáveis em termos farmacuticos. Estes podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos dos familiarizados com a arte, por exemplo, como descrito na Patente U.S. No. 4,522,811.

É especialmente vantajoso formular composições orais ou parentéricas na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade da dosagem. "Forma de dosagem unitária" como aqui usado, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para o indivíduo a ser tratado, cada unidade contendo uma quantidade previamente determinada do composto activo calculada para produzir o efeito teraputico pretendido em associação com o veículo farmacutico adequado. A especificação para as formas de dosagem unitárias são ditadas e estão directamente dependentes das características únicas do composto activo e do efeito teraputico particular a ser atingido, e das limitações inerentes na arte de formulação de tal composto activo para o tratamento de indivíduos.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Produção do domínio extracelular da proteína FTPH.

Métodos: FTPH de tamanho completo foi clonada a

partir de uma biblioteca de placenta humana de acordo com as instruções do fabricante (Origene). O clone é idêntico a um clone de cDNA anteriormente descrito (acesso Genbank # X54131) excepto faltar a repetição FNIII #5. Um cDNA codificador da totalidade do domínio extracelular solúvel (ECD) de FTHF foi clonado por PCR a partir do cDNA de tamanho completo (ver sequência abaixo) codificador dos AA 1-1534 com a adição de His-His-His-His-His-His-Gly (6His-Gly) C-terminal (SEQ ID NO: 1). O cDNA resultante foi clonado nos vectores de expressão de mamífero para a expressão transitória (pShuttle-CMV) ou estável (pcDNA3.1(-)) em células HEK293. Para obter FTHF ECD (FTHF ECD) purificada, as células HEK293 transfectadas com um vector de expressão de FTHF ECD foram incubadas em OptiMEM sem soro (Gibco) durante 24 horas em condições de crescimento normais. O meio condicionado foi então recuperado, centrifugado para remover detritos (1000 rpm x 5 minutos), e 1 ml de agarose Ni-NTA lavada (Qiagen) (500 µL de material compactado) foi adicionado a 10 ml de meio clarificado e deixado a agitar durante a noite a 4°C. No dia seguinte, a mistura foi carregada numa coluna e lavada com 20 volumes de coluna de NaH₂PO₄ 50 mM NaCl 300 mM Imidazole 20 mM pH 8. A proteína do domínio extracelular de FTHF purificada (SEQ ID NO: 2) foi então eluída em seis fracções com 200 µL/eluição em NaH₂PO₄ 50 mM NaCl 300 mM Imidazole 250 mM pH 8. As fracções foram analisadas relativamente ao seu teor de proteína usando electroforese em gel de SDS-poliacrilamida desnaturante e redutor e detectado por coloração com prata (Invitrogen) e confirmado por espectrometria de massa.

Resultados: Para desenvolver um anticorpo contra o domínio extracelular de FTPH ϕ , foram desenvolvidos vectores de express²o que dirigem a express²o de uma prote^ona do domínio extracelular de FTPH ϕ etiquetada com 6-His (Figura 1, Painel A). Subsequentemente, a prote^ona do domínio extracelular de FTPH ϕ etiquetada com 6-His foi purificada at^o perto da homogeneidade (Figura 1, Painel B) a partir do meio condicionado das c^lulas HEK293 transfectadas com o vector de express²o.

Exemplo 2. Gera²o de anticorpos monoclonais contra o domínio extracelular de FTPH ϕ .

Métodos: Para a produ²o do imunog^oni o domínio extracelular de FTPH ϕ , a prote^ona do domínio extracelular de FTPH ϕ etiquetada com 6-His purificada foi conjugada com tiroglobulina porcina (Sigma) usando qu^omica de acoplagem EDC (Hockfield, S. et al., (1993) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Volume 1 pp. 111-201, Immunocytochemistry). O conjugado do domínio extracelular de FTPH ϕ -tiroglobulina foi dialisado contra PBS, pH 7,4. Murganhos Balb/c adultos foram ent²o imunizados subcutaneamente com o conjugado (100-200 μ g) e adjuvante completo de Freund numa mistura de 1:1. Ap^os 2-3 semanas, os murganhos foram injectados intraperitonealmente ou subcutaneamente com adjuvante incompleto de Freund e o conjugado numa mistura de 1:1. A inject²o foi repetida ^os 4-6 semanas. Os soros foram colhidos dos murganhos 7 dias ap^os a terceira inject²o e testados relativamente ^o imuno-reactividade

contra o antígeno domínio extracelular de FTPH₆ por ELISA e transferência western. Os murghos que apresentaram uma boa resposta contra o antígeno receberam um reforço através de uma única injeção intra-baço com 50 µl da proteína domínio extracelular de FTPH₆ purificada, misturada a 1:1 com hidróxido de alumínio, usando uma agulha extra longa de 31 gauge (Goding, J. W, (1996) Monoclonal Antibodies: Principles and Practices. Third Edition, Academic Press Limited. p.145). Resumidamente, os murghos foram anestesiados com 2,5% de avertina, e criou-se uma incisão de 1 centímetro oblôqua na pele da parede do corpo esquerda. A mistura de antígeno foi administrada através da inserção da agulha da porção posterior para a porção anterior do baço numa injeção longitudinal. A parede do corpo foi suturada e a pele fechada com duas molas pequenas de metal. Os murghos foram monitorizados relativamente a uma recuperação segura. Quatro dias após cirurgia o baço do ratinho foi removido e suspensões de células isoladas foram preparadas para fusão com células de mieloma de murgho para a criação das linhas celulares de hibridoma (Spitz, M, (1986) Métodos In Enzymology, Volume 121. Eds. John J, Lagone and Helen Van Vunakis. PP.33-41 (Academic Press, New York, NY)). Os hibridomas resultantes foram cultivados em meio modificado de Dulbecco (Gibco) suplementado com 15 % de soro fetal bovino (Hyclone) e hipoxantina, aminoptericina e timidina.

O rastreio de hibridomas positivos começou 8 dias após a fusão e continuou durante 15 dias. Os hibridomas

produtores de anticorpos anti-domínio extracelular de FTH ϕ foram identificados por ELISA em duas séries de placas de 96 alvéolos: uma revestida com o domínio extracelular de FTH ϕ etiquetado com histidinas e uma outra revestida com uma proteína MurA bacteriana etiquetada com histidinas como um controle negativo. O segundo anticorpo μ de burro anti-IgG de murganho marcado com peroxidase de r $\hat{c}$ bano silvestre (HRP) (Jackson ImmunoResearch). A imuno-reatividade foi monitorizada nos alvéolos usando revelação de cor iniciada por comprimidos de ABTS dissolvidos em tamp $\hat{o}$ TBS, pH 7,5. As misturas de reacção de HRP individuais foram paradas pela adição de 100 microlitros de 1% SDS e leitura da absorv $\hat{e}$ ncia a 405 nm com um espectrofot $\hat{a}$ metro. Os híbridos produtores de anticorpos que interagiram com o domínio extracelular de FTH ϕ -6His, e n $\hat{o}$ com a proteína murA-6His foram usados para posterior análise. Realizaram-se diluições limites (0,8 células por alvéolo) duas vezes para os clones positivos em placas de 96 alvéolos, com clonalidade definida como sendo mais de 99% dos alvéolos com reatividade positiva. Os isotipos dos anticorpos foram determinados usando a tecnologia Iso-strip (Roche). Para obter anticorpo purificado para subsequente avaliação, os sobrenadantes de cultura de tecidos foram purificados por afinidade usando colunas de proteína A ou de proteína G.

Resultados: Cinco anticorpos monoclonais imuno-reativos com a proteína domínio extracelular de FTH ϕ foram isolados e receberam as seguintes designações R15E6, R12A7, R3A2, R11C3, R15G2 e R5A8.

O anticorpo monoclonal R15E6 foi depositado na American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA on 04 May 2006.

Exemplo 3. R15E6 liga-se a FTH β endógena nas células endoteliais humanas.

A. R15E6 liga-se a FTH β endógena conforme demonstrado por imunoprecipitação e transferências Western.

Materiais: Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), meio EGM e solução neutralizante de tripsina da Cambrex; OPTIMEM I (Gibco), albumina sérica bovina (BSA; Santa Cruz), soro fisiológico tamponado com fosfatos (PBS; Gibco), Factores de crescimento incluindo Angiopietina 1 (Ang1), factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e factor de crescimento de fibroblastos (FGF) (R&D Systems), anticorpo monoclonal contra Tie2 (Duke University/P&GP), anticorpo policlonal contra o receptor de VEGF 2 (VEGFR2) (Whitaker et. al), proteína A/G agarose (Santa Cruz), sistema de electroforese em géis pré-formados de Tris-Glicina/transferência (6-8%) (Invitrogen), membranas de PVDF (Invitrogen), tampão de lise (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 1% triton-X-100, 2 mM EDTA, 1 mM NaOAc, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml pepstatina).

Método: HUVECs foram pré-tratadas durante 30 min com anticorpo (em OPTIMEM) ou OPTIMEM I apenas. Após

remoção do pré-tratamento, as células foram tratadas com Ang1 (100 ng/ml) durante 6 minutos em PBS + 0,2% BSA e lisadas em tampão de lise. Os lisados correram directamente num gel de Tris-Glicina ou foram imunoprecipitados com 2-5 µg/ml de anticorpo Tie-2 ou 10 µg/ml do anticorpo R15E6 e proteína A/G agarose. As amostras imunoprecipitadas foram lavadas 1x com tampão de lise e fervidas durante 5 min em tampão de amostra 1x. As amostras foram resolvidas num gel de Tris-Glicina, transferidas para uma membrana PVDF, e detectadas por transferência western usando os anticorpos indicados (pTYR Ab (PY99, Santa Cruz), Tie-2, VEGFR2 e/ou R15E6).

Resultados: Por IP/transferência western, R15E6 reconhece uma banda principal de alto peso molecular consistente com o tamanho de FTHF (Figura 2, Painel A, Lane 2). As bandas menos intensas de peso molecular mais baixo provavelmente representam formas de precursor de FTHF menos glicosiladas. Uma imunoprecipitação (IP) com IgG não imune controlo não mostra bandas na gama dos pesos moleculares de FTHF (Figura 2, Painel A, Pista 1) e um IP com Tie2/VEGFR2 combinado mostra bandas do peso molecular esperado (Figura 2, Painel A, Pista 3). Este resultado demonstra que R15E6 reconhece e é específico de FTHF.

B. R15E6 liga-se a FTHF endógeno como demonstrado pela análise FACS

Materiais: HUVECs, meios EGM média, e solução de

neutraliza²o da tripsina da Cambrex; segundo anticorpo marcado com Alexfluor 488 da Molecular Probes; solu²o salina equilibrada de Hank (Gibco); cit²metro de fluxo FACSCAN e o programa CellQuest da Becton Dickinson.

M²todo: HUVECs foram tripsinizadas, tratadas com solu²o de neutraliza²o da tripsina e lavadas com HBSS. O anticorpo R15E6 (0,6 μ g) foi adicionado a 250000 c²lulas em 50 μ l de HBSS e incubado em gelo durante 20 minutos. As c²lulas foram lavadas com 1 ml de HBSS, seguido da adi²o de 2 μ g do segundo anticorpo conjugado com fluoresc²ncia durante 20 minutos em gelo. As c²lulas foram lavadas e ressuspensas em 1 ml de HBSS, depois de analisadas no cit²metro de fluxo as c²lulas foram tratadas apenas com o segundo anticorpo conjugado com fluoresc²ncia.

Resultados: Atrav²ls da an²lise FACS, nas HUVECs intactas, R15E6 causa um desvio robusto (>90% das c²lulas) no sinal de fluoresc²ncia comparativamente com o segundo anticorpo apenas (Figura 2, Painel B). Este resultado indica que R15E6 se liga a FTH² end²gena apresentada na superf²cie de c²lulas endoteliais intactas.

Exemplo 4. R15E6 estimula a activa²o de Tie2 e promove m²ltiplas respostas angiog²nicas (sobreviv²ncia das c²lulas endoteliais, migra²o e morfog²nese capilar).

A. R15E6 estimula a fosforila²o de Tie2 na aus²ncia e presen²a da angiopoietina 1 (Ang1), o ligando de Tie2.

Métodos: HUVECs foram cultivadas em meio sem soro como acima descrito na presença ou ausência de várias concentrações de R15E6 e com ou sem AngI adicionado. Prepararam-se lisados, imunoprecipitaram-se com um anticorpo contra Tie2, foram separados por electroforese em gel de poliacrilamida e transferidos para uma membrana PVDF. As proteínas imunoprecipitadas ligadas a membranas foram então sequencialmente sujeitas a transferência western com um anticorpo antifosfotirosina para quantificar a fosforilação de Tie2 seguido de um anticorpo contra Tie2 para quantificar Tie2 total. A fosforilação de Tie2 é expressa como a razão entre o sinal de antifosfotirosina e o sinal de Tie2 total.

Resultados: R15E6 estimula a fosforilação de Tie2 na ausência e na presença de AngI (Figura 3). Este resultado indica que a ligação de R15E6 a FTH13 na superfície das células endoteliais modula a sua função biológica, resultando na estimulação da activação de Tie2 na ausência ou presença de ligando.

B. R15E6 estimula a sobrevivência das células endoteliais na ausência e na presença de factores de crescimento endotelial.

Materiais: HUVECs, meios EGM e solução neutralizante da tripsina da Cambrex; DMEM (Cell Gro), BSA deslipidizada (BD Falcon), Ensaio Cell Titer Glo ATP Assay (Promega), Factores de Crescimento (AngI, VEGF 165 e FGF)

(R&D Systems), leitor de placas Victor V Multilabel (Perkin Elmer Wallac).

Método: HUVECs foram semeadas a 10000 células/alvôlo, jejuaram em DMEM 0,2% BSA sem soro e foram tratadas 72h na presença ou ausência de factor de crescimento (Angl, VEGF ou FGF), com ou sem várias concentrações do anticorpo R15E6. Após 72 horas, as células foram lavadas com DMEM e as células que sobreviveram foram quantificadas através da medição dos níveis de ATP usando o ensaio Cell Titer Glo Luminescence Assay de acordo com as instruções do fabricante (Promega).

Resultados: Consistente com os resultados do ensaio de activação de Tie2, R15E6 estimula a sobrevivência de células endoteliais na ausência de factor de crescimento adicionado nas concentrações entre 0,5 e 5 nM (Figura 4, Painel A). De forma semelhante, R15E6 estimula a sobrevivência das células endoteliais mediada por Angl (Figura 4, Painel A) assim como a sobrevivência celular mediada por VEGF e FGF (Figura 4, Painéis B e C). Não se observa aumento da sobrevivência com um anticorpo monoclonal controlo (Figura 4, Painel D). Estes resultados demonstram que a ligação de R15E6 a FTH na superfície das células endoteliais aumenta a sobrevivência da linha de base das células endoteliais assim como a sobrevivência mediada por múltiplas vias angiogénicas (Angl, VEGF, e FGF).

C. R15E6 estimula a migração das células endoteliais na ausência e na presença de VEGF.

Materiais: HUVECs, meios EGM e solução neutralizante da tripsina da Cambrex; EBM sem vermelho de fenol (PRF-EBM Cambrex), BSA deslipidizada (BD Falcon), sistema BD Falcon Biocoat Endothelial Cell Migration (BD Falcon), Calceína AM (Molecular Probes); Factores de Crescimento (VEGF 165) (R&D Systems), leitor de placas Victor V Multilabel (Perkin Elmer Wallac).

