



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 160**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07866627 .8**

96 Fecha de presentación : **28.11.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2092069**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.08.2009**

54

Título: **Fusiones de Fc con receptor para FGF soluble modificadas con actividad biológica mejorada.**

30

Prioridad: **28.11.2006 EP 06291824**
11.01.2007 EP 07290042

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.10.2011

73

Titular/es: **AVENTIS PHARMA S.A.**
20, avenue Raymond Aron
92160 Antony, FR

72

Inventor/es: **Nesbit, Mark;**
Cameron, Béatrice;
Blanche, Francis;
Sordello, Sylvie;
Nicolazzi, Céline y
Trombe, Marc

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 160 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fusiones de Fc con receptor con receptor para FGF soluble modificadas con actividad biológica mejorada

Campo de la invención e Introducción

5 La invención se refiere a fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas que comprenden una fusión de un fragmento o dominio soluble del receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, que tienen actividad biológica mejorada, composiciones que las contienen, y método para producir tales moléculas de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificadas. Particularmente, las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas han mejorado la actividad anti-angiogénica y las actividades de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos anti-tumorales, concretamente ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y/o CDC (citotoxicidad dependiente de complemento), y son así útiles en el tratamiento de cáncer, tumores metastáticos y para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto. La invención se refiere además a dichas fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas para usar en la inhibición del crecimiento tumoral y para el tratamiento o prevención de situaciones patológicas que incluyen, aunque no están limitadas a, cáncer de mama, melanoma, leucemia, metástasis cerebral, cáncer renal, melanoma primario, cáncer de colon primario, cáncer de vesícula primario, hemangioma infantil, cáncer de ovario, cáncer de próstata y cáncer de pulmón.

Antecedentes y Relevancia de la Invención

15 La angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los pre-existentes, implica una compleja coordinación de proliferación de células endoteliales, migración, degradación de la membrana basal, y organización de los nuevos vasos (Ji et al., 1998, FASEB J. 12:1731-1738). La liberación local, incontrolada, de factores de crecimiento angiogénicos y/o alteraciones de la producción de inhibidores angiogénicos naturales, con una posterior alteración del balance angiogénico (Hanahan et al, 1996, Cell. 86: 353-64) son responsables de la proliferación incontrolada de células endoteliales que tiene lugar durante la neovascularización tumoral y en las enfermedades dependientes de angiogénesis (Folkman, 1995, Nat. Med. 1:27-31).

20 Se han identificado numerosos inductores naturales de angiogénesis, incluyendo miembros de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, que transforman el factor de crecimiento α y β (TGF- α y - β), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor- α de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquinas, quemocinas, y los miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Estos potentes factores angiogénicos están a menudo sobre-expresados por tejidos tumorales (Presta, 2005, Cytokine & Growth Factors Reviews. 16: 159-178; Grose, 2005, Cytokine & Growth Factors Reviews. 16: 179-186).

25 De hecho, los FGFs, y más especialmente FGF2, están sobre-expresados en numerosos cánceres humanos que incluyen melanoma (Halaban, 1996, Semin Oncol. 23:673-81; Hanada, 2001, Cancer Res. 61: 5511-5516), leucemia (Krejci et al, 2001 Leukemia. 15:228-37, Bieker et al, 2003, Cancer Res. 63: 7241-7246), cáncer renal (Hanada, 2001, Cancer Res. 61: 5511-5516), cáncer de colon (Tassi, 2006, Cancer Res. 66:1191-1198), cáncer de ovario (Whitworth et al, 2005, Clin Cancer Res. 11:4282-4288, Gan et al, 2006, Pharm Res. 23:1324-31), cáncer de próstata (Aigner et al, 2002 Oncogene, 21:5733-42; Kwabi-Addo et al, 2004, Endocr Relat Cancer. 11:709-24) y cáncer de pulmón (Takanami et al, 1996, Pathol Res Pract. 192:1113-20; Volm et al, 1997, Anticancer Res. 17:99-103; Brattstrom et al, 1998, Anticancer Res. 18: 1123-1127). Además, la sobre-expresión de FGF2 puede correlacionarse con una quimioresistencia en ciertos cánceres que incluyen cánceres de vejiga, mama, cabeza y cuello (Gan et al, 2006, Pharm Res. 23:1324-31). Con respecto a los miembros de la familia de FGF, como los FGFs secretados por células tumorales tienen afinidades por las cadenas laterales de glicosaminoglicanos de los proteoglicanos de la superficie y matriz celular, estos FGFs secretados se retienen más probablemente cerca de células tumorales que forman depósitos de FGF. Esta particularidad hace que el FGF dirija una buena estrategia para dirigir una molécula activa que necesita una molécula diana expresada de forma estable y fácilmente accesible.

30 Diversos productos basados en anticuerpos se usan normalmente como fármacos terapéuticos y diversos anticuerpos monoclonales (mAbs) están aprobados actualmente en diversas áreas terapéuticas tales como oncología, inflamación, enfermedad infecciosa y enfermedad cardiovascular. Estos mAbs inducen la matanza de células tumorales mediante múltiples mecanismos que incluyen el reclutamiento del sistema inmune (Harris, 2004, Lancet Oncol, 5: 292-302). El resto Fc de los mAbs es responsable de estas funciones inductoras mediadas de forma inmune que incluyen dos mecanismos principales: Citotoxicidad mediada por Células Dependientes de Anticuerpos (ADCC) y Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC). ADCC se da cuando un mAb se enlaza primero por medio de su sitio de enlace a antígeno a su diana en las células tumorales, y después la parte Fc se reconoce mediante receptores Fc específicos (FcR) en las células inductoras (es decir, NK, neutrófilos, macrófagos...) que atacan a la célula diana. CDC es un proceso donde una cascada de proteínas complemento diferentes se activan cuando un mAb se enlaza a C1q llevando a la formación de C3b en la superficie de células tumorales recubiertas con anticuerpos cerca del sitio de activación del complemento. La presencia de C3b controla la formación del complejo de ataque a la membrana C5-C9 que puede insertarse en la membrana para lisar células tumorales (Sharkey, 2007, CA Cancer J Clin, 56: 226-243). La capacidad de los mAbs para estimular ADCC depende de su isotipo. Los anticuerpos IgG1 e IgG3 enlazan fuertemente con FcRs, mientras que los anticuerpos IgG4 e IgG2 enlazan débilmente. La capacidad CDC de mAb también depende del isotipo de mAb. IgG3 y, en menor

grado, IgG1 son los isotipos más eficaces para estimular la cascada de complemento clásica. Los mAbs de IgG2 son menos eficaces en la activación de la cascada de complemento, mientras que IgG4 es incapaz de hacerlo (Strome, 2007, *The Oncologist*, 12:1084-1095).

5 El uso de una proteína de fusión que puede tener, como los anticuerpos, una funcionalidad dual con una parte de enlace que muestra un reconocimiento específico y una parte inductora capaz de inducir la lisis de células diana por reclutamiento del sistema inmune, es un aspecto de estas estrategias terapéuticas. Además, para ser útil en terapia, esta molécula necesitaría tener propiedades farmacocinéticas PK ventajosas. El resto Fc puede aumentar de forma detectable la vida media en suero de la fusión Fc con receptor FGF soluble modificado, aunque hay aún una necesidad de proteína de fusión con una vida media en suero más larga. Finalmente, si esta proteína de fusión se va a usar como un fármaco, es necesario que se produzca de forma fiable, eficaz y con productividad apropiada.

10 Así, hay una necesidad de una proteína de fusión con actividades ADCC y/o CDC que dirijan el FGF para el tratamiento de cáncer, tumores metastáticos y para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto, con características PK mejoradas, y que pueda producirse de forma eficaz.

15 Se han descrito diferentes fusiones Fc con receptores para FGF solubles en técnicas anteriores pero ninguna de ellas se produjeron en una línea celular modificada para mejorar sus propiedades (Powell, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277:28554-28563 ; Anderson, 1998, *Hum. Mol. Genet.*, 7:1475-1483; documento WO00/46380).

20 Los solicitantes han descubierto ahora que las proteínas de fusión solubles entre la parte del receptor para FGF soluble (resto de enlace o director) y la parte Fc (resto de función inductora) (sFGFR-Fc) que se modifican para tener un perfil glicano particular tienen, de hecho, actividades biológicas esencialmente mejoradas, que incluyen las actividades ADCC y/o CDC, y pueden usarse así como eficaces fármacos anti-angiogénicos y anti-tumorales, para el tratamiento de crecimiento celular incontrolado o cáncer. Estas proteínas de fusión solubles modificadas tienen ventajosas propiedades PK debido a su grado de sialilación, y pueden producirse con productividad apropiada y agregación mínima por su patrón de glicosilación.

Resumen de la invención

25 La presente invención está dirigida así a un Fc con receptor para FGF soluble modificado que comprende una fusión de un fragmento o dominio soluble de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde al menos el 5° sitio de N-glicosilación del resto receptor para FGF está ocupado, y en donde como máximo el 45% de los N-glicanos del resto de receptor para FGF no tienen grupo sialilo. Además, según una realización preferida adicional de la invención, los sitios 3°, 4°, 6° y 7° de N-glicosilación del resto del receptor para FGF están ocupados. Preferiblemente, todos los sitios de N-glicosilación están ocupados. En una realización preferida adicional, el número promedio de ácido siálico por N-glicano en el resto del receptor para FGF de las fusiones de la invención es al menos 0,9; incluso más preferiblemente, es al menos 1,2. Cada molécula de N-glicano de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la presente invención comprende 3 residuos de manosa, por término medio de 1,5 a 3,0 residuos de galactosa, de 3,5 a 5 residuos de N-acetilglucosamina, y de 0,6 a 1 residuos de fucosa.

35 La presente invención está dirigida también a fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas que comprenden una fusión de un fragmento o dominio soluble de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde todos los sitios de N-glicosilación están ocupados, y en donde como máximo el 45% de los N-glicanos del resto de receptor para FGF no tienen grupo sialilo, y en donde el N-glicano de la región Fc está fucosilado de 60 a 100%.

40 En una realización, el fragmento o dominio soluble del receptor para FGF es el dominio soluble o extracelular del receptor 1 para FGF (sFGFR1) o del receptor 2 para FGF (sFGFR2).

En otra realización, el fragmento o dominio soluble del receptor para FGF es el dominio soluble o extracelular del isotipo o variante IIIc del receptor 1 para FGF (sFGFR1(IIIc)) o del isotipo IIIc del receptor 2 para FGF (sFGFR2(IIIc)).

45 Según una realización preferida, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada está codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 1, o un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 80% con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización preferida, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 95%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 2.

50 La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención tiene actividad ADCC y/o CDC y es así útil para el tratamiento de enfermedades tales como cáncer.

La presente invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas.

55 La presente invención se refiere además a la combinación de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada con un agente quimioterapéutico o un agente bioterapéutico con propiedades anti-tumorales y/o anti-angiogénicas.

Otro objeto de la presente invención es un método para el tratamiento del cáncer, o un método para prevenir o reducir el crecimiento y volumen tumorales y los tumores metastáticos, que comprende administrar a un sujeto la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la presente invención en una cantidad terapéuticamente eficaz.

5 Breve Descripción de las Figuras

Las **Figuras 1A y B** muestran mapas de los vectores de expresión para SIAT6 (ST3GAL3) y B4GT1 (B4GALT1), respectivamente.

Las **Figuras 2 A y B** muestran las secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NO. 9) y aminoácido (SEQ ID NO. 10) de B4GT1 (B4GALT1) para la expresión a partir de pXL4551

10 Las **Figuras 3 A y B** muestran las secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NO. 11) y aminoácido (SEQ ID NO. 12) de SIAT6 (ST3GAL3) para la expresión a partir de pXL4544

15 La **Figura 4 A** corresponde a la secuencia de ácido nucleico de sFGFR2-Fc para la expresión a partir de pXL4410, pXL4429 o pXL4636 (SEQ ID NO. 1), la **Fig 4 B** a la secuencia de aminoácidos de sFGFR2-Fc (los sitios de N-glicosilación se indican en el tipo destacado) codificada por pXL4410, pXL4429 o pXL4636 (SEQ ID NO. 2), la **Fig 4C** a la secuencia de aminoácidos de sFGFR2 (SEQ ID NO. 4), la **Fig 4 D** a la secuencia de aminoácidos de Fc (SEQ ID NO. 6), la **Fig 4 E** a la secuencia de aminoácidos del ligador, y la **Fig 4F** a la secuencia de aminoácidos del péptido de señal (SEQ ID NO. 8). Es el péptido de señal descrito para la interleuquina-2. Se observó que la fusión de este péptido corriente arriba de la secuencia representada por SEQ ID NO. 2 lleva a una proteína secretada con una secuencia de aminoácidos N-terminal homogénea.

20 La **Figura 5** es una representación esquemática de la estrategia usada para construir pXL4636, codificando sFGFR2-Fc y Glutamina Sintetasa

Las **Figuras 6 A y B** muestran mapas de los vectores de expresión pXL4429 para sFGFR2-Fc y DHFR y pXL4417 que codifican el gen de resistencia a la neomicina.

25 La **Figura 7** es un gráfico que muestra la correlación entre el número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano y el aclaramiento de sFGFR2-Fc en sangre - Relación óptima > 1,2. Relación preferida > 0,9.

La **Figura 8** muestra SDS-PAGE (condiciones no reductoras) de 1 µg de sFGFR2-Fc incubado en ausencia (-) o en presencia (+) de PNGasa F. M: marcador de peso molecular

30 La **Figura 9** muestra la posición de N-glicano y la numeración en el dímero sFGFR2-Fc. La numeración comienza a partir de la secuencia de aminoácidos N-terminal de FGFR2 (FGFR2_HUMANO) de manera que la posición N1 corresponde a Asn83, N2 a Asn123, N3 a Asn228, N4 a Asn241, N5 a Asn 265, N6 a Asn 297, N7 a Asn318, N8 a Asn331. La posición N297 corresponde a la posición Asn en el Fc humano (IgG1).

La **Figura 10** es un gráfico que muestra las cinéticas de desaparición de proteína sFGFR2-Fc (cuadrados) en sangre en el tiempo hasta 72 horas.