Método: HUVECs foram suspensas em PRF-EBM+0,1% BSA e semeadas a 50000 células/transalvólulo (BD Bioscience, 3 µm tamanho do poro). Factor de Crescimento/R15E6 foi colocado no alvólulo do fundo da câmara de transalvólulos e incubado 4-22h. As células que migraram através da membrana foram detectadas através de marcação com 4 µg/ml de calceína AM durante 90'. A fluorescência foi medida usando um instrumento Victor V (485/535).

Resultados: Consistente com os resultados no estudo de sobrevivência, R15E6 estimula a migração de células endoteliais da linha de base e mediada por VEGF (Figura 5).

D. R15E6 estimula a formação de rebentos endoteliais e a morfogênese endotelial na ausência e na presença de factores de crescimento endoteliais.

Materiais: HUVECs e meio EGM da Cambrex; esferas Cytodex e colagénio tipo I da Sigma; PBS de Dulbecco e meio M199 da Gibco; VEGF da R&D.

Método: HUVECs passagem 4 (2×10^6 células) foram cultivadas com 5 mg de esferas de Cytodex em 10 ml de EGM em placas bacteriológicas, não tratadas para cultura de tecidos, de 100 mm durante 48 horas com agitação ocasional. Esferas revestidas com células foram transferidas para um tubo cónico de 50 ml e ressuspensas em 380 µl de D-PBS. Os géis de colagénio foram preparados pela adição de 71,4 µl de esferas revestidas com células a 2,8 ml de uma solução de matriz consistindo em 3 mg/ml de colagénio em meio M199 suplementado com NaOH 0,005 N, HEPES 20 mM e NaHCO_3 26 mM. Trezentos e cinquenta microlitros das esferas foram distribuídos por alvéolo numa placa de cultura de tecidos de 24 alvéolos e a matriz deixada a solidificar durante 1 hora a 37°C/5% CO_2 . Um ml de meio EGM com ou sem VEGF (10 ng/ml) ou R15E6 (7,5 µg/ml) foi adicionado por alvéolo e colocada novamente na incubadora. Após 48 horas, um observador alheio ao estudo visualizou os rebentos com um microscópio invertido de contraste de fase e observou 50 esferas por alvéolo, em triplicados de alvéolos, relativamente à presença de rebentos de células endoteliais. Os resultados foram expressos como o número de rebentos por esfera.

Resultados: Consistente com os resultados dos outros ensaios, R15E6 também estimula a morfogénese de

capilares na linha de base e mediada por VEGF no ensaio de forma^{ção} de rebentos endoteliais nas esferas (Figura 6).

Exemplo 5. O epitopo de liga^{ção} a R15E6 situa-se na repeti^{ção} FN3 N-terminal do dom^{ínio} extracelular de FTPH⁶ humana.

A. A análise de transfer^{ências} Western dos mutantes recombinantes truncados no extremo C e das prote^{ínas} quiméricas murganho/humano mostra que o epitopo de liga^{ção} a R15E6 se situa na repeti^{ção} FN3 N-terminal do dom^{ínio} extracelular de FTPH⁶.

Métodos: Células HEK293 foram transfectadas com vectores de express^{ão} codificadores dos mutantes de truncagem de FTPH⁶ ou da quimera murganho/humano. As células transfectadas foram ent^{ão} incubadas em OptiMEM durante mais 24 horas, após o que meio condicionado contendo o dom^{ínio} extracelular de FTPH⁶ indicado foi colhido e guardado para uso futuro ou usado imediatamente em estudos de transfer^{ência} Western ou ECL (ver abaixo). Para a análise de transfer^{ências}, 20 µl de meio condicionado contendo a prote^{ína} FTPH⁶ indicada ou sem prote^{ína} recombinante (simula^{ção}, vector vazio transfectado) foram separados por PAGE, transferidos para uma membrana PVDF e testados com R15E6.

Resultados: Atrav^{és} da análise de transfer^{ências} western, R15E6 liga-se a todos os mutantes de dele^{ção} C-

terminal FTPH δ (Figura 7A) indicando que o epitopo de liga $\acute$ o est $\text{\textcircled{a}}$ nas duas primeiras repeti $\acute$ es FN3 N-terminais. R15E6 $\text{\textcircled{e}}$ incapaz de se ligar ao dom $\acute$ nio extracelular de FTPH δ murino (SEQ ID NO: 7) demonstrando especificidade para a prote $\text{\textcircled{a}}$ humana (Figura 7B pista 6 vs. pista 2). A substitui $\acute$ o da 1 $\text{\textless}$ ou 1 $\text{\textless}$ e 2 $\text{\textless}$ repeti $\acute$ es FN3 N-terminais murinas com as sequ $\acute$ ncias humanas restaurou a liga $\acute$ o de R15E6 (Figura 7B pistas 3 e 5). Pelo contr $\text{\textcircled{a}}$ rio, a substitui $\acute$ o de apenas a 2 $\text{\textless}$ repeti $\acute$ o FN3 murina com a sequ $\acute$ ncia humana falha a restaura $\acute$ o da liga $\acute$ o (Figura 7B pista 4). Considerados em conjunto, estes resultados localizam o epitopo de liga $\acute$ o de R15E6 na repeti $\acute$ o FN3 N-terminal (2100 amino $\text{\textcircled{a}}$ cidos) de FTPH δ humana.

B. A an $\text{\textcircled{i}}$ lise ECL (electroquimioluminescente) dos mutantes de truncagem terminal e das prote $\text{\textcircled{a}}$ s qu $\text{\textcircled{e}}$ m $\text{\textcircled{e}}$ ricas murganho/humano confirma que o epitopo de liga $\acute$ o a R15E6 est $\text{\textcircled{a}}$ na repeti $\acute$ o FN3 N-terminal do dom $\acute$ nio extracelular de FTPH δ .

M $\text{\textcircled{e}}$ todos: Os sobrenadantes contendo a prote $\text{\textcircled{a}}$ FTPH δ indicada foram usados para revestir placas de 96 alv $\text{\textcircled{o}}$ los High Bind MSD (Meso Scale Discovery), deixadas a secar e bloqueadas com 3% BSA durante 1 h. A prote $\text{\textcircled{a}}$ foi ent $\text{\textcircled{2}}$ o incubada com o anticorpo monoclonal R15E6 ou com o fragmento Fab de R15E6 (10 nM ou 1,5 μ g/ml) durante 1 h, lavada e incubada com um anticorpo de cabra anti-murganho com uma marca MSD-Tag (10 nM) durante 1 h. O excesso de anticorpo foi removido por lavagem e o tamp $\text{\textcircled{2}}$ o de leitura

MSD foi adicionado. A emissão de luz foi medida usando o leitor Sector 2400 (MSD). MSD utiliza detecção de electroquimioluminescência para detectar eventos de ligação em arranjos padronizados. A tecnologia exclusiva de Meso Scale Discovery usa microplacas MULTI-ARRAY e MULTI-SPOT com electrodos integrados no fundo da placa. Os electrodos MSD feitos de carbono e reagentes biológicos podem ser ligados ao carbono simplesmente por adsorção passiva e mantêm um nível elevado de actividade biológica. Os ensaios MSD usam marcas electroquimioluminescentes para detecção ultra-sensível. Estas marcas electroquimioluminescentes emitem luz quando estimuladas electroquimicamente. O processo de detecção é iniciado nos electrodos embutidos situados no fundo das microplacas de MSD e apenas marcas perto do electrodo são excitadas e a luz detectada a 620 nm.

Resultados: Consistente com os estudos de transferências western, R15E6 liga-se a todas as proteínas FTPH truncadas no extremo C através da análise MSD (Figura 8A). Também consistente com a análise western, R15E6 falha a ligação ao domínio extracelular de FTPH murina mas a ligação é restaurada pela substituição da repetição FN3 N-terminal murina com o domínio FN3 N-terminal humano (Figura 8B). Estes dados confirmam que o epítipo de ligação a R15E6 está na repetição FN3 N-terminal de FTPH humana. Como esperado, o epítipo de ligação do fragmento Fab R15E6 monovalente poderá também ser mapeado na repetição FN3 mais N-terminal de FTPH humana (Figura 9).

Exemplo 6. Um fragmento Fab R15E6 Fab monovalente bloqueia a activação de Tie2 mediada por R15E6 e inibe a sobrevivência e migração das células endoteliais.

Métodos: A activação de Tie2 e os ensaios de sobrevivência e migração de células endoteliais foram realizados como descrito acima no Exemplo 4. Fragmentos Fab de R15E6 monovalentes foram preparados como anteriormente descrito. R15E6 purificado foi dialisado em Tris-HCl 0,1M pH 8,0, contendo EDTA 2 mM e ditioneitol 1 mM. Papaína (Pierce) a 1-2 mg/ml foi activada no tempo acima referido durante 15 minutos a 37°C. R15E6 a 10 ng/ml foi incubado com papaína no mesmo tempo usando uma proporção de enzima:substrato de 1:100, durante 1h a 37°C. A digestão foi terminada pela adição de iodoacetamida (concentração final 20 mM) e mantida em gelo durante 1 h, protegida da luz. O material digerido com papaína foi dialisado durante a noite contra soro fisiológico tamponado com fosfatos, para remover a iodoacetamida. O grau de digestão foi monitorizado por SDS-PAGE com o desaparecimento da cadeia pesada gama (MW 55000 kDa) e o aparecimento do fragmento Fc de gama (MW 27000 kDa) e cadeias leves (MW 22000-25000 kDa).

Resultados: Ao contrário do anticorpo R15E6 intacto, os fragmentos Fab não estimulam a activação de Tie2 (Figura 10). Ainda, na presença de excesso do fragmento Fab, a activação de Tie2 mediada por R15E6 é bloqueada (Figura 10). Surpreendentemente, o fragmento Fab

de R15E6 inibe marcadamente a sobrevivência das células endoteliais comparativamente com um controlo Fab (Figura 11A) e este efeito pode ser contrariado pela adição de R15E6 intacto (Figura 11B). Consistente com o efeito negativo na sobrevivência endotelial, o Fab de R15E6 também bloqueia a migração de células endoteliais mediada por VEGF (Figura 12). Estes resultados demonstram que o R15E6 intacto é necessário para o aumento da sinalização angiogénica e que R15E6 monomérico bloqueia estas acções e de facto tem um efeito negativo nas respostas angiogénicas das células endoteliais.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Aerpio Therapeutics, Inc.
<120> ANTICORPOS QUE SE LIGAM À FOSFATASE TIROSINA DE
PROTEÍNAS HUMANA Beta (FTHPBeta) E SUAS UTILIZAÇÕES
<130> P103352EP52
<140> 11 155518.1
<141> 2007-04-05
<150> US 60/790,506
<151> 2006-04-07
<150> US 60/798,896
<151> 2006-05-09
<160> 11
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 4623
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(4623)
<400> 1

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

115	120	125	
cat gtt tgg tgg act cct tct tcc gga aaa gtc acc tca tat gag gtg His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu Val 130 135 140			432
caa tta ttt gat gaa aat aac caa aag ata cag ggg gtt caa att caa Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile Gln 145 150 155 160			480
gaa agt act tca tgg aat gaa tac act ttt ttc aat ctc act gct ggt Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala Gly 165 170 175			528
agt aaa tac aat att gcc atc aca gct gtt tct gga gga aaa cgt tct Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser 180 185 190			576
ttt tca gtt tat acc aat gga tca aca gtg cca tct cca gtg aaa gat Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp 195 200 205			624
att ggt att tcc aca aaa gcc aat tct ctc ctg att tcc tgg tcc cat Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His 210 215 220			672
ggt tct ggg aat gtg gaa cga tac cgg ctg atg cta atg gat aaa ggg Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly 225 230 235 240			720
atc cta gtt cat ggc ggt gtt gtg gac aaa cat gct act tcc tat gct Ile Leu Val His Gly Gly Val Val Asp Lys His Ala Thr Ser Tyr Ala 245 250 255			768
ttt cac ggg ctg acc cct ggc tac ctc tac aac ctc act gtt atg act Phe His Gly Leu Thr Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr 260 265 270			816
gag gct gca ggg ctg caa aac tac agg tgg aaa cta gtc agg aca gcc Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala 275 280 285			864
ccc atg gaa gtc tca aat ctg aag gtg aca aat gat ggc agt ttg acc Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr 290 295 300			912
tct cta aaa gtc aaa tgg caa aga cct cct gga aat gtg gat tct tac Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr 305 310 315 320			960
aat atc acc ctg tct cac aaa ggg acc atc aag gaa tcc aga gta tta Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu 325 330 335			1008
gca cct tgg att act gaa act cac ttt aaa gag tta gtc ccc ggt cga Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg 340 345 350			1056
ctt tat caa gtt act gtc agc tgt gtc tct ggt gaa ctg tct gct cag Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln 355 360 365			1104
aag atg gca gtg ggc aga aca ttc ccc ctg gct gtc ctc cag ctt cgt			1152

Lys	Met	Ala	Val	Gly	Arg	Thr	Phe	Pro	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Leu	Arg	
370						375					380					
gtc	aaa	cat	gcc	aat	gaa	acc	tca	ctg	agt	atc	atg	tgg	cag	acc	cct	1200
Val	Lys	His	Ala	Asn	Glu	Thr	Ser	Leu	Ser	Ile	Met	Trp	Gln	Thr	Pro	
385					390					395					400	
gta	gca	gaa	tgg	gag	aaa	tac	atc	att	tcc	cta	gct	gac	aga	gac	ctc	1248
Val	Ala	Glu	Trp	Glu	Lys	Tyr	Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Asp	Arg	Asp	Leu	
				405					410					415		
tta	ctg	atc	cac	aag	tca	ctc	tcc	aaa	gat	gcc	aaa	gaa	ttc	act	ttt	1296
Leu	Leu	Ile	His	Lys	Ser	Leu	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Phe	Thr	Phe	
			420					425					430			
act	gac	ctg	gtg	cct	gga	cga	aaa	tac	atg	gct	aca	gtc	acc	agt	att	1344
Thr	Asp	Leu	Val	Pro	Gly	Arg	Lys	Tyr	Met	Ala	Thr	Val	Thr	Ser	Ile	
	435					440						445				
agt	gga	gac	tta	aaa	aat	tcc	tct	tca	gta	aaa	gga	aga	aca	gtg	cct	1392
Ser	Gly	Asp	Leu	Lys	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Thr	Val	Pro	
	450				455						460					
gcc	caa	gtg	act	gac	ttg	cat	gtg	gcc	aac	caa	gga	atg	acc	agt	agt	1440
Ala	Gln	Val	Thr	Asp	Leu	His	Val	Ala	Asn	Gln	Gly	Met	Thr	Ser	Ser	
465					470				475						480	
ctg	ttt	act	aac	tgg	acc	cag	gca	caa	gga	gac	gta	gaa	ttt	tac	caa	1488
Leu	Phe	Thr	Asn	Trp	Thr	Gln	Ala	Gln	Gly	Asp	Val	Glu	Phe	Tyr	Gln	
			485					490					495			
gtc	tta	ctg	atc	cat	gaa	aat	gtg	gtc	att	aaa	aat	gaa	agc	atc	tcc	1536
Val	Leu	Leu	Ile	His	Glu	Asn	Val	Val	Ile	Lys	Asn	Glu	Ser	Ile	Ser	
			500					505					510			
agt	gag	acc	agc	aga	tac	agc	ttc	cac	tct	ctc	aag	tcc	ggc	agc	ctg	1584
Ser	Glu	Thr	Ser	Arg	Tyr	Ser	Phe	His	Ser	Leu	Lys	Ser	Gly	Ser	Leu	
	515					520						525				
tac	tcc	gtg	gtg	gta	aca	aca	gtg	agt	gga	ggg	atc	tct	tcc	cga	caa	1632
Tyr	Ser	Val	Val	Val	Thr	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ser	Ser	Arg	Gln	
	530					535					540					
gtg	gtt	gtg	gag	gga	aga	aca	gtc	cct	tcc	agt	gtg	agt	gga	gta	acg	1680
Val	Val	Val	Glu	Gly	Arg	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Val	Thr	
545					550				555						560	
gtg	aac	aat	tcc	ggt	cgt	aat	gac	tac	ctc	agc	gtt	tcc	tgg	ctg	ctg	1728
Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Asn	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Ser	Trp	Leu	Leu	
			565					570					575			
gcg	ccc	gga	gat	gtg	gat	aac	tat	gag	gta	aca	ttg	tct	cat	gac	ggc	1776
Ala	Pro	Gly	Asp	Val	Asp	Asn	Tyr	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	His	Asp	Gly	
			580				585						590			
aag	gtg	gtt	cag	tcc	ctt	gtc	att	gcc	aag	tct	gtc	aga	gaa	tgt	tcc	1824
Lys	Val	Val	Gln	Ser	Leu	Val	Ile	Ala	Lys	Ser	Val	Arg	Glu	Cys	Ser	
	595					600						605				
ttc	agc	tcc	ctc	acc	cca	ggc	cgc	ctc	tac	acc	gtg	acc	ata	act	aca	1872
Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Pro	Gly	Arg	Leu	Tyr	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Thr	
	610					615					620					