35 La **Figura 11** muestra las cantidades de recuperaciones de proteína sFGFR2-Fc en plasma e hígado, expresadas en % de dosis inyectada.

La **Figura 12** es un gráfico del análisis del volumen del tumor A549 después del tratamiento hasta el día 40 (100 µg/ratón/administración: triángulos; 300 µg/ratón/administración: cuadrados; 500 µg/ratón/administración: círculos llenos; control con PBS: círculos huecos).

La **Figura 13** es un gráfico del análisis del peso del tumor A549 después del tratamiento en el día 40.

40 La **Figura 14** es un gráfico del análisis del volumen del tumor H460 después del tratamiento hasta el día 22 (grupo tratado: círculos llenos; grupo de control con PBS: círculos huecos).

La **Figura 15** es un gráfico del análisis del peso del tumor H460 después del tratamiento en el día 22.

La **Figura 16** es un gráfico de la evaluación de la actividad ADCC *in vitro* de sFGFR2-Fc en células tumorales H460 y A549.

45 La **Figura 17** muestra gráficos del análisis de volumen del tumor A549 cuando se implanta en tres cepas de ratón, es decir SCID (**Fig. 17A**), NOD/SCID (**Fig. 17B**) y SCID/bg (**Fig. 17C**), hasta el día 41 (sFGFR2-Fc 100 µg/ratón/administración: diamantes; control de PBS: círculos huecos).

50 La **Figura 18** muestra gráficos del análisis de volumen del tumor H460 cuando se implanta en tres cepas de ratón, es decir SCID (**Fig. 18A**), NOD/SCID (**Fig. 18B**) y SCID/bg (**Fig. 18C**), hasta el día 22 (sFGFR2-Fc 100 µg/ratón/administración: diamantes; control de PBS: círculos huecos).

La **Figura 19A** muestra un mapa del plásmido que codifica sFGFR2-Fc (A265 en Fc), y la **Fig. 19B** muestra la secuencia de proteína de sFGFR2-Fc (A265 en Fc) (SEQ ID NO. 14). La posición 392 es la posición de la mutación en el dominio Fc (Asp265Ala) y se representa en tipo marcado.

5 La **Figura 20** es un gráfico que muestra el análisis de volumen del tumor H460 cuando se implanta en cepas de ratón desnudo hasta el día 23 (círculos huecos: control de PBS; diamantes: sFGFR2-Fc 500 µg/ratón/administración; cuadrado hueco: sFGFR2-Fc (A265Fc) 500 µg/ratón/administración). **: p<0,01 frente a control Anova & Newman-Keuls después del ensayo).

Descripción Detallada

10 A lo largo de esta memoria descriptiva, los solicitantes hacen referencia a artículos de revistas, documentos de patente, referencias publicadas, páginas de Internet, información de secuencias disponible en bases de datos y otras fuentes de información. Un experto en la técnica puede usar todo el contenido de cualquiera de las fuentes de información citadas para crear y emplear aspectos de esta invención. Todas y cada una de las fuentes de información citadas se incorporan de forma específica, en su totalidad y por referencia, en este documento. Partes de estas fuentes pueden incluirse en este documento según se permita o se necesite. Sin embargo, el significado de cualquier término o frase específicamente definido o explicado en esta memoria descriptiva no debe ser modificado por el contenido de ninguna de las fuentes. La descripción y los ejemplos que siguen son meramente ilustrativos del alcance de esta invención y del contenido de esta memoria descriptiva. Un experto en la técnica puede diseñar y construir numerosas modificaciones de los ejemplos que figuran a continuación, sin salirse del alcance de esta invención.

20 La presente invención se refiere a fusiones de proteína soluble que comprende dominios de receptores para FGF. La invención abarca en general fragmentos, dominios, y especialmente dominios solubles o extracelulares, de receptor para FGF. El dominio extracelular del receptor para FGF está unido a un copartícipe apropiado en la fusión, tal como una unidad Fc de inmunoglobulina. Por tanto, en el sentido más amplio, las fusiones con receptor para FGF soluble modificadas, de la invención, pueden ser proteínas, fragmentos, dominios, dominios extracelulares, dominios solubles, y cualquiera de éstos, de receptor para FGF (FGFR), unidos a un copartícipe en la fusión, en especial un copartícipe de fusión consistente en una región Fc.

25 Este solicitante ha encontrado que una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada que comprende una fusión de un dominio soluble de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina en donde como mucho el 45% de los N-glicanos no tienen grupo sialilo, tiene propiedades ventajosas. Las ventajas del patrón de sialilación de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención, incluyen un mejor perfil farmacocinético y una resistencia mejorada a la escisión *in vivo*.

30 Típicamente los N-glicanos están unidos de forma co-translacional a través de residuos específicos de asparagina (Asn). La secuencia de consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto Pro) es esencial, aunque no suficiente, en que la estructura secundaria local puede determinar la adición (Jefferis et al., 2006, Nature Biotechnology 24:1241). Se cree que diversos factores explican los sitios de N-glicosilación no ocupados (Jones et al., 2005, Biochimica et Biophysica Acta 1726: 121). Varios sitios de N-glicosilación están presentes en los receptores para FGF soluble de la invención. Por ejemplo, hay 8 sitios de N-glicosilación en el dominio extracelular de FGFR2IIIc (véase Fig. 9). Los N-glicanos contienen un núcleo de oligosacárido conservado unido a Asn. Este núcleo está compuesto de tres residuos de monosacárido manosa (Man) y dos N-acetilglucosamina (GlcNAcs). Se unen normalmente GlcNacs adicionales a β 1,2-unidos a la α 6 Man o α 3 Man, mientras el ácido N-acetilneuramínico (NeuAc α 2,6), galactosa (Gal β 1,4), fucosa (Fuc α 1,6) y GlcNAc bisectriz (β 1,4) pueden estar presentes o ausentes (Jefferis et al., 2006, Nature Biotechnology 24:1241).

45 El solicitante ha demostrado que la presencia de un N-glicano en el 5° sitio de N-glicosilación a partir del N-terminal del resto FGFR confiere propiedades ventajosas para la productividad y baja agregación, como se muestra en los Ejemplos Experimentales. En particular, en ausencia de glicosilación en este sitio particular, la productividad cae dramáticamente, mientras que la agregación se aumenta. Además, la presencia de este N-glicano se encontró que era necesario para la unión de FGF.

50 La presente invención está dirigida así a una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada que comprende una fusión de un dominio soluble de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde al menos el 5° sitio de N-glicosilación del resto receptor para FGF está ocupado, y como máximo el 45% de los N-glicanos de dicho resto de receptor para FGF no tienen grupo sialilo.

55 Según una realización adicional de la invención, los sitios 3°, 4°, 6° y 7° de N-glicosilación del resto del receptor para FGF están ocupados. Cuando al menos 7 de los sitios de N-glicosilación del resto del receptor para FGF están glicosilados, la fusión de la invención tiene incluso mejores propiedades ya que tiene en cuenta la productividad y la baja agregación. Así, en otro aspecto, la invención está dirigida a una fusión de un fragmento o dominio soluble de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde al menos 7 sitios de N-glicosilación están ocupados y como máximo el 45% de los N-glicanos de la fusión Fc del receptor para FGF no tienen grupo sialilo. En una realización específica de la invención, todos los sitios de N-glicosilación están ocupados.

En otro aspecto, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención tiene un número promedio de ácido siálico por N-glicano del resto receptor para FGF que es al menos 0,9, es decir, este número puede ser 0,9 o cualquier valor por encima de 0,9. En una realización preferida, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención tiene un número promedio de ácido siálico por N-glicano de al menos 1,2. Dicha relación se encontró por el solicitante para asegurar una concentración maximizada en la sangre de la fusión con receptor para FGF soluble de la invención, que sería comparable a la concentración óptima en sangre encontrada para moléculas Fc.

La presente invención está dirigida además a una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada que comprende una fusión de un fragmento o dominio solubles de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde todos los sitios de N-glicosilación están ocupados, y en donde como máximo el 45% de los N-glicanos del resto de receptor para FGF no tiene grupo sialilo y en donde los N-glicanos de la región Fc no están fucosilados. En otra realización, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención está parcialmente fucosilada, por ejemplo, 0 a 60% fucosilada. En aún otra realización, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención está totalmente fucosilada. En una realización preferida, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención está de 60 a 100% fucosilada. En una realización preferida adicional, cada molécula de N-glicano de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la presente invención, comprende además 3 residuos de manosa y una media de 1,5 a 3,0 residuos de galactosa, de 3,5 a 5 de N-acetilglucosamina por molécula de glicano, y de 0,6 a 1 residuos de fucosa.

Según la invención, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada enlaza el ligando FGF con alta afinidad. Por ejemplo, dicha fusión enlaza el FGF2 con un valor K_D medido por Biacore™ comprendido entre 1 y 5 nM. En una realización preferida de la invención, el valor K_D de dicha fusión para FGF2 medido por Biacore™ es alrededor de 1,5 nM.

Dichas fusiones modificadas como se describen arriba son útiles como inhibidores potentes y terapéuticamente eficaces del crecimiento tumoral. Es más, el solicitante ha demostrado que las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas de la invención son capaces de inhibir el crecimiento tumoral in vivo. Además, dichas fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas de la invención son capaces de provocar respuestas ADCC y/o CDC tanto in vitro como in vivo. Como moléculas mediadoras de ADCC y/o CDC eficaces, estos compuestos son especialmente útiles para tratar tumores cancerosos que sobre-expresan FGF.

Las secuencias de FGFR empleadas para los compuestos de FGFR, longitud completa o fragmentos de un FGFR, secuencias de FGFR sintéticas, dominios extracelulares, dominios solubles o fusiones de éstos, pueden ser elegidas entre cualquier secuencia disponible o conocida. El FGFR pertenece a la familia de receptores de tirosina quinasa, y a la familia del supergen de las inmunoglobulinas (Ig). En las formas transmembrana del receptor, el dominio de tirosina quinasa es intracelular y los dominios semejantes a Ig son extracelulares. Tanto la forma transmembrana como la forma secretada se unen a FGF. Hay al menos cuatro genes que codifican los FGFRs que tienen una estructura común de dos o tres bucles similares a inmunoglobulina (Ig) extracelulares (Igl-IgIII) y un dominio de tirosina-quinasa intracelular. También se conocen productos de escisión alternativa, procedentes de exones que codifican la región extracelular, y que dan lugar a múltiples formas de receptor. El tercer bucle semejante a Ig lleva al menos a tres variantes de receptor y se producen dos formas transmembrana por escisión alternativa de dos exones (IIIb y IIIc) que codifican la segunda mitad del bucle III. Por ejemplo, se usa un sitio de poliadenilación selectiva que precede a los exones IIIb y IIIc para producir una forma soluble de FGFR1 (IIIa). En seres humanos y en ratones, la variante de escisión IgIIIa de FGFR1 codifica una proteína que aparentemente carece de dominio transmembrana hidrófobo y que, por tanto, puede ser una forma secretada o soluble del receptor. Los compuestos de FGFR pueden utilizar también secuencias de FGFR1 (locus de proteína en NCBI, NP_075598); de FGFR2 (locus de proteína en NCBI, NP_000132); de FGFR3 (locus de proteína en NCBI, P22607); y FGFR4 (locus de proteína en NCBI, NP_002002) (Kiefer et al., 1991, Growth Factors 5:115-127).

También se han tratado formas solubles de receptores para FGF, que comprenden los dominios extracelulares, en las Pat. de EE.UU. Núms. 5.288.855; 6.656.728; WO 91/00916; WO 92/00999; WO 00/46380; WO 2005/016966; WO 2005/113295; WO 2006/113277; WO 2007/014123; y Patente Europea 529 076. Los fragmentos, dominios, o dominios solubles o extracelulares de FGFR, tal como se usan en la invención, pueden incluir el fragmento de un FGFR que sea extracelular en su forma nativa o que consista en toda o parte de la forma naturalmente secretada. Además, las secuencias de FGFR usadas en esta invención pueden ser las específicamente descritas o enumeradas, y secuencias que tengan una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% a lo largo de toda la secuencia polipeptídica descrita o dibujada, o que tengan una identidad de secuencia de ácido nucleico de aproximadamente 95%, 90%, 85%, 80% o 75% a lo largo de la región que codifica el polipéptido para ácidos nucleicos que codifiquen las secuencias de FGFR de la invención. El fragmento o dominio podría incluir también aminoácidos adicionales u otras regiones del FGFR siempre que estos aminoácidos o regiones adicionales no eviten o reduzcan de manera significativa la capacidad del compuesto de FGFR para ser empleado tal como se describe en esta invención. Un polipéptido o proteína de fusión que consista esencialmente en un dominio o fragmento de FGFR puede contener otros aminoácidos siempre que se conserve la capacidad de expresarse en una célula de mamífero y la de unirse a FGF, y además, opcionalmente, siempre que se conserve la capacidad de reducir el crecimiento celular o de reducir la vascularización.

En una realización, el fragmento o dominio soluble del receptor para FGF es el dominio soluble o extracelular del receptor 1 para FGF (sFGFR1) o del receptor 2 para FGF (sFGFR2).

Los fragmentos de FGFR1 y de FGFR2 seleccionados pueden tener una o más de las siguientes mutaciones: una delección N-terminal; de 1-7 aminoácidos; o sustitución en el extremo N; una delección de la secuencia del bucle 1; una delección de la secuencia de la caja ácida. Los polinucleótidos que codifican mutantes de secuencia de aminoácidos pueden prepararse por una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen, aunque no están limitados a, mutagénesis mediada (o dirigida al sitio) por oligonucleótidos, mutagénesis por PRC y mutagénesis en módulo de una versión mutante o no mutante preparada anteriormente de la molécula de interés (véase, por ejemplo, Kunkel, 1985, Proc Natl Acad Sci USA 82:488).

En otra realización, el fragmento o dominio soluble del receptor para FGF es el dominio soluble o extracelular del isotipo IIIc del receptor 1 para FGF (sFGFR1(IIIc)) y del isotipo IIIc del receptor 2 para FGF (sFGFR2(IIIc)).

Las realizaciones preferidas incluyen el fragmento o dominio soluble del isotipo o variante IIIc del receptor 2 para FGF codificado por un polinucleótido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 3, y/o que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o bien una secuencia con una identidad de al menos 95%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID NO: 4.

De acuerdo con esta última realización, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada (sFGFR2-Fc) de la presente invención tiene ventajosamente una alta afinidad hacia su ligando natural FGF2 o un elevado valor de K_D en el orden nanomolar, comprendido entre 1 y 5 nM, y más exactamente en torno a 1,5 nM.

Los ejemplos específicos de dominios de inmunoglobulina incluyen, aunque no están limitados a, la región Fc de una molécula de inmunoglobulina; la región bisagra de una molécula de inmunoglobulina; la región CH₁ de una molécula de inmunoglobulina; la región CH₂ de una molécula de inmunoglobulina; la región CH₃ de una molécula de inmunoglobulina; la región CH₄ de una molécula de inmunoglobulina; y la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina y variantes humanizadas de cualquiera de éstas. Las secuencias para estas regiones están disponibles también para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Huck et al., 1986, Nucleic Acids Res. 14:1779).

Tal como se emplea en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "región Fc de inmunoglobulina o Fc" significa la parte carboxilo terminal de una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina. Las regiones Fc son particularmente importantes para determinar las funciones biológicas de la inmunoglobulina, y estas funciones biológicas se denominan funciones de inductor. Como se sabe en la técnica, las cadenas pesadas de las subclases de inmunoglobulina comprenden cuatro o cinco dominios: IgM y la IgE tienen cinco dominios de cadena pesada, e IgA, IgD e IgG tienen cuatro dominios de cadena pesada. La región Fc de IgA, IgD e IgG es un dímero de los dominios bisagra-CH₂--CH₃, y en IgM e IgE es un dímero de los dominios bisagra-CH₂--CH₃--CH₄. Además, el dominio CH₃ de IgM y IgE es estructuralmente equivalente al dominio CH₂ de IgG, y el dominio CH₄ de IgM y IgE es el homólogo del dominio CH₃ de IgG (véase, W. E. Paul, ed., 1993, Fundamental Immunology, Raven Press, Nueva York, Nueva York). Cualquiera de las regiones Fc conocidas sería útil como la región Fc en las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas de la invención.

En una realización, el gen que codifica la región Fc de la IgG humana (Fcy) se obtiene por transcripción inversa y PCR usando ARN preparado a partir de leucocitos humanos y cebadores 5' y 3' apropiados. Los fragmentos de ADN resultantes contienen secuencias completas de los dominios bisagra, CH₂ y CH₃ de IgG, y se pueden usar como plantilla para generar variantes en las que están sustituidos ciertos aminoácidos, como se conoce en la técnica. Se puede incorporar en el proceso PCR un cebador que codifica un enlazador peptídico, que incluye un sitio para enzima de restricción adicional. Los fragmentos de ADN resultantes se insertan en un vector soporte, y se confirman por secuenciación de ADN.

Se usa preferiblemente la región Fc de la inmunoglobulina gamma-1, que incluye al menos parte de la región bisagra, la región CH₁, la región CH₂ y la región CH₃. Además, la región Fc de la inmunoglobulina gamma-1 puede ser una Fc que ha sufrido delección en CH₁ o una Fc que ha sufrido delección en CH₂, e incluye una parte de una región bisagra y una región CH₃ en donde ha sufrido delección la región CH₁ y/o CH₂. Se ha descrito una Fc con delección de CH₂ por Gillies et al. (1990, Hum. Antibod. Hybridomas, 1:47).

Lo más preferiblemente, la región Fc de IgG1 comprende la secuencia codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5, y/o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 o bien una secuencia con una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO: 6. No obstante, también serían útiles regiones Fc de las otras clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE e IgM como la región Fc.

Se puede preparar, además, construcciones por delección de estas regiones Fc, en las que han sufrido delección uno o más de los dominios constantes. Un experto ordinario en la técnica podría preparar tales construcciones por delección empleando técnicas de biología molecular bien conocidas. Además, la región Fc empleada puede ser una que tenga una identidad de aminoácidos de aproximadamente 99%, o aproximadamente 98%, o aproximadamente 95%, o aproximadamente 90%, o aproximadamente 85%, o aproximadamente 80%, o aproximadamente 75% respecto a la mostrada en SEQ ID NO:6.

Son mutaciones específicas en comparación a SEQ ID NO: 6 que pueden seleccionarse y usarse individualmente o en cualquier combinación: una delección o sustitución de una de las Cys dentro de los 20 primeros aminoácidos desde el extremo N; una delección de Cys en la posición 5 de la SEQ ID NO: 6; o una sustitución de Cys en la posición 5. La secuencia de región Fc elegida puede incrementar de manera detectable la vida media de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada en el suero.

La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención puede comprender una región bisagra o espaciadora que puede usarse entre la parte de receptor soluble y la región Fc (Ashkenazi et al., 1997, *Current Opinion in Immunology*, 9:195-200). Los ejemplos incluyen un enlazador peptídico flexible con una longitud de aproximadamente 20 aminoácidos o menos. Más preferiblemente, el enlazador peptídico puede tener una longitud de al menos tres aminoácidos, y/o un enlazador peptídico que comprenda dos o más de los siguientes aminoácidos: glicina, serina, alanina y treonina. En una realización preferida, el enlazador peptídico no incluye un sitio de escisión por proteasa. El enlazador más preferido es SAL (Ser-Ala-Leu).

La presente invención proporciona además la construcción de polinucleótidos que codifican la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la presente invención, así como un vector que es capaz de expresar la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada cuando se introduce en una célula huésped apropiada. Según la realización preferida, el polinucleótido que codifica la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que comparte al menos 80% de la identidad con la SEQ ID NO: 1. Tal como se usa en este documento, se entiende que el término "vector" significa cualquier ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de interés y es capaz de incorporarse a una célula huésped y expresar opcionalmente una proteína o polipéptido codificados. Los vectores incluyen ácidos nucleicos lineales, plásmidos, fagémidos, cósmidos y similares, todos ellos dentro de los conocimientos de una persona experta en la técnica. Los polinucleótidos que codifican el FGFR o el compuesto de fusión de la invención, así como vectores que contienen estos ácidos nucleicos y células huésped en donde se han introducido estos vectores, también se incorporan específicamente en el alcance de la invención.

Lo más preferiblemente, las moléculas de fusión de la invención están codificadas por ADN que comprende un dominio extracelular de un FGFR fusionado en el extremo C a la región Fc γ 1 del gen γ 1 de la inmunoglobulina humana. La región Fc γ 1 del gen γ 1 de la inmunoglobulina incluye al menos una parte del dominio bisagra y del dominio CH₃, o al menos una parte del dominio bisagra, del dominio CH₂ y del dominio CH₃. El ADN que codifica las moléculas químicas de polipéptido según la presente invención puede estar en su configuración genómica o en su configuración de cADN. Se pueden usar péptidos señal para iniciar de manera eficaz el transporte de una proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico. Las secuencias señal han sido bien caracterizadas en la técnica, y se sabe que contienen típicamente de 16 a 30 residuos de aminoácido, aunque son posibles otros tamaños. Una discusión detallada de las secuencias del péptido señal se proporciona por von Heijne (1986, *Nucleic Acids Res.*, 14:4683). Según una realización preferida, el péptido señal se toma del péptido señal de interleuquina-2 (SEQ ID NO. 8) como se conoce en la técnica. El solicitante ha observado que fusionando este péptido a un dominio extracelular de un FGFR lleva a una proteína secretada con una secuencia de aminoácidos N-terminal homogénea, que no es el caso cuando se usa el péptido señal FGFR endógeno.

Un vector de expresión que contiene las secuencias de codificación de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención colocadas bajo el control de secuencias regulatorias transcripcionales y traduccionales apropiadas puede construirse mediante tecnología de ADN recombinante como se conoce en la técnica. Dicho vector de expresión se introduce en una célula huésped mediante cualquier técnica conocida por el experto en la técnica. La célula que contiene un vector resultante se hace crecer entonces para producir una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada o un fragmento de la misma, usando cualquier técnica conocida por el experto en la técnica.

Según la invención, puede usarse una variedad de sistemas de expresión para expresar las moléculas de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificadas. En un aspecto, dichos sistemas de expresión representan vehículos por medio de los que las secuencias de codificación de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, aunque también representan células que, cuando se transfectan de forma transitoria con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, expresan una molécula de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención in situ. Las células de mamíferos se usan normalmente para la expresión de una molécula de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada recombinante, especialmente para la expresión de la molécula de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada recombinante entera. Por ejemplo, las células de mamíferos tal como células HEK293 o CHO, en conjunto con un vector, que contienen la señal de expresión tal como una que lleva el principal elemento promotor génico intermedio temprano de citomegalovirus humano, son un sistema eficaz para expresar las fusiones Fc con receptor para FGF solubles modificadas de la invención (Foecking et al., 1986, *Gene* 45:101; Cockett et al., 1990, *Bio/Technology* 8:2).

Además, se elige una célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o que modifica y procesa el producto génico de la forma específica deseada. Estas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y el procesamiento de productos de proteínas pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento post-traduccionales y la modificación de proteínas y productos génicos. Se eligen líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la correcta

- modificación y procesado de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada expresada de interés. Por lo tanto, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesado apropiado del transcrito primario, glicosilación del producto génico. Estas células huésped de mamífero incluyen, pero no están limitadas a, células CHO, COS, HEK293, 3T3 o células de mieloma. La célula huésped puede co-transfectarse con dos o más vectores de expresión, que incluyen el vector que expresa la proteína de la invención. Por ejemplo, una célula huésped puede transfectarse con un primer vector que codifica un polipéptido de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificado, como se describe arriba, y un segundo vector que codifica un polipéptido de glicosiltransferasa. De forma alternativa, el segundo vector podría expresar un pequeño ARN de interferencia contra una glicosiltransferasa.
- Para la producción de alto rendimiento, a largo plazo, de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. En una realización de la invención, pueden construirse las líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada. Más que usando vectores de expresión que contiene orígenes virales de replicación, las células huésped se transforman con ADN bajo el control de los elementos regulatorios de expresión apropiados, que incluyen promotores, mejoradores, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, y otras secuencias apropiadas conocidas por el experto en la técnica, y un marcador genético. Después de la introducción del ADN extraño, puede permitirse el crecimiento de las células modificadas por ingeniería durante uno o dos días en un medio enriquecido, y después se pasan a un medio de selección. El marcador genético en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de manera estable el plásmido en un cromosoma y expandirse en una línea celular.
- Puede usarse un número de sistemas de selección según la invención, que incluyen aunque no están limitados al virus simple de Herpes timidina quinasa (Wigler et al., 1977, Cell 11:223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 48:202), selección de glutamato sintasa en presencia de sulfoximida de metionina (Adv Drug Del Rev, 2006, 58: 671, y sitio web o literatura de Lonza Group Ltd.) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) con genes en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, puede usarse la resistencia antimetabolito como base de la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980, Proc Natl Acad Sci USA 77:357); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan et al., 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido, G-418 (Wu et al., 1991, Biotherapy 3:87); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30:147). Métodos conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante pueden aplicarse de forma rutinaria para seleccionar el clon recombinante deseado, y estos métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1993); Los niveles de expresión de una molécula de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada puede aumentarse por amplificación vectorial. Cuando un marcador presente en el sistema de vector que expresa una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada es amplificable, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo aumentará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada se asocia con el gen que codifica la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención, la producción de dicha fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada aumentará también (Crouse et al., 1983, Mol Cell Biol 3:257).
- Se conocen un número de factores por el experto en la técnica para influir el nivel de glicosilación de una glicoproteína. Por ejemplo, las células huésped de mamífero modificadas pueden usarse para alterar el perfil de glicosilación de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada aumentando o disminuyendo la expresión de glicosiltransferasa. Dichas células huésped de mamífero modificadas incluyen, aunque no están limitadas a, CHO, COS, HEK293, PER.C6, 3T3, YB2/0 y células mieloma (Stanley et al., 1986, Archives of Biochemistry and Biophysics, 249:533; Mori et al., 2006, Biotechnology and Bioengineering 94:68; Chitlaru et al., 1998, Biochem. J. 336:647; Umana et al., 1999 Nature Biotechnology 17:176). También se conoce por el experto en la técnica que los factores del bioproceso afectan a la biosíntesis del oligosacárido de glicoproteína (Goochee et al., 1994, Curr Opin Biotechnol. 5:546). El efecto de las condiciones del cultivo celular, tal como concentración de glucosa o iones amonio, pH, suero, y los efectos de otros factores del bioproceso, tal como la velocidad de crecimiento celular, tiempo de cultivo, influencia de la glicosilación unida a N (Biotechnol. Bioeng. 39:327 (1993); Biotechnol. Bioeng. 68:370 (2000); Bio/technology 11:720 (1993); Cytotechnology 17:13 (1995); Biochem J. 272:333 (1990)). Se conoce también que además de las células huésped y los factores del bioproceso, el procesado de oligosacáridos está influido por el medioambiente local en cada sitio de N-glicosilación pendiente del medioambiente de la glicoproteína local. Las diferencias sitio a sitio pueden ser extensivas como se observó con t-PA o pueden implicar más diferencias sutiles en la ramificación y el procesado terminal como se observa para los tres sitios de N-glicosilación de EPO (Goochee et al, 1991, Bio/Technology 9: 1347).
- Una vez que se ha producido, una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad de Proteína A por Fc después, etcétera), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas.
- La identificación cuantitativa de ácido siálico (residuos de ácido N-acetilneuramínico), el análisis de la composición de carbohidratos y el mapeo cuantitativo de oligosacáridos de N-glicanos en las proteínas de fusión Fc con receptor

para FGF soluble modificadas purificadas puede realizarse esencialmente como se describe anteriormente (Saddic et al. *Methods Mol. Biol.* 194:23-36 (2002) y Anumula et al. *Glycobiology* 8:685-694 (1998)).