agg agt ggc aag tat gaa aat cac tcc ttc agc caa gag cgg aca gtg Arg Ser Gly Lys Tyr Gln Asn His Ser Phe Ser Asn Ser Gln Glu Arg Thr Val 625 630 635 640	1920
cct gac aaa gtc cag gga gtc agt gtt agc aac tca gcc agg agt gac Pro Asp Lys Val Gln Gly Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp 645 650 655	1968
tat tta agg gta tcc tgg gtg cat gcc act gga gac ttt gat cac tat Tyr Leu Arg Thr Val Ser Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr 660 665 670	2016
gaa gtc acc att aaa aac aaa aac aac ttc att caa act aaa agc att Glu Val Thr Ile Lys Asn Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile 675 680 685	2064
ccc aag tca gaa aac gaa tgt gta ttt gtt cag cta gtc cct gga cgg Pro Lys Ser Glu Asn Glu Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg 690 695 700	2112
ttg tac agt gtc act gtt act aca aaa agt gga caa tat gaa gcc aat Leu Tyr Ser Val Thr Val Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn 705 710 715 720	2160
gaa caa ggg aat ggg aga aca att cca gag cct gtt aag gat cta aca Glu Gln Gly Asn Gly Arg Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr 725 730 735	2208
ttg cgc aac agg agc act gag gac ttg cat gtg act tgg tca gga gct Leu Arg Asn Arg Ser Thr Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala 740 745 750	2256
aat ggg gat gtc gac caa tat gag atc cag ctg ctc ttc aat gac atg Asn Gly Asp Val Asp Gln Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met 755 760 765	2304
aaa gta ttt cct cct ttt cac ctt gta aat acc gca acc gag tat cga Lys Val Phe Pro Pro Phe His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg 770 775 780	2352
ttt act tcc cta aca cca ggc cgc caa tac aaa att ctt gtc ttg acg Phe Thr Ser Leu Thr Pro Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr 785 790 795 800	2400
att agc ggg gat gta cag cag tca gcc ttc att gag ggc ttc aca gtt Ile Ser Gly Asp Val Gln Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val 805 810 815	2448
cct agt gct gtc aaa aat att cac att tct ccc aat gga gca aca gat Pro Ser Ala Val Lys Asn Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp 820 825 830	2496
agc ctg acg gtg aac tgg act cct ggt ggg gga gac gtt gat tcc tac Ser Leu Thr Val Asn Trp Thr Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr 835 840 845	2544
acg gtg tcg gca ttc agg cac agt caa aag gtt gac tct cag act att Thr Val Ser Ala Phe Arg His Ser Gln Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile 850 855 860	2592
ccc aag cac gtc ttt gag cac acg ttc cac aga ctg gag gcc ggg gag Pro Lys His Val Phe Glu His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Glu 865 870 875 880	2640

cag tac cag atc atg att gcc tca gtc agc ggg tcc ctg aag aat cag Gln Tyr Gln Ile Met Ile Ala Ser Val Ser Gly Ser Leu Lys Asn Gln 885 890 895	2688
ata aat gtg gtt ggg cgg aca gtt cca gca tct gtc caa gga gta att Ile Asn Val Val Gly Arg Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Gly Val Ile 900 905 910	2736
gca gac aat gca tac agc agt tat tcc tta ata gta agt tgg caa aaa Ala Asp Asn Ala Tyr Ser Ser Tyr Ser Leu Ile Val Ser Trp Gln Lys 915 920 925	2784
gct gct ggt gtg gca gaa aga tat gat atc ctg ctt cta act gaa aat Ala Ala Gly Val Ala Glu Arg Tyr Asp Ile Leu Leu Thr Glu Asn 930 935 940	2832
gga atc ctt ctg cgc aac aca tca gag cca gcc acc act aag caa cac Gly Ile Leu Leu Arg Asn Thr Ser Glu Pro Ala Thr Thr Lys Gln His 945 950 955 960	2880
aaa ttt gaa gat cta aca cca ggc aag aaa tac aag ata cag atc cta Lys Phe Glu Asp Leu Thr Pro Gly Lys Lys Tyr Lys Ile Gln Ile Leu 965 970 975	2928
act gtc agt gga ggc ctc ttt agc aag gaa gcc cag act gaa ggc cga Thr Val Ser Gly Gly Leu Phe Ser Lys Glu Ala Gln Thr Glu Gly Arg 980 985 990	2976
aca gtc cca gca gct gtc acc gac ctg agg atc aca gag aac tcc acc Thr Val Pro Ala Ala Val Thr Asp Leu Arg Ile Thr Glu Asn Ser Thr 995 1000 1005	3024
agg cac ctg tcc ttc cgc tgg acc gcc tca gag ggg gag ctc agc Arg His Leu Ser Phe Arg Trp Thr Ala Ser Glu Gly Glu Leu Ser 1010 1015 1020	3069
tgg tac aac atc ttt ttg tac aac cca gat ggg aat ctc cag gag Trp Tyr Asn Ile Phe Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Asn Leu Gln Glu 1025 1030 1035	3114
aga gct caa gtt gac cca cta gtc cag agc ttc tct ttc cag aac Arg Ala Gln Val Asp Pro Leu Val Gln Ser Phe Ser Phe Gln Asn 1040 1045 1050	3159
ttg cta caa ggc aga atg tac aag atg gtg att gta act cac agt Leu Leu Gln Gly Arg Met Tyr Lys Met Val Ile Val Thr His Ser 1055 1060 1065	3204
ggg gag ctg tct aat gag tct ttc ata ttt ggt aga aca gtc cca Gly Glu Leu Ser Asn Glu Ser Phe Ile Phe Gly Arg Thr Val Pro 1070 1075 1080	3249
gcc tct gtg agt cat ctc agg ggg tcc aat cgg aac acg aca gac Ala Ser Val Ser His Leu Arg Gly Ser Asn Arg Asn Thr Thr Asp 1085 1090 1095	3294
agc ctt tgg ttc aac tgg agt cca gcc tct ggg gac ttt gac ttt Ser Leu Trp Phe Asn Trp Ser Pro Ala Ser Gly Asp Phe Asp Phe 1100 1105 1110	3339
tat gag ctg att ctc tat aat ccc aat ggc aca aag aag gaa aac Tyr Glu Leu Ile Leu Tyr Asn Pro Asn Gly Thr Lys Lys Glu Asn	3384

1115					1120					1125					
tgg	aaa	gac	aag	gac	ctg	acg	gag	tgg	cgg	ttt	caa	ggc	ctt	gtt	3429
Trp	Lys	Asp	Lys	Asp	Leu	Thr	Glu	Trp	Arg	Phe	Gln	Gly	Leu	Val	
1130					1135					1140					
cct	gga	agg	aag	tac	gtg	ctg	tgg	gtg	gta	act	cac	agt	gga	gat	3474
Pro	Gly	Arg	Lys	Tyr	Val	Leu	Trp	Val	Val	Thr	His	Ser	Gly	Asp	
1145					1150					1155					
ctc	agc	aat	aaa	gtc	aca	gcg	gag	agc	aga	aca	gct	cca	agt	cct	3519
Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Thr	Ala	Glu	Ser	Arg	Thr	Ala	Pro	Ser	Pro	
1160					1165					1170					
ccc	agt	ctt	atg	tca	ttt	gct	gac	att	gca	aac	aca	tcc	ttg	gcc	3564
Pro	Ser	Leu	Met	Ser	Phe	Ala	Asp	Ile	Ala	Asn	Thr	Ser	Leu	Ala	
1175					1180					1185					
atc	acg	tgg	aaa	ggg	ccc	cca	gac	tgg	aca	gac	tac	aac	gac	ttt	3609
Ile	Thr	Trp	Lys	Gly	Pro	Pro	Asp	Trp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Asp	Phe	
1190					1195					1200					
gag	ctg	cag	tgg	ttg	ccc	aga	gat	gca	ctt	act	gtc	ttc	aac	ccc	3654
Glu	Leu	Gln	Trp	Leu	Pro	Arg	Asp	Ala	Leu	Thr	Val	Phe	Asn	Pro	
1205					1210					1215					
tac	aac	aac	aga	aaa	tca	gaa	gga	cgc	att	gtg	tat	ggt	ctt	cgt	3699
Tyr	Asn	Asn	Arg	Lys	Ser	Glu	Gly	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Leu	Arg	
1220					1225					1230					
cca	ggg	aga	tcc	tat	caa	ttc	aac	gtc	aag	act	gtc	agt	ggt	gat	3744
Pro	Gly	Arg	Ser	Tyr	Gln	Phe	Asn	Val	Lys	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	
1235					1240					1245					
tcc	tgg	aaa	act	tac	agc	aaa	cca	att	ttt	gga	tct	gtg	agg	aca	3789
Ser	Trp	Lys	Thr	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ile	Phe	Gly	Ser	Val	Arg	Thr	
1250					1255					1260					
aag	cct	gac	aag	ata	caa	aac	ctg	cat	tgc	cgg	cct	cag	aac	tcc	3834
Lys	Pro	Asp	Lys	Ile	Gln	Asn	Leu	His	Cys	Arg	Pro	Gln	Asn	Ser	
1265					1270					1275					
acg	gcc	att	gcc	tgt	tct	tgg	atc	cct	cct	gat	tct	gac	ttt	gat	3879
Thr	Ala	Ile	Ala	Cys	Ser	Trp	Ile	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Phe	Asp	
1280					1285					1290					
ggt	tat	agt	att	gaa	tgc	cgg	aaa	atg	gac	acc	caa	gaa	gtt	gag	3924
Gly	Tyr	Ser	Ile	Glu	Cys	Arg	Lys	Met	Asp	Thr	Gln	Glu	Val	Glu	
1295					1300					1305					
ttt	tcc	aga	aag	ctg	gag	aaa	gaa	aaa	tct	ctg	ctc	aac	atc	atg	3969
Phe	Ser	Arg	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ile	Met	
1310					1315					1320					
atg	cta	gtg	ccc	cat	aag	agg	tac	ctg	gtg	tcc	atc	aaa	gtg	cag	4014
Met	Leu	Val	Pro	His	Lys	Arg	Tyr	Leu	Val	Ser	Ile	Lys	Val	Gln	
1325					1330					1335					
tcg	gcc	ggc	atg	acc	agc	gag	gtg	gtt	gaa	gac	agc	act	atc	aca	4059
Ser	Ala	Gly	Met	Thr	Ser	Glu	Val	Val	Glu	Asp	Ser	Thr	Ile	Thr	
1340					1345					1350					
atg	ata	gac	cgc	ccc	cct	cct	cca	ccc	cca	cac	att	cgt	gtg	aat	4104

Met	Ile	Asp	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	His	Ile	Arg	Val	Asn		
	1355					1360					1365					
gaa	aag	gat	gtg	cta	att	agc	aag	tct	tcc	atc	aac	ttt	act	gtc		4149
Glu	Lys	Asp	Val	Leu	Ile	Ser	Lys	Ser	Ser	Ile	Asn	Phe	Thr	Val		
	1370					1375					1380					
aac	tgc	agc	tgg	ttc	agc	gac	acc	aat	gga	gct	gtg	aaa	tac	ttc		4194
Asn	Cys	Ser	Trp	Phe	Ser	Asp	Thr	Asn	Gly	Ala	Val	Lys	Tyr	Phe		
	1385					1390					1395					
aca	gtg	gtg	gtg	aga	gag	gct	gat	ggc	agt	gat	gag	ctg	aag	cca		4239
Thr	Val	Val	Val	Arg	Glu	Ala	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Leu	Lys	Pro		
	1400					1405					1410					
gaa	cag	cag	cac	cct	ctc	cct	tcc	tac	ctg	gag	tac	agg	cac	aat		4284
Glu	Gln	Gln	His	Pro	Leu	Pro	Ser	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Arg	His	Asn		
	1415					1420					1425					
gcc	tcc	att	cgg	gtg	tat	cag	act	aat	tat	ttt	gcc	agc	aaa	tgt		4329
Ala	Ser	Ile	Arg	Val	Tyr	Gln	Thr	Asn	Tyr	Phe	Ala	Ser	Lys	Cys		
	1430					1435					1440					
gcc	gaa	aat	cct	aac	agc	aac	tcc	aag	agt	ttt	aac	att	aag	ctt		4374
Ala	Glu	Asn	Pro	Asn	Ser	Asn	Ser	Lys	Ser	Phe	Asn	Ile	Lys	Leu		
	1445					1450					1455					
gga	gca	gag	atg	gag	agc	cta	ggt	gga	aaa	tgc	gat	ccc	act	cag		4419
Gly	Ala	Glu	Met	Glu	Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Cys	Asp	Pro	Thr	Gln		
	1460					1465					1470					
caa	aaa	ttc	tgt	gat	gga	cca	ctg	aag	cca	cac	act	gcc	tac	aga		4464
Gln	Lys	Phe	Cys	Asp	Gly	Pro	Leu	Lys	Pro	His	Thr	Ala	Tyr	Arg		
	1475					1480					1485					
atc	agc	att	cga	gct	ttt	aca	cag	ctc	ttt	gat	gag	gac	ctg	aag		4509
Ile	Ser	Ile	Arg	Ala	Phe	Thr	Gln	Leu	Phe	Asp	Glu	Asp	Leu	Lys		
	1490					1495					1500					
gaa	ttc	aca	aag	cca	ctc	tat	tca	gac	aca	ttt	ttt	tct	tta	ccc		4554
Glu	Phe	Thr	Lys	Pro	Leu	Tyr	Ser	Asp	Thr	Phe	Phe	Ser	Leu	Pro		
	1505					1510					1515					
atc	act	act	gaa	tca	gag	ccc	ttg	ttt	gga	gct	att	gaa	cgc	ggc		4599
Ile	Thr	Thr	Glu	Ser	Glu	Pro	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Glu	Arg	Gly		
	1520					1525					1530					
cgc	cat	cat	cat	cat	cat	cac	gga									4623
Arg	His	His	His	His	His	His	Gly									
	1535					1540										

<210> 2

<211> 1541

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
 275 280 285

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr
 290 295 300

Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320

Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu
 325 330 335

Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350

Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln
 355 360 365

Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg
 370 375 380

Val Lys His Ala Asn Glu Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro
 385 390 395 400

Val Ala Glu Trp Glu Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu
 405 410 415