Las proteínas de fusión que incorporan dominios de receptor para FGF solubles pueden producirse mediante métodos familiares para los expertos en la técnica, para cualquier otra fusión de mamífero, expresable o biológicamente activa, *mutatis mutandis*. Por ejemplo, se pueden adoptar métodos publicados para combinar las regiones Fc de IgG con los dominios de citoquinas y receptores solubles, a fin de diseñar y producir los compuestos de FGFR de la invención (véase, por ejemplo, Capon et al., *Nature*, 337:525-531 (1989); Chamow et al., *Trends Biotechnol.*, 14:52-60 (1996); documentos de EE.UU. 5.116.964, 5.349.053 y 5.541.087). Otros ejemplos de proteínas de fusión receptor-Ig que se pueden adoptar incluyen las de los documentos US 5.726.044; 5.707.632; y 5.750.375. Dado que los dominios extracelulares de receptor para FGF comparten un grado significativo de homología con la familia génica de las inmunoglobulinas, y que el dominio extracelular de FGFR contiene segmentos similares a Ig, se prefiere especialmente el empleo de regiones Fc. En un ejemplo, la fusión es una proteína homodimérica unida a través de residuos de cisteína en la región bisagra de Fc de IgG, dando como resultado una molécula con características similares a las de una molécula de IgG. Una ventaja para usar una región Fc es la vida media circulante extendida. Además, las modificaciones de glicosilación de las proteínas de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificadas de la invención llevan a propiedades farmacocinéticas mejoradas, ya que las fusiones de la invención muestran *in vivo* perfiles farmacocinéticos comparables al IgG humano de un isotipo similar.

Una realización adicional de la presente invención proporciona un método para preparar una proteína de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada que comprende un fragmento o dominio de FGFR, un enlazador peptídico flexible, y una variante de Fc de IgG humana, cuyo método comprende: (a) generar una línea celular derivada de CHO; (b) cultivar la línea celular en condiciones tales que se exprese la proteína de fusión recombinante; y (c) purificar la proteína expresada a partir de la etapa (b). Preferiblemente, en este caso, el enlazador de péptido flexible que comprende al menos aproximadamente 3 aminoácidos entre el receptor para FGF soluble y la variante Fc de IgG humana, comprende dos o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en glicina, serina, alanina y treonina. En realizaciones adicionales y relacionadas, no está presente el péptido enlazador, o tiene una longitud de un sólo aminoácido. En una realización preferida, el enlazador peptídico no incluye un sitio de escisión por proteasa. El enlazador más preferido es SAL (Ser-Ala-Leu).

Preferiblemente, la proteína de fusión con receptor para FGF soluble modificada se produce en células CHO en un modo de suspensión, tal como se describe en los Ejemplos de este documento.

Como se muestra en los Ejemplos en este documento, las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas de la presente invención tienen actividad anti-tumoral, al menos a través de inducción de respuestas ADCC y/o CDC, y son así útiles en el tratamiento de tumores metastáticos y enfermedades tal como cáncer. Un aspecto de la invención se dirige así a una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada como se describe arriba con actividades ADCC y/o CDC.

De especial interés son las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas con capacidad mejorada para mediar funciones inductoras de citotoxicidad celular tal como ADCC. Dichas proteínas se pueden obtener haciendo sustituciones sencillas o múltiples en la región Fc de la molécula, alterando de ese modo su interacción con los receptores Fc. Los métodos para designar tales mutantes se pueden encontrar por ejemplo en Lazar et al. (2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 103(11): 4005-4010) y Okazaki et al. (2004, *J. Mol. Biol.* 336(5):1239-49). Véase también los documentos WO 03/074679, WO 2004/029207, WO 2004/099249, WO2006/047350, WO 2006/019447, WO 2006/105338, WO 2007/041635. También es posible usar líneas celulares fabricadas específicamente para la producción de fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas mejoradas. En particular, estas líneas han alterado la regulación de la ruta de glicosilación, dando como resultado fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificada que están débilmente fucosiladas o incluso totalmente defucosiladas. Dichas líneas celulares y métodos para su diseño se describen, por ejemplo, en Shinkawa et al. (2003, *J. Biol. Chem.* 278(5): 3466-3473), Ferrara et al. (2006, *J. Biol. Chem.* 281(8): 5032-5036; 2006, *Biotechnol. Bioeng.* 93(5): 851-61), documentos EP 1331266, EP 1498490, EP 1498491, EP 1676910, EP 1792987 y WO 99/54342.

Dichas fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas como se describen arriba para usar en la inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto, y para el tratamiento o prevención de metástasis en un sujeto, son un aspecto de la invención. La invención así se refiere también a la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada como se describe arriba como un medicamento. La presente invención también se refiere al uso de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada como se describe arriba para la preparación de un medicamento para tratar o inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto. Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden típicamente la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se emplea en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, agentes tamponadores, soluciones salinas, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Se puede elegir el tipo de vehículo en base a la ruta de administración deseada. En diversas realizaciones, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, transdérmica u oral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables

incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para preparar extemporáneamente disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En la técnica es bien conocido el uso de medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Tal como se detalla más adelante, también pueden incorporarse compuestos activos adicionales en las composiciones, tales como agentes anticancerosos y/o antiangiogénicos; en particular, el compuesto activo adicional puede ser un agente antiangiogénico, un agente quimioterapéutico o un agente de bajo peso molecular. Se puede preparar una composición farmacéutica típica para infusión intravenosa que contenga 250 ml de disolución de Ringer estéril y 100 mg de la combinación. Los métodos concretos para preparar compuestos administrables por vía parenteral se conocerán o serán evidentes para los expertos en la técnica, y se describen más detalladamente, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science, 17ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985), y en las ediciones 18ª y 19ª del mismo, que se incorporan en este documento por referencia.

También se puede preparar la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, con vehículos y formulaciones de liberación controlada, entre ellos implantes y sistemas de reparto microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilenvinil-acetato, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, poli(ácido láctico), y copolímeros polilácticos y poliglicólicos (PLG). Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones se conocen generalmente por los expertos en la técnica.

La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada en la composición se formula preferiblemente en una cantidad eficaz. Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y para periodos de tiempo necesario, para alcanzar el resultado deseado, tal como la modulación de actividades de FGF y/o de FGFR y la inducción de respuestas ADCC y/o CDC. La expresión "una cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para influir en el curso terapéutico de una enfermedad particular. También es una cantidad terapéuticamente eficaz aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del agente se ve contrarrestado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Para las aplicaciones terapéuticas, se administran fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas de la invención a un mamífero, preferiblemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable tal como las tratadas arriba, incluyendo las que pueden administrarse a un ser humano por vía intravenosa como un bolo o por infusión continua a lo largo de un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasínovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas se administran también, convenientemente, por vía intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para producir efectos terapéuticos tanto locales como sistémicos. Se espera que la vía intraperitoneal sea particularmente útil, por ejemplo, en el tratamiento de tumores de ovario.

Pueden ajustarse las posologías para proporcionar la respuesta óptima. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o puede disminuirse o aumentarse la dosis de forma proporcional. Se pueden administrar las composiciones de la invención a un sujeto para provocar actividad de crecimiento celular en un sujeto. Se pretende que el término "sujeto", tal como se emplea en este documento, incluya organismos vivos en los cuales exista un crecimiento celular dependiente de FGF, e incluye específicamente mamíferos, tales como conejos, perros, gatos, ratones, ratas, monos, especies transgénicas de los mismos y seres humanos.

Las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas y las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles en el tratamiento o prevención de una variedad de cánceres, que incluyen (aunque no están limitados a) los siguientes: carcinoma, que incluyen los de vejiga, mama, colon, cabeza y cuello, riñón, que incluye carcinoma de células renales, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroides y piel; que incluye carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de trazado linfático, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de trazado mielóide, incluidos leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, que incluyen melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xeroderma pigmentoso, keratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma, y otros cánceres aún por determinar que están provocados por sobre-expresión de FGF. En una realización preferida, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de la invención se usa para tratar melanoma, leucemia, cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama o cáncer de cabeza o cuello.

La presente invención se refiere así al uso de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada descrita arriba, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o inhibición de enfermedades relacionadas con cáncer en un sujeto. Es un aspecto u objeto de la presente invención el proporcionar un método para tratar enfermedades y procesos que resultan de la proliferación celular cancerígena, y una composición para tratar o reprimir el crecimiento de un cáncer. Aún otro aspecto de la invención es proporcionar composiciones y métodos útiles para la terapia génica para la modulación del cáncer. El método de la presente invención puede usarse en particular para el tratamiento de melanoma, leucemia, cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama o cáncer de cabeza o cuello.

Se puede mejorar la eficacia de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, en la prevención o tratamiento de la enfermedad, administrando dicha fusión en serie o en combinación con otro agente que sea eficaz para esos propósitos, tal como factor de necrosis tumoral (TNF), un antagonista capaz de inhibir o neutralizar la actividad angiogénica del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) ácido o básico, del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un antagonista capaz de inhibir o neutralizar las actividades coagulantes del factor tisular, de la proteína C o de la proteína S (véase el documento WO 91/01753), un antagonista tal como un anticuerpo capaz de fijarse al receptor HER2 (véase el documento US 5.772.997), o uno o más agentes terapéuticos convencionales tales como, por ejemplo, agentes alquilantes, antagonistas del ácido fólico, anti-metabolitos del metabolismo del ácido nucleico, antibióticos, análogos de pirimidina, 5-fluorouracilo, cisplatino, nucleósidos de purina, aminas, aminoácidos, nucleósidos de triazol o corticosteroides.

En otro aspecto de la invención, la administración se combina con una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico, tal como por ejemplo taxol (paclitaxel) o taxotere (docetaxel).

Los agentes quimioterapéuticos incluyen, sin limitación ninguna, agentes antimicrotúbulos tales como diterpenoides y alcaloides de la vinca; complejos de coordinación con platino; agentes alquilantes tales como mostazas nitrogenadas, oxazafosforinas, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos; agentes antibióticos tales como antraciclinas, actinomicinas y bleomicinas; inhibidores de la topoisomerasa II tales como epipodofilotoxinas; antimetabolitos tales como análogos de purina y pirimidina y compuestos antifolato; inhibidores de la topoisomerasa I tales como camptotecinas; hormonas y análogos hormonales; inhibidores de la ruta de transducción de señal; inhibidores de angiogénesis de tipo distinto al de receptor de tirosina-quinasa; agentes inmunoterapéuticos; agentes proapoptóticos; e inhibidores de la señalización del ciclo celular. Además, pueden combinarse los métodos de la invención con otro tratamiento anticanceroso, agente antiangiogénico, o agente quimioterapéutico o terapia de radiación. Un ejemplo preferido es docetaxel o taxotere. Otros ejemplos incluyen gemcitabina, diterpenoides de cisplatino y alcaloides de la vinca, paclitaxel, vinblastina, vincristina y vinorelbina, carboplatino, ciclofosfamida, melfalano y clorambucilo, busulfano, carmustina, dacarbazina, ciclofosfamida, melfalano, clorambucilo, busulfano, carmustina, dacarbazina, agentes antineoplásicos que incluyen, aunque no están limitados a, actinomicinas tales como dactinomicina, antroclinas tales como daunorubicina y doxorubicina, bleomicinas, epipodofilotoxinas, etopósido y tenipósido; agentes neoplásicos antimetabolitos, 5-fluorouracilo, metotrexato, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, camptotecinas, irinotecano HCl, y topotecano HCl.

También pueden seleccionarse una variedad de diferentes agentes quimioterapéuticos o polipéptidos anticancerosos. Fuentes de información tales como www.clinicaltrials.gov, www.ncbi.nlm.nih y www.drugs.com, incluyen referencias a polipéptidos y agentes que pueden seleccionarse.

Dichos otros agentes, por ejemplo, agentes anti-angiogénicos o agentes quimioterapéuticos, pueden estar presentes en la composición que se administra o pueden administrarse separadamente. En un aspecto de la invención, la administración se lleva a cabo con el otro principio activo, sea de manera simultánea, separada o secuencial en el tiempo. Cuando la administración se lleva a cabo de manera simultánea, los dos principios activos pueden estar combinados en una única composición farmacéutica que comprende las dos composiciones, tal como un comprimido o una cápsula de gel. Por otro lado, los dos principios activos pueden estar presentes, se administren o no de manera simultánea, en composiciones farmacéuticas separadas. Para ello, la combinación puede estar en forma de un equipo que comprenda, por un lado la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada tal como se ha descrito antes, y por otro lado el segundo principio activo, estando en compartimientos separados la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada tal como se ha descrito antes y el segundo principio activo, y estando destinados a ser administrados de manera simultánea, separada, o secuencial en el tiempo.

La combinación según la presente invención puede administrarse especialmente para terapia tumoral en combinación con quimioterapia, terapia de proteína (es decir, usando un agente terapéutico tal como un anticuerpo o proteína recombinante), terapia génica, radioterapia, inmunoterapia, intervención quirúrgica o una combinación de éstas. Es igualmente posible una terapia a largo plazo en forma de terapia complementaria en el contexto de otras estrategias de tratamiento, como se ha descrito arriba.

Los ejemplos que siguen son meramente ilustrativos del alcance de esta invención y del contenido de esta memoria descriptiva. Un experto en la técnica puede diseñar y construir numerosas modificaciones de los ejemplos enumerados a continuación, sin salirse del alcance de esta invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción en HEK293 de sFGFR2-Fc con un alto contenido en ácido siálico y bajo aclaramiento sanguíneo.

Los cADNs que codifican la α -1,4-galactosiltransferasa humana (B4GT1) (SEQ ID NO. 9) o la β -2,3-sialiltransferasa humana (SIAT6) (SEQ ID NO. 11) se recuperaron de la colección de clones (Invitrogen) y se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pXL4214 a partir del cual la expresión se conduce desde el promotor CMV. El mismo

vector de expresión se usó también para clonar la fusión de proteína sFGFR2-Fc y generar pXL4410. El mapa de plásmidos pXL4551 que codifica B4GT1, pXL4544 que codifica SIAT6 y pXL4410 que codifica la fusión FGFR2IIIc-Fc soluble modificada (designada en este documento como sFGFR2-Fc), se presentan en la Fig. 1 y 5 además del ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de B4GT1 (Fig. 2), SIAT6 (Fig. 3) y sFGFR2-Fc (Fig.4A y B). La sFGFR2-Fc se produjo en células HEK293 EBNA adherentes (Invitrogen) mediante transfección transitoria de uno a tres plásmidos de expresión que codifican sFGFR2-Fc, B4GT1 o SIAT6 complejados con JET PEI (Q-Biogen). La relación de plásmidos fue 90/5/5 para pXL4410/pX14544/pXL4551. La relación de plásmidos tuvo que optimizarse para asegurar la productividad y calidad óptima del polipéptido sFGFR2-Fc. Las proteínas secretadas se recogieron ocho días después de la transfección y se centrifugaron. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad en Proteína G Sefarosa (Amersham Biosciences) después de la elución desde la columna con glicina 100 mM/HCl pH 2,7. Las proteínas sFGFR2-Fc se formularon en PBS y se filtraron 0,22 µm. La concentración de proteína se determinó mediante el Ensayo microBC (Interchim).

La identificación cuantitativa de ácido siálico, el análisis de composición de carbohidratos y el mapeo cuantitativo de oligosacáridos de N-glicanos en las proteínas purificadas de sFGFR2-Fc se llevaron a cabo esencialmente como se describe anteriormente (Saddic et al. 2002. *Methods Mol. Biol.* 194:23-36 y Anumula et al. 1998. *Glycobiology* 8:685-694). Primero, los residuos de ácido siálico se liberaron después de hidrólisis suave de GFR2-Fc y se marcaron de forma fluorescente con orto-fenilendiamina y se separaron por HPLC en fase inversa. Se detectaron picos individuales mediante detección por fluorescencia (excitación, 230 nm; emisión, 425 nm), se identificaron y cuantificaron por comparación con patrones de ácido N-acetilneuramínico y N-glicolilneuramínico. Segundo, la composición de carbohidratos se determinó después de hidrólisis ácida de muestras de sFGFR2-Fc para liberar los monosacáridos individuales. Después de la hidrólisis, los monosacáridos (neutros y aminoazúcares) se derivaron con ácido antranílico y después se separaron por HPLC en fase inversa y se detectaron por detección por fluorescencia (excitación, 360 nm; emisión, 425 nm). Se identificaron y cuantificaron los picos individuales por comparación con patrones de monosacárido. Tercero, los oligosacáridos se liberaron de forma enzimática con PNGasa F y se marcaron de forma fluorescente con ácido antranílico antes de la separación según su número de residuos de ácido siálico por HPLC de intercambio aniónico en fase normal en una columna Asahipak-NH2P (Phenomenex). Los glicanos marcados se detectaron y cuantificaron por detección por fluorescencia (excitación, 360 nm; emisión, 425 nm). El número promedio de ácido siálico por N-glicano en el dominio FGFR2 se calculó en base a la cantidad total de moles de N-glicano por mol de FGFR2-Fc y los moles de N-glicano por mol de Fc obtenido después de la liberación del Fc mediante papaina.

Las proteínas sFGFR2-Fc purificadas se inyectaron en la cola de ratones Desnudos Suizos (Charles River). Se usaron un total de tres ratones por carga de proteína. La sangre se recogió 6 horas después de la inyección de 500 µg de sFGFR2-Fc, se obtuvo el plasma y la concentración de FGFR2-Fc se determinó por ELISA utilizando el método sándwich con un anticuerpo monoclonal FGFR2 anti-humano (sistema R&D) y un anticuerpo policlonal conjugado IgG-HRP anti-humano (Pierce) (2 análisis a 2 diluciones por triplicado). En los experimentos de control, los ratones se pretrataron con fetuina y asiolofetuina una hora antes de la inyección de sFGFR2-Fc.

La Tabla 1 resume la condición de producción de las diferentes cargas de sFGFR2-Fc, el perfil de N-glicano y la composición de monosacáridos de cada carga y la concentración en plasma de sFGFR2-Fc 6 horas después de la inyección intravenosa en los ratones.

Tabla 1- Contenido en N-glicano y farmacocinética de FGFR2-Fc producido en HEK293

Proteína expresada en HEK293EBNA	sFGFR2-Fc	sFGFR2-Fc + SIAT6	sFGFR2-Fc + SIAT6 & B4GT1
% de especies sialiladas de sFGFR2-Fc:			
1-no sialilada	69%	46%	34%
2-monosialilada	23%	19%	22%
2-disialilada	6%	26%	35%
3-trisialilada	1,5%	10%	10%
Contenido en ácido siálico:			
1-pmol de ácido N-acetilneuramínico por pmol de sFGFR2-Fc	3,4	6,4	6,8
2-Número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano	0,4		1
Composición de monosacáridos de sFGFR2-Fc N-glicanos para 3 manosas	0,73	0,61	0,63

Proteína expresada en HEK293EBNA	sFGFR2-Fc	sFGFR2-Fc + SIAT6	sFGFR2-Fc + SIAT6 & B4GT1
1-Glucosamina (número por 3 manosas)	4,3	4,1	4,1
2-Galactosa (número por 3 manosas)	1,5	1,4	1,6
Número de fucosa en Fc N-glicanos para 3 manosas	0,73	0,61	0,63
Aclaramiento sanguíneo			
[sFGFR2-Fc] en plasma 6 horas después de la inyección i.v. (ng/mL)	258		20000
[sFGFR2-Fc] en plasma 6 horas después de la inyección i.v. (ng/mL) cuando los ratones se pretrataron con fetuina	229	no realizado	no realizado
[sFGFR2-Fc] en plasma 6 horas después de la inyección i.v. (ng/mL) cuando los ratones se pretrataron con asialofetuina	19276	no realizado	no realizado

5 El patrón de sialilación mejorado de proteínas de fusión sFGFR2-Fc producidas en HEK293EBNA se ha demostrado por co-expresión transitoria de la proteína de fusión con α -1,4-galactosiltransferasa humana o β -2,3-sialiltransferasa humana. Esta gran mejora del estado de sialilación se evidenció por una reducción en 2 veces del porcentaje de glicanos no sialilados, un aumento en 2 veces en el contenido total de ácido siálico por mol de proteína y un aumento de 2,5 veces en el número promedio de ácido siálico por N-glicano. Digno de mención, el contenido de monosacárido no se afectó (véase la Tabla 1).

Este aumento de 2,5 veces en el N-glicano sialilado se dirige correlacionado con los parámetros farmacocinéticos significativamente mejorados de sFGFR2-Fc. En particular, un aumento de 100 veces de la presencia de sFGFR2-Fc en el plasma se ha medido 6 horas después de la inyección iv en ratones.

10 La farmacocinética también se mejoró en 100 veces cuando los ratones se pretrataron con asialofetuina en comparación con el pretratamiento con fetuina. La asialofetuina, aunque no la fetuina, se conoce por enlazar con el receptor de asialoglicoproteína hepática (ASGPR) (Webster et al., 2003, Xenobiotica 33:945)

15 Tomado junto, estos resultados indican que el enlace específico al receptor de asialoglicoproteína por medio de residuos de galactosa terminales expuestos a partir de N-glicano es responsable del aclaramiento de sFGFR2-Fc mientras que la presencia de un ácido siálico por N-glicano en sFGFR2-Fc disminuye significativamente este aclaramiento.

Ejemplo 2: Cribado de clones estables de CHO que expresan la proteína sFGFR2-Fc con un número promedio de residuos de ácido siálico por FGFR2 N-glicano mayor que 1,2 para farmacocinéticas óptimas

20 El plásmido de expresión de mamíferos pXL4636 para la expresión estable de sFGFR2-Fc en células CHO se generó a partir del plásmido pEE14.4 que codifica el marcador de selección de glutamina sintetasa (Lonza) y el plásmido pXL4410 que contiene la secuencia de cADN que codifica la sFGFR2-Fc, Fig 5. El plásmido pXL4636 se introdujo en células CHO K1 mediante nucleofección utilizando la línea celular AMAXA del equipo Nucleofactor como se recomienda por el suministrador. Las células transfectadas de transfirieron en medio selectivo y después de la amplificación celular los siete mejores productores de semi-clones CHO/GS (SCn° 9, 11, 26, 58, 112, 118, 170) se
25 cribaron por el contenido en ácido siálico de las moléculas sFGFR2-Fc purificadas. Los dos semi-clones con el mayor contenido en ácido siálico (SC n° 11 y 118) se seleccionaron para el clonaje y producción a gran escala; en particular, el clon a partir de SC n° 118 se describió adicionalmente como GC111.

30 Aunque las moléculas sFGFR2-Fc producidas a partir de todos los semi-clones tenían alto contenido en ácido siálico, no llevaron a las mismas farmacocinéticas. De forma interesante, se observó que a partir de dos semi-clones (SCn°11 y 118), la sFGFR2-Fc con el mayor contenido en ácido siálico llevó a la mayor concentración de sFGFR2-Fc en sangre 6 horas después de la inyección iv en ratones, como se describe en la Tabla 2. Y a partir de dos clones (SCn° 9 y 170), la sFGFR2-Fc con el menor contenido en ácido siálico tenía la menor concentración de sFGFR2-Fc en sangre 6 horas después de la inyección iv en ratones.

35

Tabla 2- Clones estables de CHO que expresan la proteína sFGFR2-Fc con una relación de residuos de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano mayor que 1,2 para farmacocinéticas óptimas

sFGFR2-Fc purificadas a partir de semi-clones CHO-GS SC n°	SCn° 9	SCn° 11	SCn° 26	SCn° 58	SCn° 112	SCn° 118	SCn° 170
% de especies sialiladas de sFGFR2-Fc:							
1-no sialilada	50	42	48	48	45	43	53
2-monosialilada	28	30	30	30	30	30	28
3-disialilada	14	18	14	15	16	17	13
4-trisialilada	8	10	7	8	9	10	6
Número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano	1,07	1,45				1,29	0,98
[sFGFR2-Fc]/[sFGFR2-Fc]max [sFGFR2-Fc] se encontró en plasma 6 horas después de la inyección i.v. [sFGFR2-Fc]max se encontró para SCn° 1	55%	100%				81%	45%

El cribado de clones en base al N-glicano altamente sialilado de sFGFR2-Fc es predictivo de parámetros farmacocinéticos óptimos de **sFGFR2-Fc**.

5 Ejemplo 3: Correlación entre el número promedio de ácido siálico por sFGFR2-Fc N-glicano y el aclaramiento de sFGFR2-Fc en sangre

En otro experimento similar al experimento descrito en el Ejemplo 2, se generaron clones CHO/DHFR estables que expresan sFGFR2-Fc usando el sistema de selección y amplificación DHFR con los plásmidos de expresión de mamíferos apropiados pXL4429 y el plásmido pXL4417 (Fig. 6). Estos clones CHO-DHFR también se han cribado por el contenido de ácido siálico por molécula sFGFR2-Fc y el aclaramiento de sFGFR2-Fc producido por estos clones también se ensayó.

El número promedio de ácido siálico por N-glicano en el dominio FGFR2 se calculó en base a la cantidad total de moles de N-glicano por mol de FGFR2-Fc y los moles de N-glicano por mol de Fc obtenido después de la liberación del Fc mediante papaina. Los resultados presentados en la Fig. 7 mostraron que una relación de residuos de ácido siálico por FGFR2 N-glicano mayor que 1,2 aseguraba la concentración óptima de sFGFR2-Fc en sangre en comparación con la concentración óptima en sangre encontrada para moléculas Fc. Solo los clones seleccionados alcanzaron esta relación óptima.

Por lo tanto, los clones cribados por la relación de residuos de ácido siálico por FGFR2 N-glicano permite al experto predecir el bajo aclaramiento de sFGFR2-Fc en sangre.

20 Ejemplo 4: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión sFGFR2-Fc

La proteína sFGFR2-Fc codificada por el plásmido pXL4410 o pXL4636 o pXL4429 (Figura 5 y 6) es una proteína de fusión de la secuencia humana de FGFR2 soluble con el fragmento Fc derivado de la secuencia de IgG1 humana.

La secuencia del polinucleótido que codifica sFGFR2-Fc está expuesta en SEQ ID NO: 1 y en la Figura 4A. Asimismo, la secuencia entera de aminoácidos de la proteína sFGFR2-Fc se expone en SEQ ID NO: 2 en la Figura 4B. Los aminoácidos de las posiciones 1 a 350 corresponden al isotipo FGFR2IIIc (véase Fig 4C SEQ ID; NO: 4) y son los aminoácidos de la posición 27 a 376 descritos en SwissProt (FGFR2_HUMANO). Los aminoácidos de las posiciones 354 a 584 son aminoácidos de IgG1 desde la posición 99 hasta la 329, tal como se describe en SwissProt (IGHG1_HUMANO). véase Fig 4D y SEQ ID NO: 6. Los aminoácidos de las posiciones 351 a 353 son aminoácidos de un enlazador sintético: SAL (Ser Ala Leu) véase Fig 4E.

30 Ejemplo 5: Contenido de N-glicano definido de sFGFR2-Fc producido en el clon GC111 estable de CHO

Las condiciones se han optimizado para producir sFGFR2-Fc de manera que la relación de residuos de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano sería mayor que 1,2. Este ejemplo proporciona condiciones para alcanzar esta condición.

Un bioreactor de 5 L Celligen (New Brunswick) lleno con 4,4 L de medio libre de proteína CD-CHO, suplementado con suplementos MSX 100 µM y 1X GS se sembró a una densidad celular inicial de $3,5 \times 10^5$ células/mL de clon

GC111 y se cultivaron a 37°C. Se empleó la aireación por burbujeador usando una mezcla de oxígeno, nitrógeno, aire y dióxido de carbono u oxígeno puro, y el oxígeno disuelto se mantuvo a 30% de saturación de aire. El pH se mantuvo a 7,2 mediante adición de dióxido de carbono y la inyección de bicarbonato sódico 1 M en el medio de cultivo. La velocidad de agitación usada fue 110 rpm usando un Impulsor por Elevación Celular. La disolución de alimentación (450 g/L de glucosa) se alimentó de forma continua para mantener la glucosa a un nivel diana de 2-3 g/L. La alimentación se comenzó en el día 5 cuando la concentración de glucosa residual alcanzó 2,5 g/L. La alimentación continua de nutrientes se basó en el crecimiento celular predicho y el consumo de glucosa con una velocidad de alimentación de nutrientes igual al de la velocidad de consumo de glucosa. La concentración de glutamato se mantuvo a 1-3 mmol/L mediante la adición en pulsos siguiendo un control diario no en serie. El cultivo celular se monitorizó para el conteo celular, viabilidad y metabolitos (glucosa, lactato, glutamina, amonio y glutamato) y para la concentración de producto durante la fase de producción. El cultivo se paró cuando la viabilidad celular cayó al 55%, y se recogió la cosecha de cultivo.