Leu Leu Ile His Lys Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe
 420 425 430

Thr Asp Leu Val Pro Gly Arg Lys Tyr Met Ala Thr Val Thr Ser Ile
 435 440 445

Ser Gly Asp Leu Lys Asn Ser Ser Ser Val Lys Gly Arg Thr Val Pro
 450 455 460

Ala Gln Val Thr Asp Leu His Val Ala Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser
 465 470 475 480

Leu Phe Thr Asn Trp Thr Gln Ala Gln Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln
 485 490 495

Val Leu Leu Ile His Glu Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser
 500 505 510

Ser Glu Thr Ser Arg Tyr Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu
 515 520 525

Tyr Ser Val Val Val Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln
530 535 540

Val Val Val Glu Gly Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr
545 550 555 560

Val Asn Asn Ser Gly Arg Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Leu
565 570 575

Ala Pro Gly Asp Val Asp Asn Tyr Glu Val Thr Leu Ser His Asp Gly
580 585 590

Lys Val Val Gln Ser Leu Val Ile Ala Lys Ser Val Arg Glu Cys Ser
595 600 605

Phe Ser Ser Leu Thr Pro Gly Arg Leu Tyr Thr Val Thr Ile Thr Thr
610 615 620

Arg Ser Gly Lys Tyr Glu Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val
625 630 635 640

Pro Asp Lys Val Gln Gly Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp
645 650 655

Tyr Leu Arg Val Ser Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr
660 665 670

Glu Val Thr Ile Lys Asn Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile
675 680 685

Pro Lys Ser Glu Asn Glu Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg
690 695 700

Leu Tyr Ser Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn
705 710 715 720

Glu Gln Gly Asn Gly Arg Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr
725 730 735

Leu Arg Asn Arg Ser Thr Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala
740 745 750

Asn Gly Asp Val Asp Gln Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met
755 760 765

Lys Val Phe Pro Pro Phe His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg

770					775					780					
Phe	Thr	Ser	Leu	Thr	Pro	Gly	Arg	Gln	Tyr	Lys	Ile	Leu	Val	Leu	Thr
785					790					795					800
Ile	Ser	Gly	Asp	Val	Gln	Gln	Ser	Ala	Phe	Ile	Glu	Gly	Phe	Thr	Val
			805						810					815	
Pro	Ser	Ala	Val	Lys	Asn	Ile	His	Ile	Ser	Pro	Asn	Gly	Ala	Thr	Asp
			820					825					830		
Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Trp	Thr	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Val	Asp	Ser	Tyr
		835					840					845			
Thr	Val	Ser	Ala	Phe	Arg	His	Ser	Gln	Lys	Val	Asp	Ser	Gln	Thr	Ile
	850					855					860				
Pro	Lys	His	Val	Phe	Glu	His	Thr	Phe	His	Arg	Leu	Glu	Ala	Gly	Glu
865					870					875					880
Gln	Tyr	Gln	Ile	Met	Ile	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Leu	Lys	Asn	Gln
				885					890					895	
Ile	Asn	Val	Val	Gly	Arg	Thr	Val	Pro	Ala	Ser	Val	Gln	Gly	Val	Ile
		900						905					910		
Ala	Asp	Asn	Ala	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ser	Leu	Ile	Val	Ser	Trp	Gln	Lys
		915					920					925			
Ala	Ala	Gly	Val	Ala	Glu	Arg	Tyr	Asp	Ile	Leu	Leu	Leu	Thr	Glu	Asn
	930					935					940				
Gly	Ile	Leu	Leu	Arg	Asn	Thr	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Thr	Lys	Gln	His
945					950					955					960
Lys	Phe	Glu	Asp	Leu	Thr	Pro	Gly	Lys	Lys	Tyr	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu
			965					970						975	
Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Leu	Phe	Ser	Lys	Glu	Ala	Gln	Thr	Glu	Gly	Arg
			980					985					990		
Thr	Val	Pro	Ala	Ala	Val	Thr	Asp	Leu	Arg	Ile	Thr	Glu	Asn	Ser	Thr
		995					1000						1005		
Arg	His	Leu	Ser	Phe	Arg	Trp	Thr	Ala	Ser	Glu	Gly	Glu	Leu	Ser	
	1010					1015					1020				

Trp Tyr	Asn Ile Phe Leu Tyr	Asn Pro Asp Gly Asn	Leu Gln Glu
1025	1030	1035	
Arg Ala	Gln Val Asp Pro Leu	Val Gln Ser Phe Ser	Phe Gln Asn
1040	1045	1050	
Leu Leu	Gln Gly Arg Met Tyr	Lys Met Val Ile Val	Thr His Ser
1055	1060	1065	
Gly Glu	Leu Ser Asn Glu Ser	Phe Ile Phe Gly Arg	Thr Val Pro
1070	1075	1080	
Ala Ser	Val Ser His Leu Arg	Gly Ser Asn Arg Asn	Thr Thr Asp
1085	1090	1095	
Ser Leu	Trp Phe Asn Trp Ser	Pro Ala Ser Gly Asp	Phe Asp Phe
1100	1105	1110	
Tyr Glu	Leu Ile Leu Tyr Asn	Pro Asn Gly Thr Lys	Lys Glu Asn
1115	1120	1125	
Trp Lys	Asp Lys Asp Leu Thr	Glu Trp Arg Phe Gln	Gly Leu Val
1130	1135	1140	
Pro Gly	Arg Lys Tyr Val Leu	Trp Val Val Thr His	Ser Gly Asp
1145	1150	1155	
Leu Ser	Asn Lys Val Thr Ala	Glu Ser Arg Thr Ala	Pro Ser Pro
1160	1165	1170	
Pro Ser	Leu Met Ser Phe Ala	Asp Ile Ala Asn Thr	Ser Leu Ala
1175	1180	1185	
Ile Thr	Trp Lys Gly Pro Pro	Asp Trp Thr Asp Tyr	Asn Asp Phe
1190	1195	1200	
Glu Leu	Gln Trp Leu Pro Arg	Asp Ala Leu Thr Val	Phe Asn Pro
1205	1210	1215	
Tyr Asn	Asn Arg Lys Ser Glu	Gly Arg Ile Val Tyr	Gly Leu Arg
1220	1225	1230	
Pro Gly	Arg Ser Tyr Gln Phe	Asn Val Lys Thr Val	Ser Gly Asp
1235	1240	1245	
Ser Trp	Lys Thr Tyr Ser Lys	Pro Ile Phe Gly Ser	Val Arg Thr
1250	1255	1260	

Lys	Pro	Asp	Lys	Ile	Gln	Asn	Leu	His	Cys	Arg	Pro	Gln	Asn	Ser
1265						1270					1275			
Thr	Ala	Ile	Ala	Cys	Ser	Trp	Ile	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Phe	Asp
1280						1285					1290			
Gly	Tyr	Ser	Ile	Glu	Cys	Arg	Lys	Met	Asp	Thr	Gln	Glu	Val	Glu
1295						1300					1305			
Phe	Ser	Arg	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ile	Met
1310						1315					1320			
Met	Leu	Val	Pro	His	Lys	Arg	Tyr	Leu	Val	Ser	Ile	Lys	Val	Gln
1325						1330					1335			
Ser	Ala	Gly	Met	Thr	Ser	Glu	Val	Val	Glu	Asp	Ser	Thr	Ile	Thr
1340						1345					1350			
Met	Ile	Asp	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	His	Ile	Arg	Val	Asn
1355						1360					1365			
Glu	Lys	Asp	Val	Leu	Ile	Ser	Lys	Ser	Ser	Ile	Asn	Phe	Thr	Val
1370						1375					1380			
Asn	Cys	Ser	Trp	Phe	Ser	Asp	Thr	Asn	Gly	Ala	Val	Lys	Tyr	Phe
1385						1390					1395			
Thr	Val	Val	Val	Arg	Glu	Ala	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Leu	Lys	Pro
1400						1405					1410			
Glu	Gln	Gln	His	Pro	Leu	Pro	Ser	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Arg	His	Asn
1415						1420					1425			
Ala	Ser	Ile	Arg	Val	Tyr	Gln	Thr	Asn	Tyr	Phe	Ala	Ser	Lys	Cys
1430						1435					1440			
Ala	Glu	Asn	Pro	Asn	Ser	Asn	Ser	Lys	Ser	Phe	Asn	Ile	Lys	Leu
1445						1450					1455			
Gly	Ala	Glu	Met	Glu	Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Cys	Asp	Pro	Thr	Gln
1460						1465					1470			
Gln	Lys	Phe	Cys	Asp	Gly	Pro	Leu	Lys	Pro	His	Thr	Ala	Tyr	Arg
1475						1480					1485			
Ile	Ser	Ile	Arg	Ala	Phe	Thr	Gln	Leu	Phe	Asp	Glu	Asp	Leu	Lys
1490						1495					1500			

Glu Phe Thr Lys Pro Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Phe Ser Leu Pro
 1505 1510 1515

Ile Thr Thr Glu Ser Glu Pro Leu Phe Gly Ala Ile Glu Arg Gly
 1520 1525 1530

Arg His His His His His Gly
 1535 1540

<210> 3

<211> 1621

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
 20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
 35 40 45

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

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
 65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
 85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
 100 105 110

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

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

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

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

Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser
 180 185 190
 Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
 195 200 205
 Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His
 210 215 220
 Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly
 225 230 235 240
 Ile Leu Val His Gly Gly Val Val Asp Lys His Ala Thr Ser Tyr Ala
 245 250 255
 Phe His Gly Leu Ser Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr
 260 265 270
 Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
 275 280 285
 Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr
 290 295 300
 Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu
 325 330 335
 Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350
 Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln
 355 360 365
 Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Pro Asp Lys Val Ala Asn Leu Glu
 370 375 380
 Ala Asn Asn Asn Gly Arg Met Arg Ser Leu Val Val Ser Trp Ser Pro
 385 390 395 400
 Pro Ala Gly Asp Trp Glu Gln Tyr Arg Ile Leu Leu Phe Asn Asp Ser
 405 410 415
 Val Val Leu Leu Asn Ile Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr Gln Tyr Val

	420		425		430										
Met	Asp	Asp	Thr	Gly	Leu	Val	Pro	Gly	Arg	Gln	Tyr	Glu	Val	Glu	Val
	435						440					445			
Ile	Val	Glu	Ser	Gly	Asn	Leu	Lys	Asn	Ser	Glu	Arg	Cys	Gln	Gly	Arg
	450					455					460				
Thr	Val	Pro	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Leu	Arg	Val	Lys	His	Ala	Asn	Glu
465					470					475					480
Thr	Ser	Leu	Ser	Ile	Met	Trp	Gln	Thr	Pro	Val	Ala	Glu	Trp	Glu	Lys
				485					490					495	
Tyr	Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Asp	Arg	Asp	Leu	Leu	Leu	Ile	His	Lys	Ser
			500					505					510		
Leu	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Phe	Thr	Phe	Thr	Asp	Leu	Val	Pro	Gly
		515					520					525			
Arg	Lys	Tyr	Met	Ala	Thr	Val	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	Lys	Asn
	530					535					540				
Ser	Ser	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Thr	Val	Pro	Ala	Gln	Val	Thr	Asp	Leu
545					550					555					560
His	Val	Ala	Asn	Gln	Gly	Met	Thr	Ser	Ser	Leu	Phe	Thr	Asn	Trp	Thr
			565						570					575	
Gln	Ala	Gln	Gly	Asp	Val	Glu	Phe	Tyr	Gln	Val	Leu	Leu	Ile	His	Glu
			580					585					590		
Asn	Val	Val	Ile	Lys	Asn	Glu	Ser	Ile	Ser	Ser	Glu	Thr	Ser	Arg	Tyr
		595					600					605			
Ser	Phe	His	Ser	Leu	Lys	Ser	Gly	Ser	Leu	Tyr	Ser	Val	Val	Val	Thr
	610					615					620				
Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ser	Ser	Arg	Gln	Val	Val	Val	Glu	Gly	Arg
625					630					635					640
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Val	Thr	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg
					645				650					655	
Asn	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Ser	Trp	Leu	Leu	Ala	Pro	Gly	Asp	Val	Asp
			660					665						670	

Asn Tyr Glu Val Thr Leu Ser His Asp Gly Lys Val Val Gln Ser Leu
 675 680 685
 Val Ile Ala Lys Ser Val Arg Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr Pro
 690 695 700
 Gly Arg Leu Tyr Thr Val Thr Ile Thr Thr Arg Ser Gly Lys Tyr Glu
 705 710 715 720
 Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln Gly
 725 730 735
 Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Arg Val Ser Trp
 740 745 750
 Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys Asn
 755 760 765
 Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile Pro Lys Ser Glu Asn Glu
 770 775 780
 Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr Val
 785 790 795 800
 Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn Glu Gln Gly Asn Gly Arg
 805 810 815
 Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Arg Asn Arg Ser Thr
 820 825 830
 Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala Asn Gly Asp Val Asp Gln
 835 840 845
 Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro Pro Phe
 850 855 860
 His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Thr Pro
 865 870 875 880
 Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val Gln
 885 890 895
 Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Ala Val Lys Asn
 900 905 910
 Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp Ser Leu Thr Val Asn Trp
 915 920 925

Thr Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Thr Val Ser Ala Phe Arg
 930 935 940

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ser	Val Ser His Leu Arg	Gly Ser Asn Arg Asn	Thr Thr Asp
1175	1180	1185	
Ser Leu	Trp Phe Asn Trp Ser	Pro Ala Ser Gly Asp	Phe Asp Phe
1190	1195	1200	
Tyr Glu	Leu Ile Leu Tyr Asn	Pro Asn Gly Thr Lys	Lys Glu Asn
1205	1210	1215	
Trp Lys	Asp Lys Asp Leu Thr	Glu Trp Arg Phe Gln	Gly Leu Val
1220	1225	1230	
Pro Gly	Arg Lys Tyr Val Leu	Trp Val Val Thr His	Ser Gly Asp
1235	1240	1245	
Leu Ser	Asn Lys Val Thr Ala	Glu Ser Arg Thr Ala	Pro Ser Pro
1250	1255	1260	
Pro Ser	Leu Met Ser Phe Ala	Asp Ile Ala Asn Thr	Ser Leu Ala
1265	1270	1275	
Ile Thr	Trp Lys Gly Pro Pro	Asp Trp Thr Asp Tyr	Asn Asp Phe
1280	1285	1290	
Glu Leu	Gln Trp Leu Pro Arg	Asp Ala Leu Thr Val	Phe Asn Pro
1295	1300	1305	
Tyr Asn	Asn Arg Lys Ser Glu	Gly Arg Ile Val Tyr	Gly Leu Arg
1310	1315	1320	
Pro Gly	Arg Ser Tyr Gln Phe	Asn Val Lys Thr Val	Ser Gly Asp
1325	1330	1335	
Ser Trp	Lys Thr Tyr Ser Lys	Pro Ile Phe Gly Ser	Val Arg Thr
1340	1345	1350	
Lys Pro	Asp Lys Ile Gln Asn	Leu His Cys Arg Pro	Gln Asn Ser
1355	1360	1365	
Thr Ala	Ile Ala Cys Ser Trp	Ile Pro Pro Asp Ser	Asp Phe Asp
1370	1375	1380	
Gly Tyr	Ser Ile Glu Cys Arg	Lys Met Asp Thr Gln	Glu Val Glu
1385	1390	1395	
Phe Ser	Arg Lys Leu Glu Lys	Glu Lys Ser Leu Leu	Asn Ile Met