La cosecha del cultivo celular se clarificó y la sFGFR2-Fc se purificó por cromatografía de afinidad (Prosepva, Millipore) y dos etapas de cromatografía de intercambio iónico, después se filtro en estéril y se almacenó en solución salina tampón de fosfato antes del análisis adicional y ensayo *in vivo*.

La masa molecular aparente de sFGFR2-Fc obtenida a partir del análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras fue 180 kDa. Esta estaba en contraste con la masa molecular teórica de 130 kDa calculada en base a la secuencia de aminoácidos del homodímero de sFGFR2-Fc. Esta gran diferencia entre las masas moleculares aparente y calculada se atribuye a la presencia adicional de aproximadamente 30% de N-glicanos, véase Tabla 3. Es más, en la digestión de sFGFR2-Fc mediante Péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F, Roche) seguido por análisis mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras, la masa molecular del sFGFR2-Fc desglicosilado estuvo alrededor de 160 kDa (Fig. 7).

La composición de carbohidratos y el perfil de N-glicano de sFGFR2-Fc se analizó como se describe en el Ejemplo 1 y se presentó en la Tabla 3.

Tabla 3 Composición de carbohidratos y perfil de N-glicanos de sFGFR2-Fc producido en condiciones óptimas

Proteínas expresadas a partir del clon GC111 de CHO-GS estable	sFGFR2-Fc
% de especies sialiladas de sFGFR2-Fc:	
1-no sialilada	30%
2-monosialilada	34%
3-disialilada	23%
4-trisialilada	13%
Número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano	1,34
Composición de monosacáridos de sFGFR2-Fc N-glicanos por 3 manosas	
1-Glucosamina (número por 3 manosas)	4,9
2-Galactosa (número por 3 manosas)	2,7
3-Fucosa (número por 3 manosas)	0,96
Composición de fucosa de Fc N-glicano por 3 manosas	1,1

En comparación con los resultados obtenidos en la Tabla 2, la sFGFR2-Fc, producida a partir del clon GC111 en las condiciones óptimas, tenía más N-glicano sialilado que la sFGFR2-Fc producido a partir del semi-clon SCn° 118, padre del clon GC111, producido en condiciones estándar. Por ejemplo, el % de especies no sialiladas disminuyó de 43% a 30%.

En base a la cantidad total de moles de N-glicano por mol de FGFR2-Fc y los moles de N-glicano por mol de Fc obtenido después de la liberación del Fc mediante papaina, se midió que había siete N-glicanos por FGFR2. Por lo tanto, la mayoría de los sitios del dominio FGFR2 están casi todos totalmente ocupados.

Ejemplo 6: Sitios de N-glicosilación importantes para la afinidad y productividad de FGF

La proteína de fusión sFGFR2-Fc tiene ocho sitios de N-glicosilación en el dominio FGFR2 y uno en el dominio Fc, véase Fig 8 y Tabla 5 para la definición de las posiciones N-glicano N1 a N8. Se produjeron proteínas 4493 y 4565,

dos variantes de sFGFR2-Fc no teniendo ya el dominio 1 semejante a Ig. 4493 mostró características similares al tipo salvaje de FGFR2-Fc derivado de pXL4636 en términos de productividad y enlace a FGF-2 o heparina. En contraste, 4565 en el que todos los sitios de glicosilación en el dominio sFGFR2 se mutaron (sustitución N a Q), podría no caracterizarse debido a la reducción de más que 50 veces en la productividad del mutante, véase Tabla 4.

5

Tabla 4. Características físico-químicas de variantes de sFGFR2-Fc

ID de Proteína	Sitios de N-glicosilación en el dominio FGFR2	Residuo de aminoácido en el sitio de N-glicosilación	Producción (mg/L)	enlace FGF-2 **	Enlace heparina
				K _d (10 ⁻⁹ M)	[NaCl] para la elución a partir de heparina (mM)
4410	8 (N1 a N8)	N	75	1,39	370
4493	6 (N3 a N8)	N	67	1,19	442
4565	6 (N3 a N8)	Q	< 1	ND	ND

** El enlace a FGF-2 se determinó en un instrumento BIAcore™ que utiliza un modelo "de reacción en dos estados con cambio de conformación" como se describe por Gamsjaeger et al., Biochem. J. 7 Apr. 2005 / BJ20050156. En breve, la integración se llevó a cabo en el sensograma entero excepto en las áreas de "efecto en masa". El intervalo de concentración se seleccionó entre 1 a 8 nM. El método de cinéticas ka/kd simultáneas permite las medidas de dos ka y dos kd asumiendo las siguientes ecuaciones:

ka1 y kd1 para A+B ⇌ AB

ka2 y kd2 para AB ⇌ AB* que representa la dimerización de complejos (FGF - FGFR2-Fc)

La constante de disociación K_D se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{1}{(ka_1 / kd_1) \times (1 + ka_2 / kd_2)}$$

10 Según los dos modelos competitivos presentados (el modelo de dos extremos simétricos de Mohammadi y el modelo asimétrico de Pellegrini), los sitios N3 a N7 podrían interactuar potencialmente con residuos de aminoácidos de o bien FGF1 o FGFR2c y/o interactuar con heparina, mientras que el sitio N8 es improbable que esté implicado en interacciones en todas las estructuras cristalinas (Pellegrini et al. 2000. Nature 407: 1029; Ibrahimi et al. 2005 Mol. Cell. Biol. 25: 671).

15 En base a la información anterior, fue relevante estudiar los sitios de N-glicosilación en las posiciones N3 a N7 mediante sustitución de la correspondiente Asn por Gln y manteniendo la posición N8 inalterada para permitir una productividad significativa. La influencia posicional de los N-glicanos en las características físico-químicas de sFGFR2-Fc se evaluó estadísticamente con un experimento factorial fraccionario de dos niveles. Se seleccionaron cinco variables (ocupación de sitios de glicosilación en las posiciones N3 a N7) y se estudiaron 16 construcciones independientes. El diseño fraccionario 2⁵⁻¹ experimental y el análisis de datos se llevaron a cabo como se describe (Statistics for Experimenters, G. Box Ed., Willey, 1978).

20 **Diseño Factorial Fraccionario**

Se diseñaron variantes de N-glicosilación específicas del sitio en base a 4493 y el diseño factorial a dos niveles con cinco variables (N3 a N7) que podrían ser o bien un nivel más (N) o un nivel menos (Q). El diseño fue fraccionario con 16 construcciones (2⁵⁻¹, es decir, resolución de diseño V), permitiendo la identificación de los efectos principales y de las interacciones de factor 2 aunque confundiendo las interacciones de factor 2 con factor 3.

25 Las construcciones de 16 plásmidos se obtuvieron por PCR secuencial y clonaje para generar la sustitución N a Q en la posición N3, N4, N5, N6 o N7 aunque manteniendo la posición N8 y el sitio de N-glicosilación del dominio Fc sin cambios. Estas variantes de proteína solo difirieron de 4493 por las mutaciones en los puntos 2 o 4 enumerados en la Tabla 5.

30

Tabla 5. Matriz de diseño

Posición de Asn en la Figura 9	Construcción	Estado de la posición de N-glicosilación						
		N3	N4	N5	N6	N7	N8	N 297 (Fc)
Posición de Asn en FGFR2_HUMANO		228	241	265	297	318	331	
	4572	-	-	-	-	+	+	+
	4570	+	-	-	-	-	+	+
	4577	-	+	-	-	-	+	+
	4571	+	+	-	-	+	+	+
	4587	-	-	+	-	-	+	+
	4585	+	-	+	-	+	+	+
	4586	-	+	+	-	+	+	+
	4573	+	+	+	-	-	+	+
	4574	-	-	-	+	-	+	+
	4575	+	-	-	+	+	+	+
	4588	-	+	-	+	+	+	+
	4576	+	+	-	+	-	+	+
	4579	-	-	+	+	+	+	+
	4569	+	-	+	+	-	+	+
	4578	-	+	+	+	-	+	+
	4493	+	+	+	+	+	+	+

5 Las 16 construcciones diseñadas se ensayaron para producción a pequeña escala. Dos variantes (4572 y 4574) fueron productores muy bajos (alrededor de 2 mg/L). Las restantes 14 construcciones se produjeron a escala-libre y se purificaron en paralelo en condiciones estándar con razonable recuperación de producto. Se analizaron después por SDS-PAGE, filtración en gel, BIAcore™. Los resultados se analizaron con la resolución factorial fraccionaria estadística - 2⁵⁻¹ DOE.

Productividad

10 La N-glicosilación en N3, N4, N5, N6, N7 tuvo una contribución positiva en la productividad. Hubo un efecto cuantitativo similar para todas las posiciones estudiadas (es decir, N3, N4, N5, N6 y N7) y ningún efecto significativa de interacciones de dos factores.

Tabla 6. Productividad

Construcción	Titrado (mg/L) a partir de la producción a 1-L	Respuesta (mg/L)	Variable
4572	0	28	Media
4570	13	17	N3
4577	9	14	N4
4571	34	20	N5
4587	5	13	N6
4585	40	13	N7
4586	42	-8	N3-N4
4573	32	3	N3-N5
4574	0	1	N3-N6
4575	30	-2	N3-N7
4588	37	-2	N4-N5
4576	27	-1	N4-N6
4579	30	6	N4-N7
4569	54	4	N5-N6
4578	37	0	N5-N7
4493	67	-1	N6-N7

Agregación

Las proteínas purificadas se analizaron por filtración en gel (Superdex 2000) para cuantificar el porcentaje de especies de alto peso molecular (HMW; %) en preparados purificados. El mayor valor (peor caso) de 80,2 % de HMW se obtuvo para 4587 y se usó en el análisis DOE para las dos construcciones (4572 y 4574) que no podrían producirse (el porcentaje medio del valor HMW obtenido a partir de las 14 construcciones se usó también por comparación, dando una conclusión similar). La N-glicosilación en la posición N5 y una menor extensión en la posición N6, desfavoreció la aparición de especies HMW. La interacción N5-N6 mostró un efecto similar en la agregación.

Tabla 7. Formación de agregado

Construcción	HMW (%)	Respuesta (%)	Variable
4572	80	57	Media
4570	73,0	-12	N3
4577	71,6	-5	N4
4571	72,1	-33	N5
4587	80,2	-18	N6
4585	47,5	-7	N7

4586	47,7		6	N3-N4
4573	57,5		-8	N3-N5
4574	80		-5	N3-N6
4575	69,6		2	N3-N7
4588	71,8		-2	N4-N5
4576	72,9		3	N4-N6
4579	35,2		-4	N4-N7
4569	12,0		-18	N5-N6
4578	39,4		-6	N5-N7
4493	3,6		1	N6-N7

Enlace a FGF-2

La afinidad de enlace a FGF-2 se determinó con BIAcore™ para cada construcción. Los valores de la constante de disociación (K_D) entre 0,49 y 2,31 nM se obtuvieron para construcciones que mostraban afinidad medible. Para las construcciones que no enlazaron a FGF-2 o no pudieron producirse, se usó un valor de 10 nM para el análisis DOE.

- 5 La N-glicosilación en posiciones N5 y en una menor extensión, en posiciones N6 y N3, tuvo un efecto positivo en el enlace a FGF-2. Las interacciones N3-N5 y N5-N6 tuvieron un efecto positivo significativo en el enlace, mientras que las interacciones N3-N6 y N4-N7 tuvieron un efecto negativo en el enlace.

Tabla 8. Enlace a FGF-2

Construcción	K_D (nM)		Respuesta (nM)	Variable
4572	10		6,8	Media
4570	10		-2,2	N3
4577	10		-0,5	N4
4571	10		-6,5	N5
4587	10		-2,3	N6
4585	2,7		0,5	N7
4586	10		0,0	N3-N4
4573	0,49		-2,2	N3-N5
4574	10		2,0	N3-N6
4575	10		0,1	N3-N7
4588	10		-0,5	N4-N5
4576	10		0,1	N4-N6
4579	2,31		2,0	N4-N7
4569	0,99		-2,3	N5-N6
4578	0,66		0,5	N5-N7
4493	1,19		0,0	N6-N7

- 10 Esta resolución-V 2⁵⁻¹ D.O.E. reveló que la N-glicosilación tuvo una contribución positiva en la productividad, en las posiciones N3, N4, N5, N6, N7; tuvo un impacto positivo en el enlace a FGF-2, en posiciones N5 >> N6 y N3; y

desfavoreció la aparición de moléculas de alto peso molecular en todas las posiciones, especialmente N5 > N6.

Por lo tanto, la ocupación de N-glicanos es obligatoria en la posición N5, y recomendada en las posiciones N3, N4, N6 y N7 respectivamente (posición 265, 228, 241, 297 y 318 respectivamente en FGFR2_HUMANO (Swissprot).

5 Ejemplo 7: Farmacocinéticas de la proteína de fusión sFGFR2-Fc

En el ejemplo 7, sFGFR2-Fc es la proteína de fusión que corresponde a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2 con un número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano de 1,3. A tres ratones por punto temporal se les inyectaron 500 µg de proteína de fusión en la vena caudal. A diversos puntos temporales después de la inyección del producto, se recogió sangre, la Figura 10 muestra la concentración de proteína en plasma e hígado. La Figura 11 muestra la cantidad de recuperación de proteína en puntos temporales tempranos en plasma e hígado expresadas en porcentaje de la dosis inyectada.

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon empleando análisis no compartimental. La vida media de eliminación se calculó con los 6 últimos puntos de datos que proporcionaban el mejor ajuste de la fase terminal logarítmico-lineal (Tabla 9).

15

Tabla 9

Parámetro	Unidades	sFGFR2-Fc
t _{1/2}	hora	70,1
T _{last}	hora	72,0
C _{last}	µg/mL	27,6
AUC _{last}	hr*µg/mL	3138
C _{lobs}	mL/hora/kg	4,2
V _{ss}	mL/kg	406

AUC_{last} Área bajo la curva desde el momento de la dosificación hasta la última concentración medible.

Cl obs Aclaramiento total corporal para la administración extravascular

C_{last} Concentración correspondiente a T_{last}

t_{1/2} Vida media terminal

20 T_{last} Tiempo de la última concentración medible (no cero).

V_{ss} Una estimación del volumen de distribución en estado estacionario

Tras la administración intravenosa, la sFGFR2-Fc mostró un perfil farmacocinético favorable con una prolongada vida media de eliminación (casi 3 días) y un aclaramiento corporal total reducido. El volumen de distribución fue limitado e inferior al volumen de agua corporal total, lo que sugiere una distribución tisular limitada. A las 72 horas, la concentración en plasma de sFGFR2-Fc se mantiene a una concentración muy alta, y el aclaramiento también es bueno. Los parámetros farmacocinéticos de sFGFR2-Fc son muy compatibles con el empleo de esta proteína de fusión como agente terapéutico. En efecto, tal como se ha mostrado en los Ejemplos, la concentración en plasma después de la inyección intravenosa en ratones es sustancialmente elevada, y el aclaramiento permanece muy bajo a las 72 horas tras la inyección. De manera importante, la cinética de escisión de sFGFR2-Fc in vivo es también muy baja, ya que la sFGFR2-Fc fue escindida sólo parcialmente (40% tras 18 horas) y la concentración de la molécula de longitud completa permaneció inalterada hasta las 72 horas. Por tanto, la molécula de fusión, al menos tal como se enumera en la SEQ ID NO: 2 y un número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano de 1,3, mostró un perfil farmacocinético favorable con una larga vida media de eliminación (casi 3 días) y un aclaramiento corporal total satisfactorio.

35 Ejemplo 8: Eficacia de la proteína de fusión sFGFR2-Fc en el modelo tumoral subcutáneo A549

En este ejemplo, sFGFR2-Fc es la proteína de fusión que corresponde a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2 con un número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano de 1,3.

Modelo tumoral subcutáneo A549

Se había identificado la línea celular A549 como una línea celular tumoral para evaluar la eficacia de sFGFR2-Fc. El solicitante ha demostrado in vitro que esta línea celular expresa FGF2 y también que la sFGFR2-Fc puede detener la proliferación autocrina de estas células. El solicitante estableció un modelo tumoral A549 subcutáneo en ratones "desnudos" Balb/c. Además, el tumor in vivo expresa FGF2.

En este experimento, la eficacia de la molécula sFGFR2-Fc se evaluó en el modelo de crecimiento tumoral A549. Se inyectaron los productos de forma subcutánea dos veces por semana. Se evaluaron distintas dosis, es decir, 25, 15 y 5 mg/kg de sFGFR2-Fc.

Después de todos los análisis de la evolución del volumen tumoral de los tres grupos tratados con FGFR2-Fc, fueron estadísticamente diferentes a la evolución tumoral del grupo tratado con PBS. La sFGFR2-Fc es eficaz en el crecimiento tumoral en este modelo a la dosis de 5 mg/kg dos veces a la semana.

Diseño experimental

Se inyectaron de forma subcutánea $5 \cdot 10^6$ células A549 en 200 μ l a ratones desnudos Balb/c en el día 0. El mismo día, después de la inyección celular, se distribuyeron aleatoriamente los ratones en bloques de cuatro, dentro de cuatro grupos basados en el peso corporal. Los tratamientos comenzaron tras la aleatorización el día después de la inyección celular. Cada grupo recibió de forma subcutánea 500, 300 o 100 μ g/ratón/administración, que correspondía respectivamente a 25, 15 y 5 mg/kg dos veces por semana: lunes y viernes, durante 39 días.

Resultados**Análisis del volumen tumoral**

Tal como se muestra en la Figura 12, se analizó el volumen del tumor hasta el día 40. Los grupos de 100 μ g (triángulos), 300 μ g (cuadrados) y 500 μ g/ratón/administración (círculos llenos) eran estadísticamente diferentes del grupo de PBS (círculos huecos). Se concluyó que la sFGFR2-Fc redujo el crecimiento tumoral a las dosis de 25, 15 y 5 mg/kg.

Peso del tumor en el día 40

Tal como se muestra en la Figura 13, al final del experimento se cosecharon los tumores y se pesaron. Los grupos de 100 μ g, 300 μ g y 500 μ g por ratón y por administración eran estadísticamente diferentes del grupo con PBS. Se concluyó que la sFGFR2-Fc según la presente invención, redujo el peso del tumor a las dosis de 25, 15 y 5 mg/kg.

La evolución del crecimiento tumoral en los grupos de sFGFR2-Fc_100, sFGFR2-Fc_300 y sFGFR2-Fc_500 fue estadísticamente diferente de la evolución en el grupo tratado con PBS. La proteína de fusión sFGFR2-Fc según la presente invención (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2 con un número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano de 1,3, es capaz de disminuir sustancialmente el crecimiento tumoral a la dosis de 5 mg/kg.

Ejemplo 9: Eficacia de la proteína de fusión sFGFR2-Fc en el modelo tumoral subcutáneo H460

En el ejemplo 9, la sFGFR2-Fc es la proteína de fusión que corresponde a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2 con un número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano de 1,6.

Modelo tumoral subcutáneo H460

Se había identificado la línea celular H460 como una línea celular tumoral para evaluar la eficacia de sFGFR2-Fc. Se ha demostrado in vitro que esta línea celular expresa FGF2. En este experimento se evaluó la eficacia de sFGFR2-Fc sobre el crecimiento tumoral. Se inyectaron los productos de forma subcutánea, dos veces por semana, a la dosis de 25 mg/kg. Después del análisis global de la evolución del volumen tumoral, la sFGFR2-Fc redujo el crecimiento del tumor.

Diseño experimental

Se inyectaron de forma subcutánea $5 \cdot 10^6$ células H460, en 200 μ l, en el ijar derecho de ratones desnudos Balb/c en el día 0. Tras la inyección celular, en el día de la inoculación celular (día 0) se distribuyó aleatoriamente a los ratones en función del peso corporal medido, y se les ubicó en los grupos de tratamiento.

Los tratamientos se administraron dos veces por semana mediante inyecciones subcutáneas (200 μ l) durante 3 semanas consecutivas (lunes y viernes). La primera administración se realizó el día 1 después de la inoculación celular, a fin de maximizar la exposición de las células al tratamiento.

Resultados

Análisis del volumen tumoral

La Figura 14 muestra el análisis del volumen tumoral hasta el día 22. Se concluyó que la sFGFR2-Fc redujo sustancialmente el crecimiento tumoral.

5 Análisis del peso tumoral

La Figura 15 muestra el análisis del peso tumoral en el día 22. Se concluyó que la sFGFR2-Fc redujo sustancialmente el crecimiento tumoral.

La evolución del crecimiento tumoral del grupo sFGFR2-Fc fue estadísticamente diferente de la evolución del grupo tratado con PBS. Se concluyó claramente que la proteína de fusión según la presente invención (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2 con un número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano de 1,6, es capaz de disminuir esencialmente el crecimiento tumoral de H460 a la dosis de 25 mg/kg.

Ejemplo 10: Evaluación de actividad ADCC *in vitro* de la proteína de fusión sFGFR2-Fc en líneas celulares A549 y H460

En este ejemplo, la sFGFR2-Fc es la proteína de fusión que corresponde a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2 con un número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano mayor que 1,6. La capacidad de sFGFR2-Fc para mediar una actividad ADCC *in vitro* se ha evaluado en los modelos seleccionados de células tumorales tanto H460 como A549 (véase los ejemplos 8 y 9).

Diseño experimental

Las células tumorales (A549 y H460) en PBS al 2% de BSA (1 millón/mL) se han incubado 30 min a 4°C con 500 ng/mL de FGF2 (R&DSystems) y 2 µg/mL de sFGFR2-Fc o IgG1 humano de control (Sigma). Las células tumorales se han diluido en RPMI al 1% de FBS y se han incubado en una placa de 96 pocillos a 5000 células por pocillo. Se ha añadido NK purificado en la relación NK/células tumorales 20/1 y 6/1. Las placas se han incubado 4 horas a 37°C, después se han centrifugado y la lactato deshidrogenasa se ha titulado en el sobrenadante (equipo ROCHE). Se obtuvo el 100% de lisis usando tritón X100 al 0,2%. Se calculó el ADCC inducido por sFGFR2-Fc específico como se solicita por el fabricante.

Resultados

Los resultados ilustrados en la Figura 16, muestran una lisis de células tumorales mediada por células asesinas naturales (NK) en presencia de sFGFR2-Fc en células tumorales tanto A549 como H460 cerca del 25% en las condiciones 20/1 (NK/célula tumoral), que indica que sFGFR2-Fc es capaz de mediar el efecto ADCC en esas células tumorales.

Ejemplo 11: Evaluación de actividades ADCC y CDC *in vivo* de la proteína de fusión sFGFR2-Fc en el modelo tumoral subcutáneo A549

En este ejemplo, la sFGFR2-Fc es la proteína de fusión que corresponde a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2 con un número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano mayor que 1,6.

35 Modelo tumoral subcutáneo A549

La línea celular A549 se ha identificado como una línea de células tumorales para evaluar la eficacia de la sFGFR2-Fc, ya que estas células expresaron alto nivel de FGF2 *in vivo* y fueron sensibles a ADCC mediado por sFGFR2-Fc *in vitro*.

Cepas de ratón

Se seleccionaron tres cepas diferentes de ratón (ratones SCID, NOD/SCID y SCID/bg) para evaluar la capacidad de la sFGFR2-Fc para mediar las actividades ADCC y/o CDC *in vivo*. Los ratones SCID mantuvieron las funciones NK y complementarias y son capaces de desarrollar respuestas ADCC y CDC y se seleccionaron como control positivo. Los ratones NOD/SCID no tienen ni la función NK ni la capacidad de estimular la actividad complementaria y fueron incapaces de desarrollar actividades ni ADCC ni CDC. Los ratones SCID/bg no tienen función NK y fueron incapaces de desarrollar actividad ADCC.

En este experimento, la eficacia de la línea de moléculas sFGFR2-Fc se evaluó en el tumor A549 implantado de forma subcutánea en tres diferentes cepas de ratón. Se inyectó sFGFR2-Fc de forma subcutánea dos veces a la semana a la dosis de 5 mg/kg durante el curso entero del estudio.

50

Diseño Experimental

El A549 se implantó de forma subcutánea en ratones SCID, NOD/SCID y SCID/bg como se describe anteriormente (véase ejemplo 8). Los tratamientos se han administrado dos veces a la semana mediante inyecciones subcutáneas durante 6 semanas consecutivas. Durante el curso del estudio, el peso corporal y el volumen tumoral se han medido dos veces a la semana.

Resultados

Tal como se muestra en la Figura 17, se analizó el volumen del tumor hasta el día 41 en los 3 experimentos. En los ratones SCID, el grupo tratado por sFGFR2-Fc a 5 mg/kg (diamantes) fue estadísticamente diferente del grupo control (círculos huecos) y mostró una inhibición tumoral (calculada como $100 - (\text{Volumen del grupo tratado} / \text{Volumen del grupo control} \times 100)$) de 39%. En los ratones NOD/SCID, la sFGFR2-Fc a 5 mg/kg no mostró actividad. En los ratones SCID/bg, la sFGFR2-Fc a 5 mg/kg recuperó parcialmente su actividad (inhibición tumoral = 18%). Según estos resultados, los mecanismos CDC y ADCC estuvieron implicados en la eficacia de sFGFR2-Fc.

Ejemplo 12: Evaluación de actividades ADCC y CDC in vivo de la proteína de fusión sFGFR2-Fc en el modelo tumoral subcutáneo H460

En este ejemplo, la sFGFR2-Fc es la proteína de fusión que corresponde a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2 con un número promedio de ácido siálico por sFGFR2 N-glicano mayor que 1,6.

Modelo tumoral subcutáneo H460

La línea celular H460 se ha identificado como una línea de células tumorales para evaluar la eficacia de sFGFR2-Fc, ya que estas células expresaron alto nivel de FGF2 in vivo y fueron sensibles a ADCC mediado por sFGFR2-Fc *in vitro*.

Cepas de ratón

Como se describe anteriormente en el ejemplo 11, se seleccionaron tres cepas de ratón con diferentes funciones inmunes (ratones SCID, NOD/SCID y SCID/bg) para evaluar la capacidad de sFGFR2-Fc para mediar las actividades ADCC y/o CDC in vivo en H460.

En este experimento, la eficacia de la molécula sFGFR2-Fc se evaluó en el tumor H460 implantado de forma subcutánea en las tres diferentes cepas de ratón. Se inyectó sFGFR2-Fc de forma subcutánea dos veces a la semana a la dosis de 25 mg/kg durante el curso entero del estudio.

Diseño Experimental

El H460 se implantó de forma subcutánea en ratones SCID, NOD/SCID y SCID/bg como se describe anteriormente (véase ejemplo 9). Los tratamientos se han administrado dos veces a la semana mediante inyecciones subcutáneas durante 3 semanas consecutivas. Durante el curso del estudio, el peso corporal y el volumen tumoral se han medido dos veces a la semana.

Resultados

Tal como se muestra en la Figura 18, se analizó el volumen del tumor hasta el día 22 en los 3 experimentos. En los ratones SCID, el grupo tratado con sFGFR2-Fc a 25 mg/kg (diamantes) fue estadísticamente diferente del grupo control (círculos huecos) y mostró una inhibición tumoral de 29%. En los ratones NOD/SCID, la sFGFR2-Fc a 5 mg/kg mostró una pérdida de actividad con una inhibición tumoral de 14%. En los ratones SCID/bg, la sFGFR2-Fc a 5 mg/kg recuperó toda su actividad (inhibición tumoral = 32%). En estos estudios, como se observa en el modelo tumoral A549 (véase ejemplo 11), los mecanismos CDC y ADCC estuvieron implicados en la eficacia de sFGFR2-Fc.