1400	1405	1410
Met Leu Val Pro His Lys Arg Tyr Leu Val Ser Ile Lys Val Gln 1415 1420 1425		
Ser Ala Gly Met Thr Ser Glu Val Val Glu Asp Ser Thr Ile Thr 1430 1435 1440		
Met Ile Asp Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ile Arg Val Asn 1445 1450 1455		
Glu Lys Asp Val Leu Ile Ser Lys Ser Ser Ile Asn Phe Thr Val 1460 1465 1470		
Asn Cys Ser Trp Phe Ser Asp Thr Asn Gly Ala Val Lys Tyr Phe 1475 1480 1485		
Thr Val Val Val Arg Glu Ala Asp Gly Ser Asp Glu Leu Lys Pro 1490 1495 1500		
Glu Gln Gln His Pro Leu Pro Ser Tyr Leu Glu Tyr Arg His Asn 1505 1510 1515		
Ala Ser Ile Arg Val Tyr Gln Thr Asn Tyr Phe Ala Ser Lys Cys 1520 1525 1530		
Ala Glu Asn Pro Asn Ser Asn Ser Lys Ser Phe Asn Ile Lys Leu 1535 1540 1545		
Gly Ala Glu Met Glu Ser Leu Gly Gly Lys Arg Asp Pro Thr Gln 1550 1555 1560		
Gln Lys Phe Cys Asp Gly Pro Leu Lys Pro His Thr Ala Tyr Arg 1565 1570 1575		
Ile Ser Ile Arg Ala Phe Thr Gln Leu Phe Asp Glu Asp Leu Lys 1580 1585 1590		
Glu Phe Thr Lys Pro Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Phe Ser Leu Pro 1595 1600 1605		
Ile Thr Thr Glu Ser Glu Pro Leu Phe Gly Ala Ile Glu 1610 1615 1620		

<210> 4

<211> 775

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
      20              25              30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
      35              40              45

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

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
65              70              75              80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
      85              90              95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
      100              105              110

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

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

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

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

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

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
      195              200              205

Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His
      210              215              220

Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly
225              230              235              240

```

Ile	Leu	Val	His	Gly	Val	Val	Asp	Lys	His	Ala	Thr	Ser	Tyr	Ala	
				245				250						255	
Phe	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Leu	Thr	Val	Met	Thr
			260					265					270		
Glu	Ala	Ala	Gly	Leu	Gln	Asn	Tyr	Arg	Trp	Lys	Leu	Val	Arg	Thr	Ala
		275					280					285			
Pro	Met	Glu	Val	Ser	Asn	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Asp	Gly	Ser	Leu	Thr
	290					295					300				
Ser	Leu	Lys	Val	Lys	Trp	Gln	Arg	Pro	Pro	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Tyr
305					310					315					320
Asn	Ile	Thr	Leu	Ser	His	Lys	Gly	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser	Arg	Val	Leu
			325						330					335	
Ala	Pro	Trp	Ile	Thr	Glu	Thr	His	Phe	Lys	Glu	Leu	Val	Pro	Gly	Arg
		340						345					350		
Leu	Tyr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Cys	Val	Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Ala	Gln
		355					360					365			
Lys	Met	Ala	Val	Gly	Arg	Thr	Phe	Pro	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Leu	Arg
	370					375					380				
Val	Lys	His	Ala	Asn	Glu	Thr	Ser	Leu	Ser	Ile	Met	Trp	Gln	Thr	Pro
385					390					395					400
Val	Ala	Glu	Trp	Glu	Lys	Tyr	Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Asp	Arg	Asp	Leu
				405					410					415	
Leu	Leu	Ile	His	Lys	Ser	Leu	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Phe	Thr	Phe
		420						425					430		
Thr	Asp	Leu	Val	Pro	Gly	Arg	Lys	Tyr	Met	Ala	Thr	Val	Thr	Ser	Ile
		435					440					445			
Ser	Gly	Asp	Leu	Lys	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Thr	Val	Pro
	450					455					460				
Ala	Gln	Val	Thr	Asp	Leu	His	Val	Ala	Asn	Gln	Gly	Met	Thr	Ser	Ser
465					470					475					480
Leu	Phe	Thr	Asn	Trp	Thr	Gln	Ala	Gln	Gly	Asp	Val	Glu	Phe	Tyr	Gln
				485					490					495	

Val Leu Leu Ile His Glu Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser
 500 505 510

Ser Glu Thr Ser Arg Tyr Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu
 515 520 525

Tyr Ser Val Val Val Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln
 530 535 540

Val Val Val Glu Gly Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr
 545 550 555 560

Val Asn Asn Ser Gly Arg Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Leu
 565 570 575

Ala Pro Gly Asp Val Asp Asn Tyr Glu Val Thr Leu Ser His Asp Gly
 580 585 590

Lys Val Val Gln Ser Leu Val Ile Ala Lys Ser Val Arg Glu Cys Ser
 595 600 605

Phe Ser Ser Leu Thr Pro Gly Arg Leu Tyr Thr Val Thr Ile Thr Thr
 610 615 620

Arg Ser Gly Lys Tyr Glu Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val
 625 630 635 640

Pro Asp Lys Val Gln Gly Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp
 645 650 655

Tyr Leu Arg Val Ser Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr
 660 665 670

Glu Val Thr Ile Lys Asn Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile
 675 680 685

Pro Lys Ser Glu Asn Glu Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg
 690 695 700

Leu Tyr Ser Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn
 705 710 715 720

Glu Gln Gly Asn Gly Arg Thr Ile Pro Glu Lys Gly Asn Ser Ala Asp
 725 730 735

Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu
 740 745 750

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr
 755 760 765

Gly His His His His His His
 770 775

<210> 5

<211> 421

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
35 40 45

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

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
100 105 110

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

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

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

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

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

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
 195 200 205

Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His
 210 215 220

Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly
 225 230 235 240

Ile Leu Val His Gly Gly Val Val Asp Lys His Ala Thr Ser Tyr Ala
 245 250 255

Phe His Gly Leu Thr Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr
 260 265 270

Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
 275 280 285

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr
 290 295 300

Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320

Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu
 325 330 335

Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350

Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln
 355 360 365

Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Lys Gly Asn Ser Ala Asp Ile Gln
 370 375 380

His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly Lys
 385 390 395 400

Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His
 405 410 415

His His His His His
 420

<210> 6

<211> 247

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
35 40 45

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

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
100 105 110

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

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

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

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

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

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Lys Gly Asn Ser Ala Asp
195 200 205

Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu
210 215 220

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr

225

230

235

240

Gly His His His His His His
245

<210> 7

<211> 1632

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gln Val Arg Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Ser Trp Tyr Glu
130 135 140

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

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

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

Ser Phe Pro Val Tyr Ile Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys

195					200					205					
Asp	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	Asn	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Ser
210						215					220				
Arg	Gly	Ser	Gly	Asn	Val	Glu	Gln	Tyr	Arg	Leu	Val	Leu	Met	Asp	Lys
225						230					235				240
Gly	Ala	Ile	Val	Gln	Asp	Thr	Asn	Val	Asp	Arg	Arg	Asp	Thr	Ser	Tyr
				245					250					255	
Ala	Phe	His	Glu	Leu	Thr	Pro	Gly	His	Leu	Tyr	Asn	Leu	Thr	Ile	Val
			260					265						270	
Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Leu	Gln	Asn	Ser	Arg	Trp	Lys	Leu	Val	Arg	Thr
		275					280					285			
Ala	Pro	Met	Glu	Val	Ser	Asn	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Asp	Gly	Arg	Leu
		290					295					300			
Thr	Ser	Leu	Asn	Val	Lys	Trp	Gln	Lys	Pro	Pro	Gly	Asp	Val	Asp	Ser
305						310					315				320
Tyr	Ser	Ile	Thr	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser	Lys	Thr
				325					330					335	
Leu	Ala	Pro	Pro	Val	Thr	Glu	Thr	Gln	Phe	Lys	Asp	Leu	Val	Pro	Gly
				340				345					350		
Arg	Leu	Tyr	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ile	Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Ala
		355					360					365			
Glu	Lys	Ser	Ala	Ala	Gly	Arg	Thr	Val	Pro	Glu	Lys	Val	Arg	Asn	Leu
		370					375					380			
Val	Ser	Tyr	Asn	Glu	Ile	Trp	Met	Lys	Ser	Phe	Thr	Val	Asn	Trp	Thr
385						390					395				400
Pro	Pro	Ala	Gly	Asp	Trp	Glu	His	Tyr	Arg	Ile	Val	Leu	Phe	Asn	Glu
				405					410					415	
Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Asn	Thr	Thr	Val	Gly	Lys	Glu	Glu	Thr	His	Tyr
				420				425					430		
Ala	Leu	Asp	Gly	Leu	Glu	Leu	Ile	Pro	Gly	Arg	Gln	Tyr	Glu	Ile	Glu
		435					440					445			

Val Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Arg Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly
 450 455 460
 Arg Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn
 465 470 475 480
 Glu Thr Ser Leu Gly Ile Thr Trp Arg Ala Pro Leu Gly Glu Trp Glu
 485 490 495
 Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Met Asp Arg Glu Leu Leu Val Ile His Lys
 500 505 510
 Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Met Pro
 515 520 525
 Gly Arg Asn Tyr Lys Ala Thr Val Thr Ser Met Ser Gly Asp Leu Lys
 530 535 540
 Gln Ser Ser Ser Ile Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp
 545 550 555 560
 Leu His Val Asn Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp
 565 570 575
 Thr Lys Ala Leu Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His
 580 585 590
 Glu Asn Val Val Val Lys Asn Glu Ser Val Ser Ser Asp Thr Ser Arg
 595 600 605
 Tyr Ser Phe Arg Ala Leu Lys Pro Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val
 610 615 620
 Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Ala Glu Gly
 625 630 635 640
 Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly
 645 650 655
 Arg Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Pro Ala Pro Gly Glu Val
 660 665 670
 Asp His Tyr Val Val Ser Leu Ser His Glu Gly Lys Val Asp Gln Phe
 675 680 685
 Leu Ile Ile Ala Lys Ser Val Ser Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr
 690 695 700

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Ala Lys Tyr Arg Ile Ala
 965 970 975

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

Gln Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Glu Val Val Ala Ala Asn Ala Tyr
 995 1000 1005

Ser Ser Asn Ser Leu Thr Val Ser Trp Gln Lys Ala Leu Gly Val
 1010 1015 1020

Ala Glu Arg Tyr Asp Ile Leu Leu Leu Asn Glu Asn Gly Leu Leu
 1025 1030 1035

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

Glu Asp Leu Thr Pro Gly Lys Lys Tyr Lys Met Gln Ile Leu Thr
 1055 1060 1065

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

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

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

Ser Trp Tyr Asn Ile Phe Leu Tyr Asn Pro Asp Arg Thr Leu Gln
 1115 1120 1125

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

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

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

Pro Ala Ala Val Asn His Leu Lys Gly Ser His Arg Asn Thr Thr
 1175 1180 1185

Asp Ser Leu Trp Phe Ser Trp Ser Pro Ala Ser Gly Asp Phe Asp

1190		1195		1200
Phe Tyr	Glu Leu Ile Leu	Tyr Asn Pro Asn Gly	Thr Lys Lys Glu	
1205		1210	1215	
Asn Trp	Lys Glu Lys Asp	Val Thr Glu Trp Arg	Phe Gln Gly Leu	
1220		1225	1230	
Val Pro	Gly Arg Lys Tyr	Thr Leu Tyr Val Val	Thr His Ser Gly	
1235		1240	1245	
Asp Leu	Ser Asn Lys Val	Thr Gly Glu Gly Arg	Thr Ala Pro Ser	
1250		1255	1260	
Pro Pro	Ser Leu Leu Ser	Phe Ala Asp Val Ala	Asn Thr Ser Leu	
1265		1270	1275	
Ala Ile	Thr Trp Lys Gly	Pro Pro Asp Trp Thr	Asp Tyr Asn Asp	
1280		1285	1290	
Phe Glu	Leu Gln Trp Phe	Pro Gly Asp Ala Leu	Thr Ile Phe Asn	
1295		1300	1305	
Pro Tyr	Ser Ser Arg Lys	Ser Glu Gly Arg Ile	Val Tyr Gly Leu	
1310		1315	1320	
His Pro	Gly Arg Ser Tyr	Gln Phe Ser Val Lys	Thr Val Ser Gly	
1325		1330	1335	
Asp Ser	Trp Lys Thr Tyr	Ser Lys Pro Ile Ser	Gly Ser Val Arg	
1340		1345	1350	
Thr Lys	Pro Asp Lys Ile	Gln Asn Leu His Cys	Arg Pro Gln Asn	
1355		1360	1365	
Ser Thr	Ala Ile Ala Cys	Ser Trp Ile Pro Pro	Asp Ser Asp Phe	
1370		1375	1380	
Asp Gly	Tyr Ser Ile Glu	Cys Arg Lys Met Asp	Thr Gln Glu Ile	
1385		1390	1395	
Glu Phe	Ser Arg Lys Leu	Glu Lys Glu Lys Ser	Leu Leu Asn Ile	
1400		1405	1410	
Met Met	Leu Val Pro His	Lys Arg Tyr Leu Val	Ser Ile Lys Val	
1415		1420	1425	

Gln Ser	Ala Gly Met Thr Ser	Glu Val Val Glu Asp	Ser Thr Ile
1430	1435	1440	
Thr Met	Ile Asp Arg Pro Pro	Gln Pro Pro Pro His	Ile Arg Val
1445	1450	1455	
Asn Glu	Lys Asp Val Leu Ile	Ser Lys Ser Ser Ile	Asn Phe Thr
1460	1465	1470	
Val Asn	Cys Ser Trp Phe Ser	Asp Thr Asn Gly Ala	Val Lys Tyr
1475	1480	1485	
Phe Ala	Val Val Val Arg Glu	Ala Asp Ser Met Asp	Glu Leu Lys
1490	1495	1500	
Pro Glu	Gln Gln His Pro Leu	Pro Ser Tyr Leu Glu	Tyr Arg His
1505	1510	1515	
Asn Ala	Ser Ile Arg Val Tyr	Gln Thr Asn Tyr Phe	Ala Ser Lys
1520	1525	1530	
Cys Ala	Glu Ser Pro Asp Ser	Ser Ser Lys Ser Phe	Asn Ile Lys
1535	1540	1545	
Leu Gly	Ala Glu Met Asp Ser	Leu Gly Gly Lys Cys	Asp Pro Ser
1550	1555	1560	
Gln Gln	Lys Phe Cys Asp Gly	Pro Leu Lys Pro His	Thr Ala Tyr
1565	1570	1575	
Arg Ile	Ser Ile Arg Ala Phe	Thr Gln Leu Phe Asp	Glu Asp Leu
1580	1585	1590	
Lys Glu	Phe Thr Lys Pro Leu	Tyr Ser Asp Thr Phe	Phe Ser Met
1595	1600	1605	
Pro Ile	Thr Thr Glu Ser Glu	Pro Leu Phe Gly Val	Ile Glu Arg
1610	1615	1620	
Gly Arg	His His His His His	His Gly	
1625	1630		

<210> 8

<211> 774

<212> PRT

<213> Sequencia artificial

<220>

<223> molécula química humano-murganho

<400> 8

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

Val Gln Thr Gly Val Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
 20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
 35 40 45

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

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
 65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
 85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
 100 105 110

Pro Ala Arg Phe Glu Val Asn Arg Glu Lys Thr Ala Ser Thr Thr Leu
 115 120 125

Gln Val Arg Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Ser Trp Tyr Glu Val
 130 135 140

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

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

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

Phe Pro Val Tyr Ile Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
 195 200 205

Leu Gly Ile Ser Pro Asn Pro Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Arg
 210 215 220

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

Ala Ile Val Gln Asp Thr Asn Val Asp Arg Arg Asp Thr Ser Tyr Ala
 245 250 255

Phe His Glu Leu Thr Pro Gly His Leu Tyr Asn Leu Thr Ile Val Thr
 260 265 270

Met Ala Ser Gly Leu Gln Asn Ser Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
 275 280 285

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Arg Leu Thr
 290 295 300

Ser Leu Asn Val Lys Trp Gln Lys Pro Pro Gly Asp Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320

Ser Ile Thr Leu Ser His Gln Gly Thr Ile Lys Glu Ser Lys Thr Leu
 325 330 335

Ala Pro Pro Val Thr Glu Thr Gln Phe Lys Asp Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350

Leu Tyr Gln Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Gly Glu Leu Ser Ala Glu
 355 360 365

Lys Ser Ala Ala Gly Arg Thr Val Pro Glu Lys Val Arg Asn Leu Val
 370 375 380

Ser Tyr Asn Glu Ile Trp Met Lys Ser Phe Thr Val Asn Trp Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Ala Gly Asp Trp Glu His Tyr Arg Ile Val Leu Phe Asn Glu Ser
 405 410 415

Leu Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr His Tyr Ala
 420 425 430

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Lys Gly Asn Ser Ala Asp Ile
 725 730 735

Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly
 740 745 750

Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly
 755 760 765

His His His His His His
 770

<210> 9

<211> 775

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> molécula química humano-murganho

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys
 195 200 205

Asp Leu Gly Ile Ser Pro Asn Pro Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser
 210 215 220

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

Gly Ala Ile Val Gln Asp Thr Asn Val Asp Arg Arg Asp Thr Ser Tyr
 245 250 255

Ala Phe His Glu Leu Thr Pro Gly His Leu Tyr Asn Leu Thr Ile Val
 260 265 270

Thr Met Ala Ser Gly Leu Gln Asn Ser Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr
 275 280 285

Ala Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Arg Leu
 290 295 300

Thr Ser Leu Asn Val Lys Trp Gln Lys Pro Pro Gly Asp Val Asp Ser
 305 310 315 320

Tyr Ser Ile Thr Leu Ser His Gln Gly Thr Ile Lys Glu Ser Lys Thr
 325 330 335

Leu Ala Pro Pro Val Thr Glu Thr Gln Phe Lys Asp Leu Val Pro Gly
 340 345 350

Arg Leu Tyr Gln Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Gly Glu Leu Ser Ala
 355 360 365

Glu Lys Ser Ala Ala Gly Arg Thr Val Pro Glu Lys Val Arg Asn Leu
 370 375 380

Val Ser Tyr Asn Glu Ile Trp Met Lys Ser Phe Thr Val Asn Trp Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Ala Gly Asp Trp Glu His Tyr Arg Ile Val Leu Phe Asn Glu
 405 410 415

Ser Leu Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr His Tyr
 420 425 430

Ala Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ile Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Ile Glu
 435 440 445

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp His Tyr Val Val Ser Leu Ser His Glu Gly Lys Val Asp Gln Phe

675		680		685
Leu Ile Ile Ala Lys Ser Val Ser Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr				
690		695		700
Pro Gly Arg Leu Tyr Asn Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Asn Tyr				
705		710		715
Ala Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Lys Gly Asn Ser Ala Asp				
		725		730
Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu				
		740		745
Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr				
		755		760
Gly His His His His His His				
770		775		

<210> 10

< 211> 774

< 212> PRT

< 213> Sequência artificial

<220>

<223> molécula química humano-murganho

<400> 10

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

Val Gln Thr Gly Val Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
35 40 45

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

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile
85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
100 105 110

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

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

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

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

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

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
 195 200 205

Leu Gly Ile Ser Pro Asn Pro Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Arg
 210 215 220

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

Ala Ile Val Gln Asp Thr Asn Val Asp Arg Arg Asp Thr Ser Tyr Ala
 245 250 255

Phe His Glu Leu Thr Pro Gly His Leu Tyr Asn Leu Thr Ile Val Thr
 260 265 270

Met Ala Ser Gly Leu Gln Asn Ser Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
 275 280 285

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Arg Leu Thr
 290 295 300

Ser Leu Asn Val Lys Trp Gln Lys Pro Pro Gly Asp Val Asp Ser Tyr
 305 310 315 320

Ser Ile Thr Leu Ser His Gln Gly Thr Ile Lys Glu Ser Lys Thr Leu
 325 330 335

Ala Pro Pro Val Thr Glu Thr Gln Phe Lys Asp Leu Val Pro Gly Arg
 340 345 350

Leu Tyr Gln Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Gly Glu Leu Ser Ala Glu

355		360		365
Lys Ser Ala Ala Gly Arg Thr Val Pro Glu Lys Val Arg Asn Leu Val				
370		375		380
Ser Tyr Asn Glu Ile Trp Met Lys Ser Phe Thr Val Asn Trp Thr Pro				
385		390		395
				400
Pro Ala Gly Asp Trp Glu His Tyr Arg Ile Val Leu Phe Asn Glu Ser				
		405		410
				415
Leu Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr His Tyr Ala				
		420		425
				430
Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ile Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Ile Glu Val				
		435		440
				445
Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Arg Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly Arg				
		450		455
				460
Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn Glu				
		465		470
				475
Thr Ser Leu Gly Ile Thr Trp Arg Ala Pro Leu Gly Glu Trp Glu Lys				
		485		490
				495
Tyr Ile Ile Ser Leu Met Asp Arg Glu Leu Leu Val Ile His Lys Ser				
		500		505
				510
Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Met Pro Gly				
		515		520
				525
Arg Asn Tyr Lys Ala Thr Val Thr Ser Met Ser Gly Asp Leu Lys Gln				
		530		535
				540
Ser Ser Ser Ile Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp Leu				
		545		550
				555
				560
His Val Asn Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp Thr				
		565		570
				575
Lys Ala Leu Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His Glu				
		580		585
				590
Asn Val Val Val Lys Asn Glu Ser Val Ser Ser Asp Thr Ser Arg Tyr				
		595		600
				605

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

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

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

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

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

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

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

Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Lys Gly Asn Ser Ala Asp Ile
725 730 735

Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly
740 745 750

Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly
755 760 765

His His His His His
770

<210> 11

< 211> 89

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 11

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

Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu Gly Ser Pro Cys
20 25 30

Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly Ala Ala Leu Cys
35 40 45

PE2371865

- 112 -

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

Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Lys Ile Ile Ser Leu Asp Glu
65 70 75 80

Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp
85

Lisboa, 9 de outubro de 2017

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo isolado que se liga à fosfatase tirosina de proteínas humana beta (FTH β), em que o anticorpo isolado é um anticorpo monoclonal, em que o anticorpo monoclonal compreende duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas, em que o referido anticorpo isolado regula positivamente a angiogênese, em que o anticorpo isolado se liga à primeira repetição FN3 de FTH β , em que a primeira repetição FN3 de FTH β possui a sequência mostrada em SEQ ID NO: 11.

2. O anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, o anticorpo monoclonal sendo produzido pela linha celular de hibridoma ATCC Nº PTA-7580.

3. O anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo isolado é humanizado.

4. O anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 1, que compreende regiões determinantes de complementaridade do anticorpo monoclonal produzido pela linha celular de hibridoma ATCC Nº PTA-7580 e é humanizado.

5. Um fragmento de ligação ao antígeno isolado de um anticorpo monoclonal que se liga à fosfatase tirosina de proteínas humana beta (FTH β), em que o fragmento de ligação ao antígeno do anticorpo monoclonal é um fragmento

Fab, em que o referido fragmento de ligação ao antígeno regula negativamente a angiogénese, em que o fragmento de ligação ao antígeno liga-se à primeira repetição FN3 de FTH₆, em que a primeira repetição FN3 de FTH₆ possui a sequência mostrada em SEQ ID NO: 11.

6. O fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 5, o fragmento de ligação ao antígeno do anticorpo monoclonal sendo produzido pela linha celular de hibridoma ATCC Nº PTA-7580.

7. O fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 5, em que o fragmento de ligação ao antígeno é humanizado.

8. O fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 5, o fragmento de ligação ao antígeno do anticorpo monoclonal compreendendo regiões determinantes de complementaridade do anticorpo monoclonal produzido pela linha celular de hibridoma ATCC Nº PTA-7580 e sendo humanizado.

Lisboa, 9 de outubro de 2017

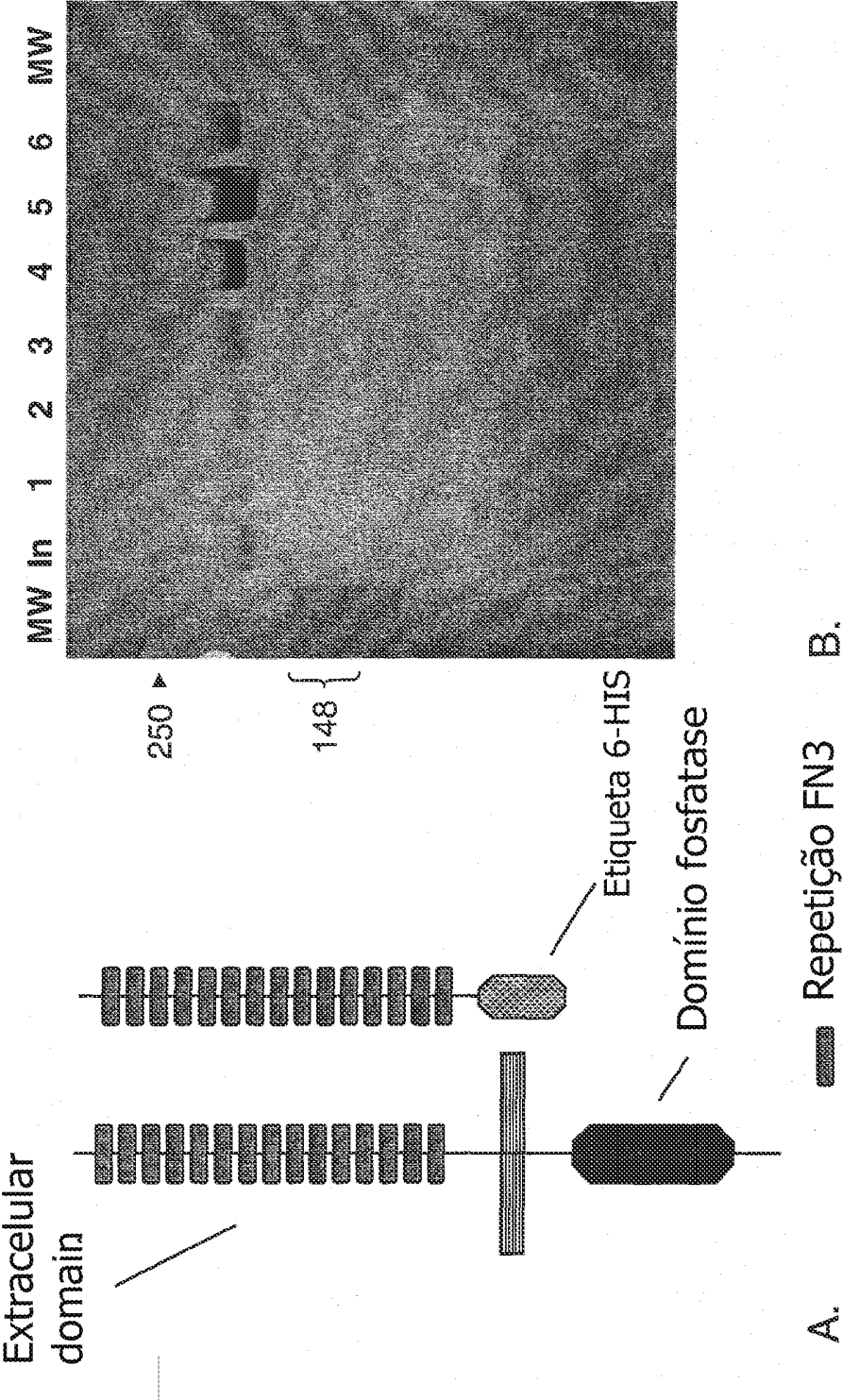


Figura 1

control
R15E6
VEGFR2/Tie-2

Anticorpo de IP:

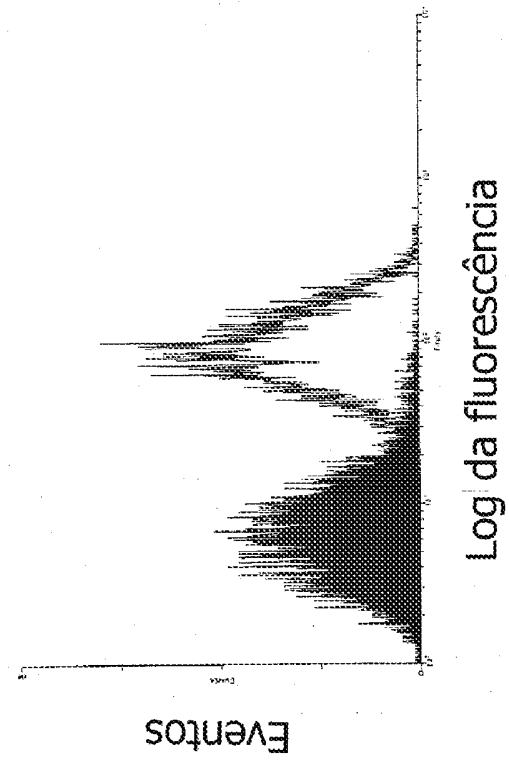
HPTPβ -

- VEGFR2

- Tie2

A.

Preto=controle
Branco= R15E6



B.

Figura 2

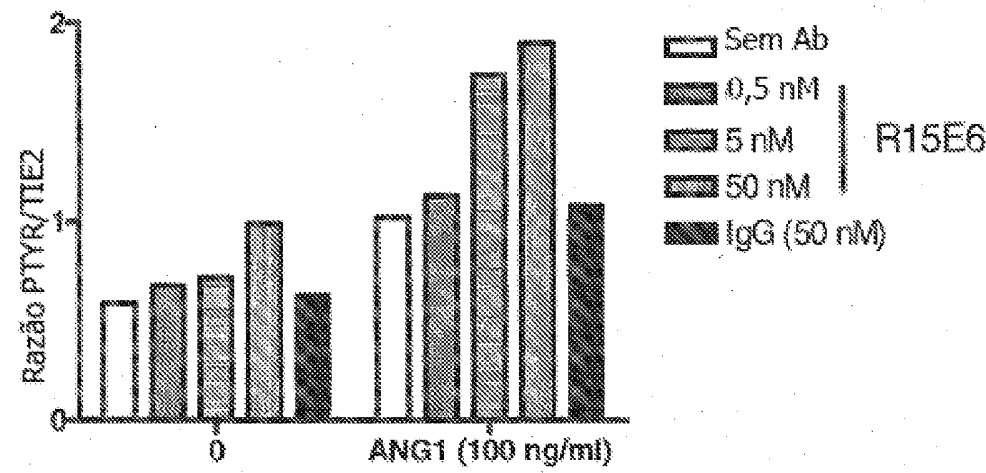


Figura 3

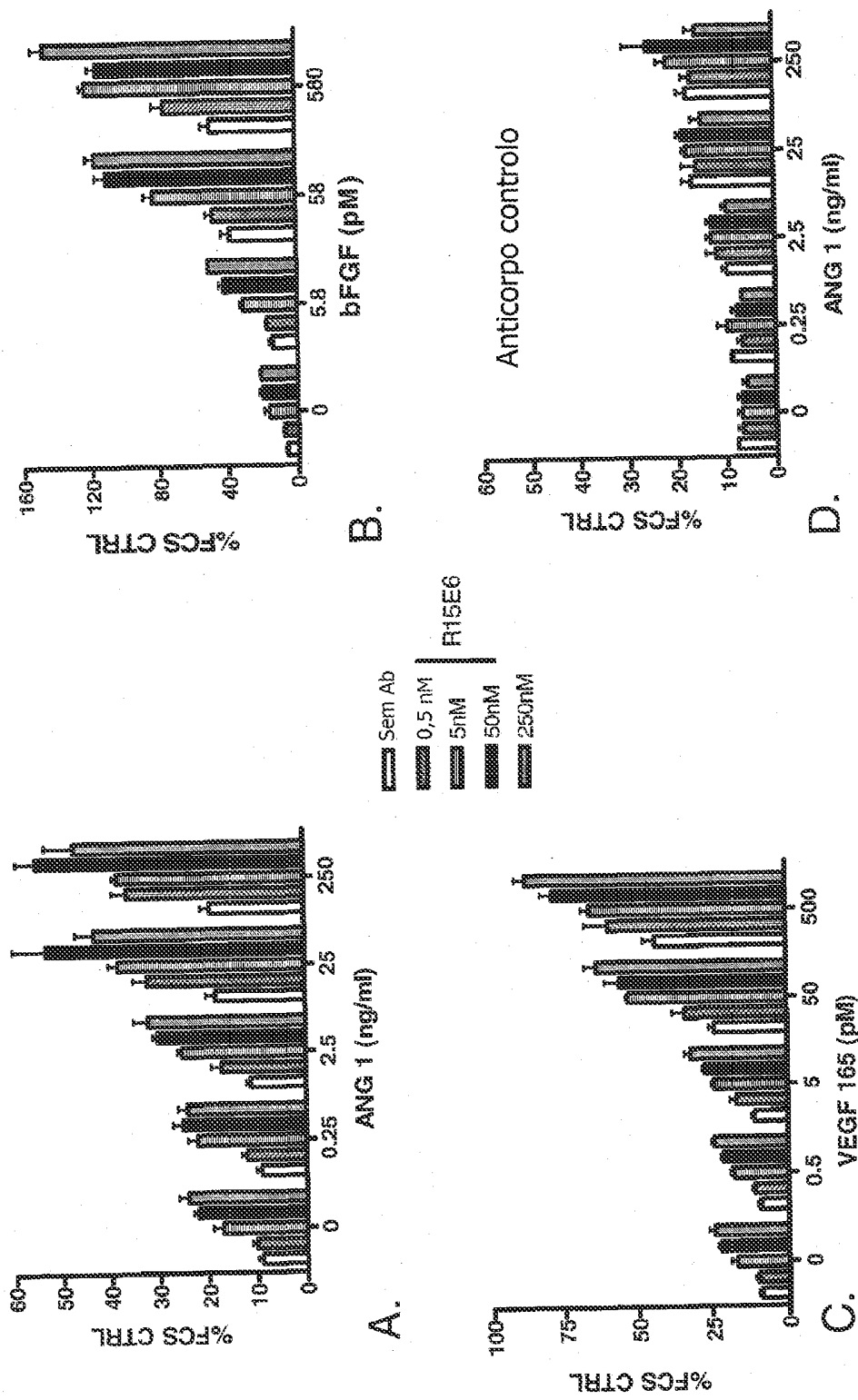


Figura 4

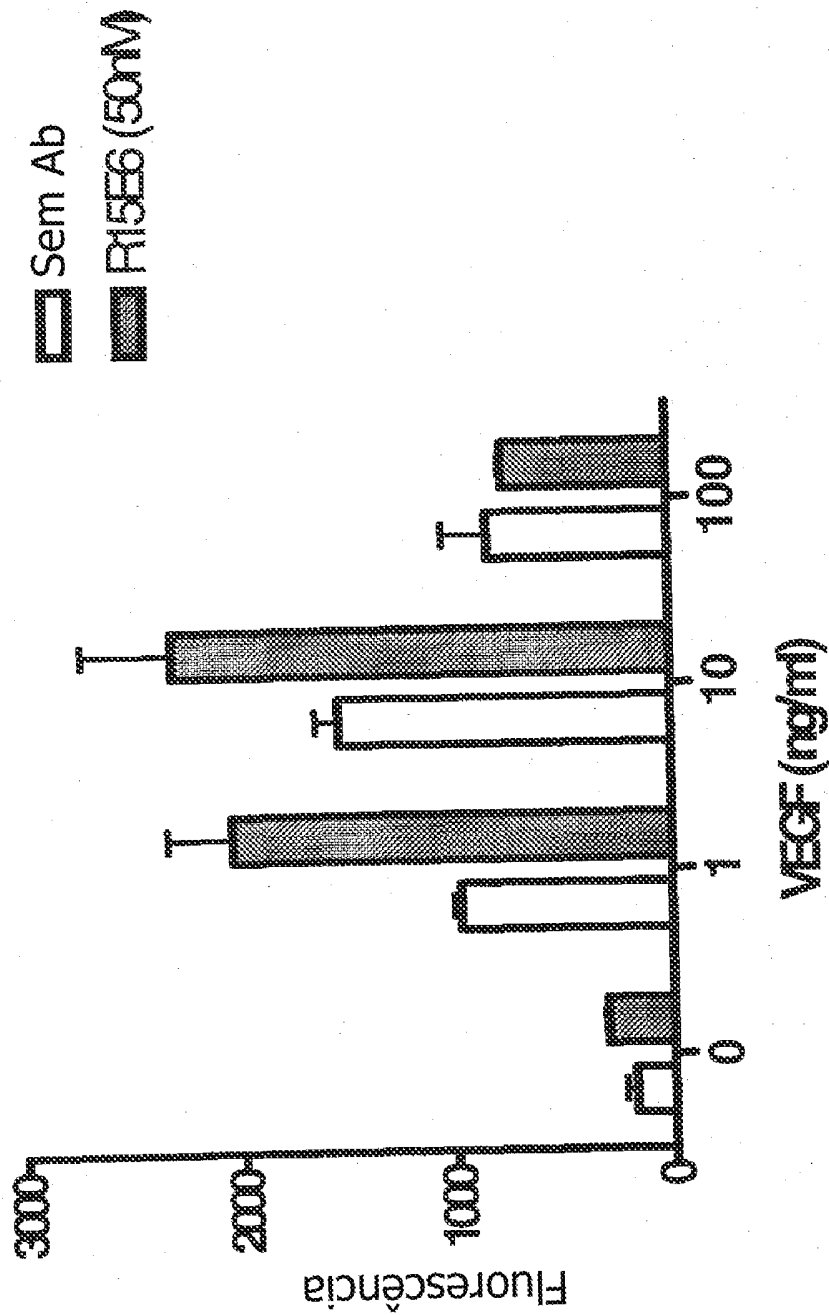


Figura 5

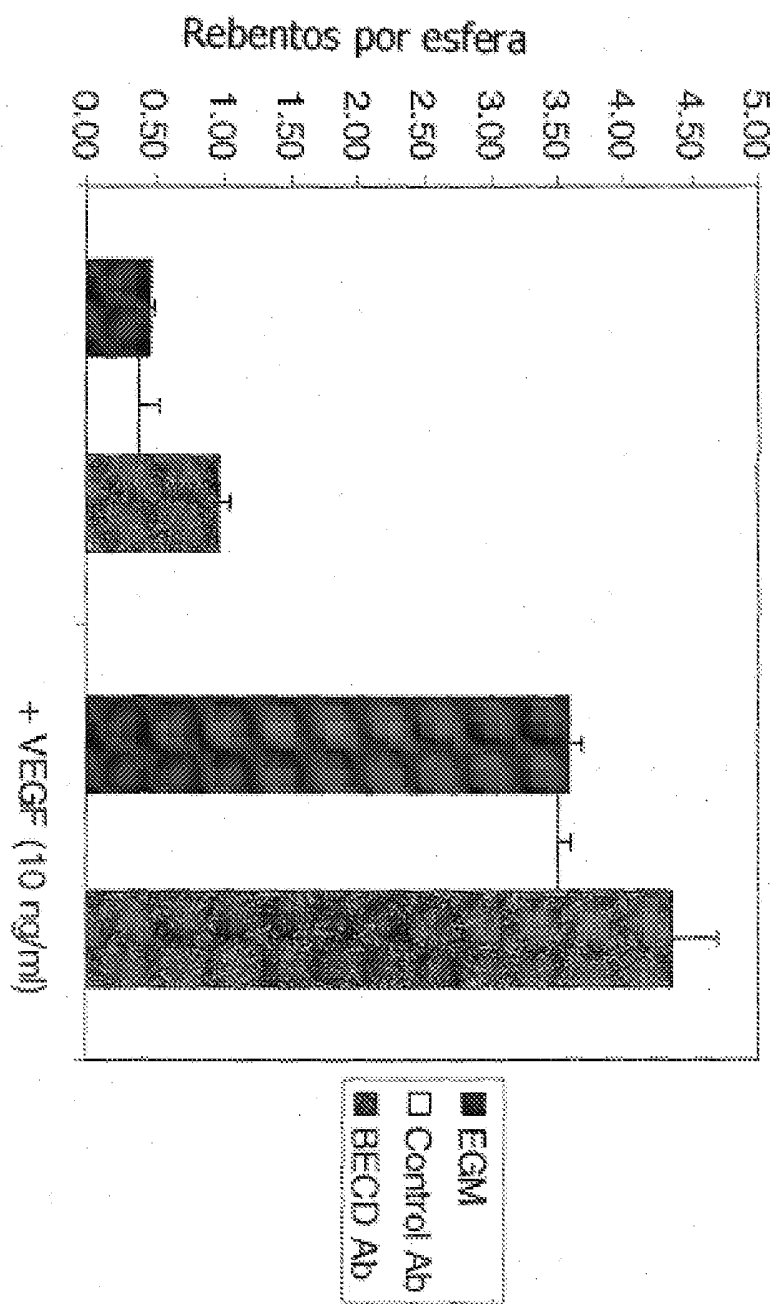


Figura 6

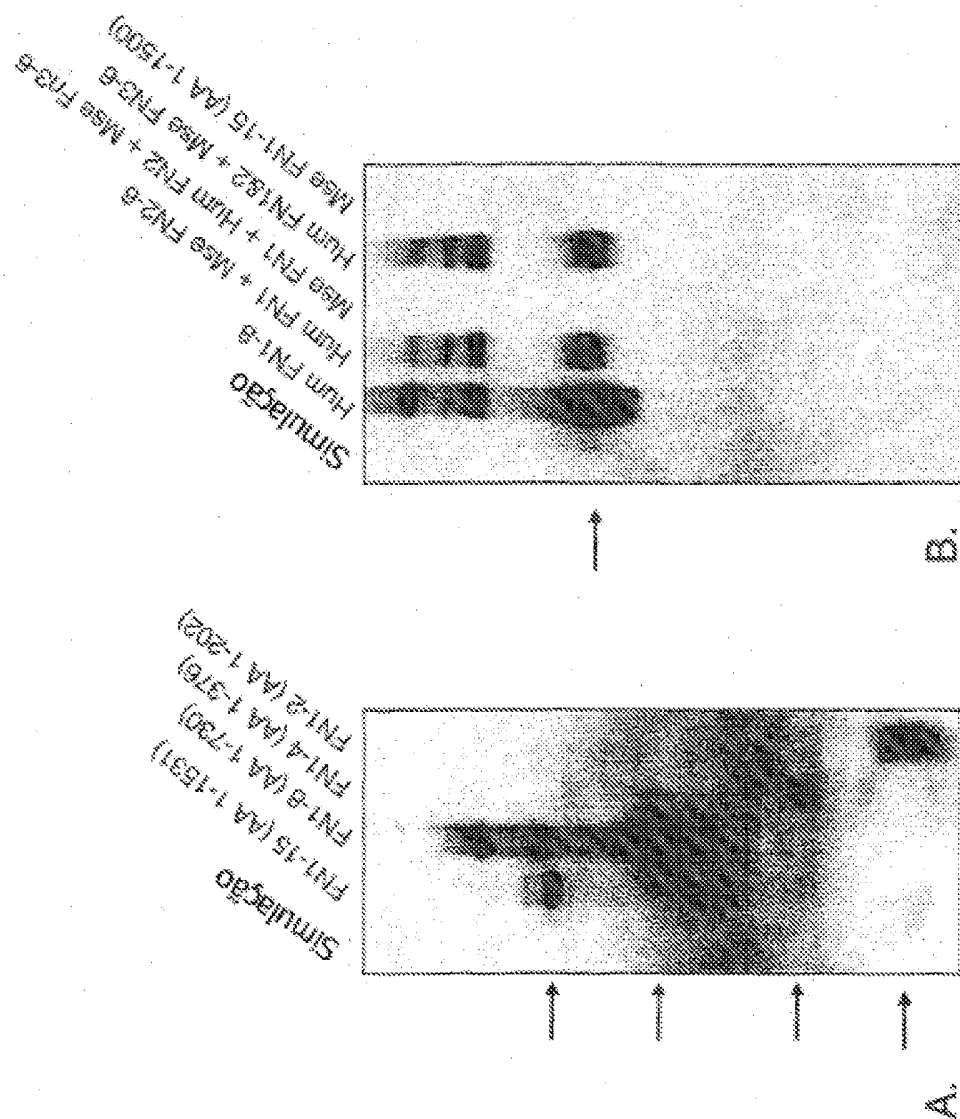


Figura 7

Figura 8

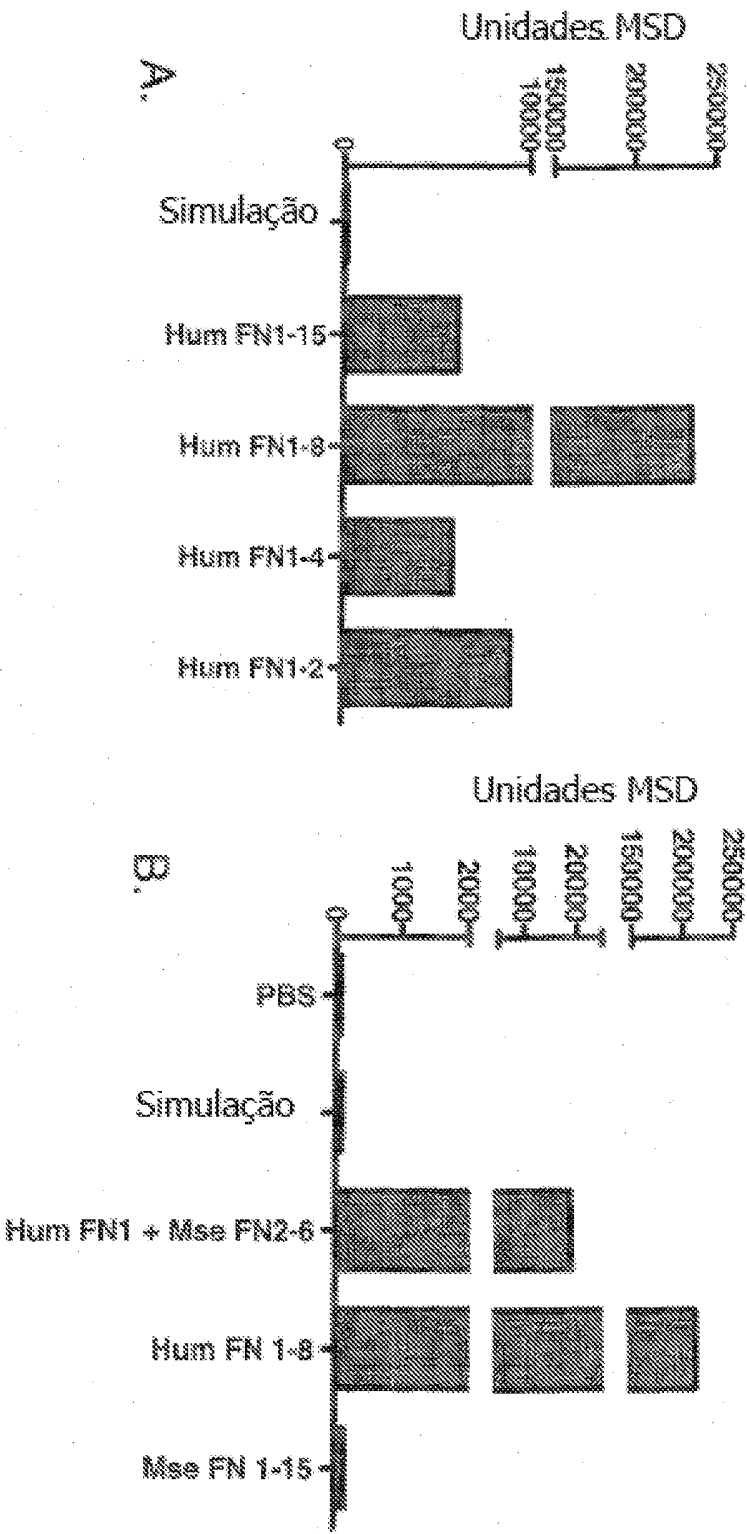
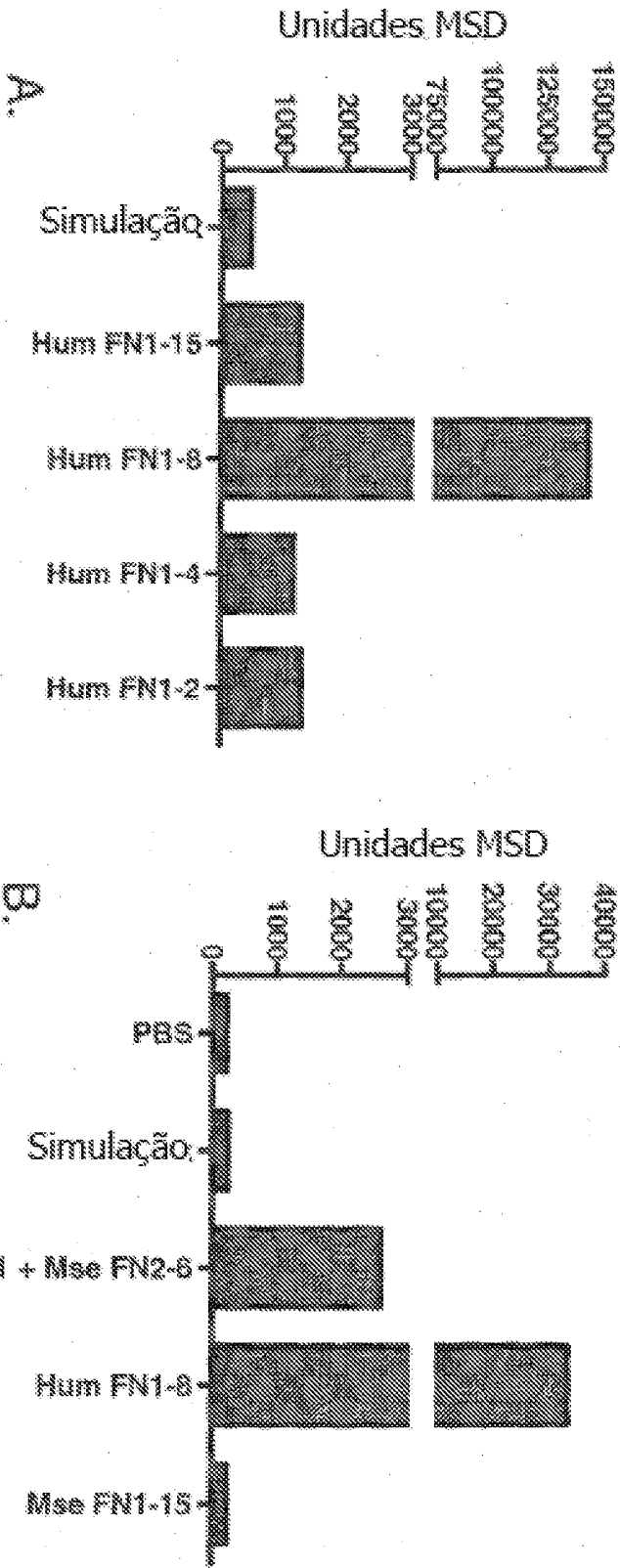


Figura 9



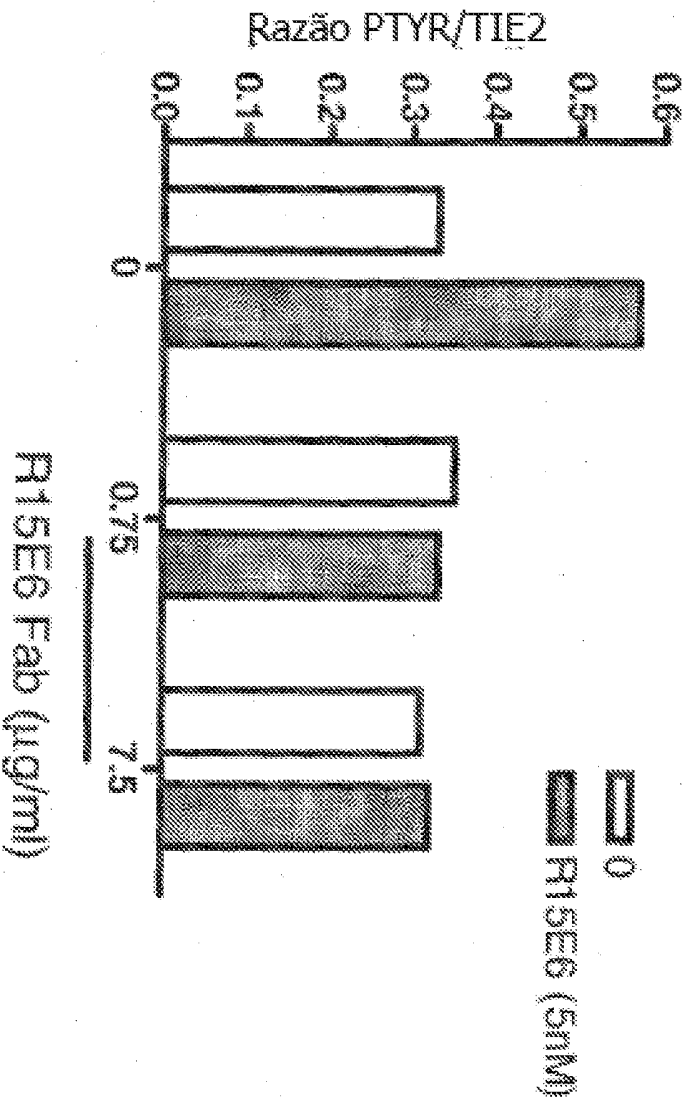


Figura 10

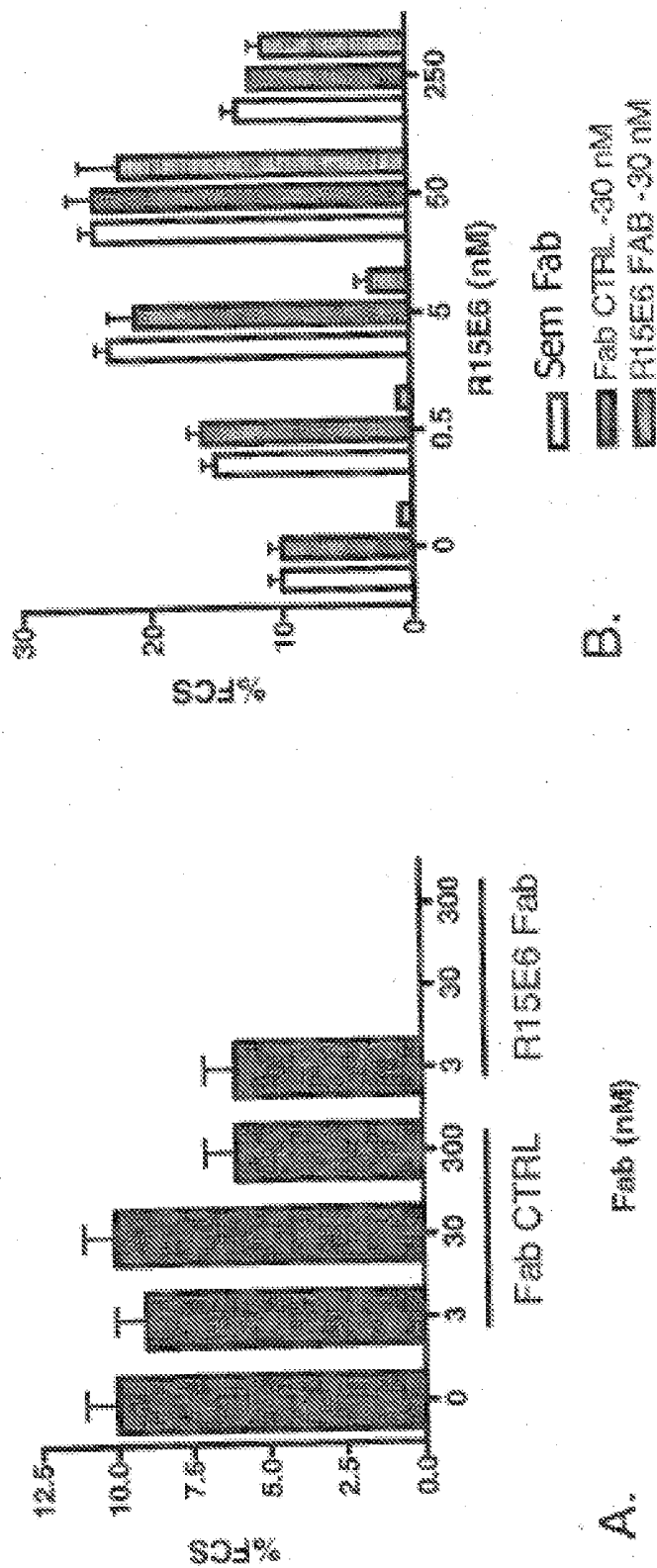


Figura 11

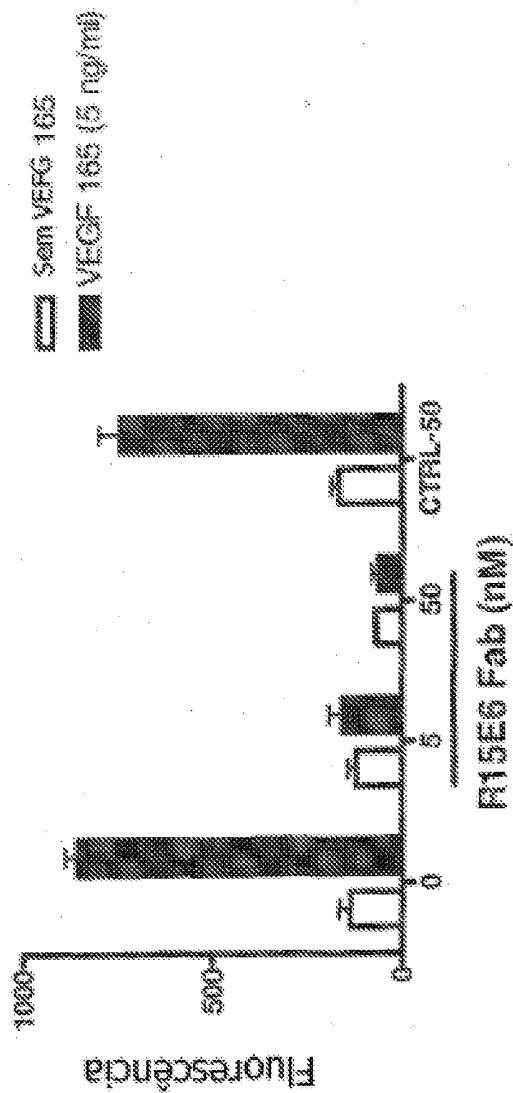


Figura 12

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- ¿ WO0065085A
- ¿ US 20040077065A
- ¿ US 4816567A
- ¿ US 5225539A
- ¿ US 6162963A
- ¿ US 6150584A
- ¿ US 6114598A
- ¿ US 6075181A
- ¿ US 5545807A
- ¿ US 5545806A
- ¿ US 5625825A
- ¿ WO9312227A
- ¿ US 4399216A
- ¿ US 4912040A
- ¿ US 4740461A
- ¿ US 4959455A
- ¿ US 4522811A
- ¿ US 11155518B
- ¿ US 60790506B
- ¿ US 60798896B

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- ¿ NGUYEN, L.L. et al. Int. Rev. Cytol., 2001, vol. 204, 1-48
- ¿ BUSSOLINO, F. Trends Biochem. Sci., 1997, vol. 22, 251-256
- ¿ Tumor Angiogenesis FOLKMAN et al. The Molecular Basis of Cancer W. B. Saunders 1995 0000206-32
- ¿ WEIDNER New Eng. J. Med., 1991, vol. 324, 11-8

- ¿ O'REILLY et al. *Cell*, 1994, vol. 79, 315-28 O'REILLY et al. *Cell*, 1997, vol. 88, 277-85
- ¿ TEISCHER et al. *Int. J. Cancer*, 1994, vol. 57, 920-25
- ¿ YANCOPOULOS et al. *Nature*, 2000, vol. 407, 242-248 HUANG et al. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, vol. 274, 38183-38185
- ¿ SURF et al. *Science*, 1998, vol. 282, 468-471
- ¿ LIN et al. *J Clin. Invest.*, 1997, vol. 100, 2072-2078
- ¿ THURSTON et al. *Nature Medicine*, 2000, vol. 6, 460-463
- ¿ KRUEGAR et al. *EMBO J.*, 1990, vol. 9,
- ¿ Basic and Clinical Immunology Appleton & Lange 1994 000071-
- ¿ MUYLDERMANS, S. *Rev. Mol. Biotechnol.*, 2001, vol. 74, 277-302
- ¿ KABAT et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest* Public Health Service, National Institutes of Health 1991 0000
- ¿ CLACKSON et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628
- ¿ MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855
- ¿ HUDSON et al. *Nature Med.*, 2003, vol. 9, 129-134
- ¿ KIPRIYANOV LE GALL *Molecular Biotechnol* Humana Press, Totowa 2004 0000 vol. 26, 39-60
- ¿ LO *Methods Mol. Biol.* Humana Press 2004 0000 vol. 248, 135-159
- ¿ WU et al. *J. Mol. Biol.*, 1999, vol. 294, 151-162
- ¿ *Methods Enzymol.* Academic Press vol. 185,
- ¿ AUERBACH, R. et al. *Clin Chem*, 2003, vol. 49, 32-40
- ¿ VAILHE, B. et al. *Lab Invest*, 2001, vol. 81, 439-452
- ¿ SIMONS et al. *Clinical trials in coronary angiogenesis* *Circulation*, 2000, vol. 102, 73-86
- ¿ HOCKFIELD, S. et al. *Immunocytochemistry* Cold Spring Harbor Laboratory Press 1993 0000 vol. 1, 111-201
- ¿ GODING, J. W. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practices* Academic Press 1996 0000 145-
- ¿ SPITZ, M. *Methods In Enzymology* Academic Press 1986 0000 vol. 121, 33-41

z The monoclonal antibody R15E6 American Type Culture Collection
(ATCC)20060504