Ejemplo 13 Evaluación de la eficacia in vivo de sFGFR2-Fc en comparación con sFGFR2-Fc (A265 Fc) en el modelo tumoral subcutáneo H460

Shields et al. describió una mutación puntual Asp265Ala en el dominio Fc de IgG1 humano denominado (A265 Fc) que confería un enlace reducido a todos los receptores FcγR y muy baja citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (2001 J. Biol. Chem 276:6591). Esta mutación puntual se introdujo en el dominio Fc de la secuencia de ADN que codifica sFGFR2-Fc del plásmido pXL4547 (Fig. 19), dando por resultado la secuencia de polinucleótido representada por SEQ ID NO. 13. Los clones CHO/DHFR estables que expresan sFGFR2-Fc (A265 Fc) (SEQ ID NO. 14) se generaron usando el sistema de selección y amplificación DHFR con los plásmidos de expresión de mamíferos apropiados pXL4547 y el plásmido pXL4417 como se describe en el Ejemplo 3. La proteína sFGFR2-Fc (A265 Fc) se produjo entonces y se purificó para estudios *in vivo*. Se verificó que su contenido en glicanos fue similar al contenido en glicanos encontrado para la sFGFR2-Fc producida en los Ejemplos 3 o 5.

Proteína expresada a partir de CHO-DHFR estable	sFGFR2-Fc (A265 Fc)
% de especies sialiladas de sFGFR2-Fc:	
1-no sialilada	40%
2-monosialilada	28%
3-disialilada	22%
4-trisialilada	10%
Composición de monosacáridos de sFGFR2-Fc N-glicanos por 3 manosas	
1-Glucosamina (número por 3 manosas)	4,35
2-Galactosa (número por 3 manosas)	2,74
3-Fucosa (número por 3 manosas)	0,89

Modelo tumoral subcutáneo H460

Se ha identificado la línea celular H460 como una línea celular tumoral para evaluar la eficacia de sFGFR2-Fc. Estas células expresaron alto nivel de FGF2 *in vivo* y eran sensibles al ADCC mediado por sFGFR2-Fc *in vitro*.

5 En este experimento, la eficacia de la molécula sFGFR2-Fc y la molécula modificada sFGFR2-Fc (A265 Fc) se evaluó en el tumor H460 implantado de forma subcutánea en ratones desnudos.

Diseño Experimental

H460 se implantó de forma subcutánea en ratones Balb/C desnudos como se describe anteriormente (véase ejemplo 9). Los tratamientos se han administrado dos veces a la semana durante el curso entero del estudio. Durante el curso del estudio, el peso corporal y el volumen tumoral se han medido dos veces a la semana.

10 Resultados

15 Tal como se muestra en la Figura 20, se analizó el volumen del tumor hasta el día 23. El grupo tratado con sFGFR2-Fc a 25 mg/kg (diamantes) fue estadísticamente diferente del grupo control (círculos huecos) y mostró una inhibición tumoral de 50%. La sFGFR2-Fc (A265 Fc) modificada a 25 mg/kg mostró una pérdida de actividad con solo una inhibición tumoral de 25% (NS). La mutación en el Fc de sFGFR2-Fc (A265 Fc) indujo una disminución de la actividad.

Como se ha mostrado que esta modificación disminuye la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, el ejemplo 13 proporciona una evidencia indirecta de que sFGFR2-Fc actuó *in vivo* mediante un mecanismo que implica ADCC.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110 > CENTELION

<120> FUSIONES Fc CON RECEPTOR PARA FGF SOLUBLE MODIFICADAS CON ACTIVIDAD BIOLOGICA
 5 MEJORADA

<130> documento FR2006-084 PCT
 <150> documento EP 06291824.8

10 <151> 2006-11-28
 <150> documento EP 07290042.6

<151> 2007-01-11

15 <160> 14

<170 > Versión PatentIn 3.3

<210> 1
 20 <211> 1755
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 25 <221 > CDS
 <222> (1)..(1755)

<400> 1

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

145	150							155							160			
cca Pro	acc Thr	atg Met	cgg Arg	tgg Trp 165	ctg Leu	aaa Lys	aac Asn	ggg Gly	aag Lys 170	gag Glu	ttt Phe	aag Lys	cag Gln	gag Glu 175	cat His	528		
cgc Arg	att Ile	gga Gly	ggc Gly 180	tac Tyr	aag Lys	gta Val	cga Arg	aac Asn 185	cag Gln	cac His	tgg Trp	agc Ser	ctc Leu 190	att Ile	atg Met	576		
gaa Glu	agt Ser	gtg Val 195	gtc Val	cca Pro	tct Ser	gac Asp	aag Lys 200	gga Gly	aat Asn	tat Tyr	acc Thr	tgt Cys 205	gtg Val	gtg Val	gag Glu	624		
aat Asn	gaa Glu 210	tac Tyr	ggg Gly	tcc Ser	atc Ile	aat Asn 215	cac His	acg Thr	tac Tyr	cac His	ctg Leu 220	gat Asp	gtt Val	gtg Val	gag Glu	672		
cga Arg 225	tcg Ser	cct Pro	cac His	cgg Arg	ccc Pro 230	atc Ile	ctc Leu	caa Gln	gcc Ala	gga Gly 235	ctg Leu	ccg Pro	gca Ala	aat Asn	gcc Ala 240	720		
tcc Ser	aca Thr	gtg Val	gtc Val	gga Gly 245	gga Gly	gac Asp	gta Val	gag Glu	ttt Phe 250	gtc Val	tgc Cys	aag Lys	gtt Val	tac Tyr 255	agt Ser	768		
gat Asp	gcc Ala	cag Gln	ccc Pro 260	cac His	atc Ile	cag Gln	tgg Trp	atc Ile 265	aag Lys	cac His	gtg Val	gaa Glu	aag Lys 270	aac Asn	ggc Gly	816		
agt Ser	aaa Lys	tac Tyr 275	ggg Gly	ccc Pro	gac Asp	ggg Gly	ctg Leu 280	ccc Pro	tac Tyr	ctc Leu	aag Lys	gtt Val 285	ctc Leu	aag Lys	gcc Ala	864		
gcc Ala 290	ggt Gly	gtt Val	aac Asn	acc Thr	acg Thr	gac Asp 295	aaa Lys	gag Glu	att Ile	gag Glu	gtt Val 300	ctc Leu	tat Tyr	att Ile	cgg Arg	912		
aat Asn 305	gta Val	act Thr	ttt Phe	gag Glu	gac Asp 310	gct Ala	ggg Gly	gaa Glu	tat Tyr	acg Thr 315	tgc Cys	ttg Leu	gcg Ala	ggt Gly	aat Asn 320	960		
tct Ser	att Ile	ggg Gly	ata Ile	tcc Ser 325	ttt Phe	cac His	tct Ser	gca Ala	tgg Trp 330	ttg Leu	aca Thr	gtt Val	ctg Leu	cca Pro 335	gcg Ala	1008		
cct Pro	gga Gly	aga Arg	gaa Glu 340	aag Lys	gag Glu	att Ile	aca Thr	gct Ala 345	tcc Ser	cca Pro	gac Asp	tac Tyr	ctg Leu 350	tca Ser	gcg Ala	1056		
cta Leu	gag Glu	ccc Pro 355	aaa Lys	tct Ser	tgt Cys	gac Asp	aaa Lys 360	act Thr	cac His	aca Thr	tgc Cys	cca Pro 365	ccg Pro	tgc Cys	cca Pro	1104		
gca Ala 370	cct Pro	gaa Glu	ctc Leu	ctg Leu	ggg Gly 375	gga Gly	ccg Pro	tca Ser	gtc Val	ttc Phe	ctc Leu 380	ttc Phe	ccc Pro	cca Pro	aaa Lys	1152		
ccc Pro 385	aag Lys	gac Asp	acc Thr	ctc Leu	atg Met 390	atc Ile	tcc Ser	cgg Arg	acc Thr	cct Pro 395	gag Glu	gtc Val	aca Thr	tgc Cys	gtg Val 400	1200		
gtg Val	gtg Val	gac Asp	gtg Val	agc Ser 405	cac His	gaa Glu	gac Asp	cct Pro	gag Glu 410	gtc Val	aag Lys	ttc Phe	aac Asn	tgg Trp 415	tac Tyr	1248		
gtg Val	gac Asp	ggc Gly	gtg Val	gag Glu	gtg Val	cat His	aat Asn	gcc Ala	aag Lys	aca Thr	aag Lys	ccg Pro	cgg Arg	gag Glu	gag Glu	1296		

	420		425		430		
cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac							1344
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His							
	435		440		445		
cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa							1392
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys							
	450		455		460		
gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag							1440
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln							
	465		470		475		
ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg							1488
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu							
	485		490		495		
acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc							1536
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro							
	500		505		510		
agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac							1584
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn							
	515		520		525		
tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc							1632
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu							
	530		535		540		
tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc							1680
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val							
	545		550		555		
ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag							1728
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln							
	565		570		575		
aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga							1755
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly							
	580						

<210> 2
 <211> S84
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr
 1 5 10 15
 Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu
 20 25 30
 Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys
 35 40 45
 Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala
 65 70 75 80

Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val
 85 90 95
 Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp
 100 105 110
 Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro
 115 120 125
 Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro
 130 135 140
 Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met
 145 150 155 160
 Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His
 165 170 175
 Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met
 180 185
 Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu
 195 200 205
 Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu
 210 215 220
 Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala
 225 230 235 240
 Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser
 245 250 255
 Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly
 260 265 270
 Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala
 275 280 285
 Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg
 290 295 300
 Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn
 305 310 315 320
 Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Ser Ala
 340 345 350

Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 355 360 365
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 370 375 380
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 385 390 395 400
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 405 410 415
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 420 425 430
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 435 440 445
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 450 455 460
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 465 470 475 480
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 485 490 495
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 500 505 510
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 515 520 525
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 530 535 540
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 545 550 555 560
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 565 570 575
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 580

<210> 3
 <211> 1050
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>

<221 > CDS

<222> (1)..(1050)

5 <400> 3

tta gtt gag gat acc aca tta gag cca gaa gag cca cca act aaa tac	48
Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr	
1 5 10 15	
caa atc tct caa cca gaa gtg tac gtg gct gca cca ggg gag tcg cta	96
Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu	
20 25 30	
gag gtg cgc tgc ctg ttg aaa gat gcc gcc gtg atc agt tgg act aag	144
Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys	
35 40 45	
gat ggg gtg cac ttg ggg ccc aac aat agg aca gtg ctt att ggg gag	192
Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu	
50 55 60	
tac ttg cag ata aag ggc gcc acg cct aga gac tcc ggc ctc tat gct	240
Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala	
65 70 75 80	
tgt act gcc agt agg act gta gac agt gaa act tgg tac ttc atg gtg	288
Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val	
85 90 95	
aat gtc aca gat gcc atc tca tcc gga gat gat gag gat gac acc gat	336
Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp	
100 105 110	
ggt gcg gaa gat ttt gtc agt gag aac agt aac aac aag aga gca cca	384
Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro	
115 120 125	
tac tgg acc aac aca gaa aag atg gaa aag cgg ctc cat gct gtg cct	432
Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro	
130 135 140	
gcg gcc aac act gtc aag ttt cgc tgc cca gcc ggg ggg aac cca atg	480
Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met	
145 150 155 160	
cca acc atg cgg tgg ctg aaa aac ggg aag gag ttt aag cag gag cat	528
Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His	
165 170 175	
cgc att gga ggc tac aag gta cga aac cag cac tgg agc ctc att atg	576
Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met	
180 185 190	
gaa agt gtg gtc cca tct gac aag gga aat tat acc tgt gtg gtg gag	624
Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu	
195 200 205	
aat gaa tac ggg tcc atc aat cac acg tac cac ctg gat gtt gtg gag	672
Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu	
210 215 220	
cga tcg cct cac cgg ccc atc ctc caa gcc gga ctg ccg gca aat gcc	720
Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala	
225 230 235 240	
tcc aca gtg gtc gga gga gac gta gag ttt gtc tgc aag gtt tac agt	768
Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser	
245 250 255	

gat gcc cag ccc cac atc cag tgg atc aag cac gtg gaa aag aac ggc 816
 Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly
 260 265 270

agt aaa tac ggg ccc gac ggg ctg ccc tac ctc aag gtt ctc aag gcc 864
 Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala
 275 280 285

gcc ggt gtt aac acc acg gac aaa gag att gag gtt ctc tat att cgg 912
 Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg
 290 295 300

aat gta act ttt gag gac gct ggg gaa tat acg tgc ttg gcg ggt aat 960
 Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn
 305 310 315 320

tct att ggg ata tcc ttt cac tct gca tgg ttg aca gtt ctg cca gcg 1008
 Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala
 325 330 335

cct gga aga gaa aag gag att aca gct tcc cca gac tac ctg 1050
 Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu
 340 345 350

<210> 4
 <211> 350
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Leu val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr
 1 5 10 15

Gln ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu
 20 25 30

Glu val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys
 35 40 45

Asp Gly val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr val Leu Ile Gly Glu
 50 55 60

Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala
 65 70 75 80

Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val
 85 90 95

Asn val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp
 100 105 110

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

Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro
 130 135 140

Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met
 145 150 155 160

Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His
 165 170 175

Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met
 180 185 190

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

Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu
 210 215 220

Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala
 225 230 235 240

Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser
 245 250 255

Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly
 260 265 270

Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala
 275 280 285

Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg
 290 295 300

Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn
 305 310 315 320

Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu
 340 345 350

<210> 5
 <211> 696
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> > CDS
 <222> (1)..(696)

10 <400> 5

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

48

cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc 96
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg 144
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg 192
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag 240
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag 288
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc 336
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc 384
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc 432
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc 480
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac 528
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac 576
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc 624
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag 672
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga 696
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 225 230

<210> 6
 <211 > 231
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

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

<210> 7
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221 > CDS
 <222> (1)..(60)

<400 > 7

5

10

atg tac agg atg caa ctc ctg tct tgc att gca cta agt ctt gca ctt 48

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

gtc acg aat tca 60
Val Thr Asn Ser 20

<210> 8

<211> > 20

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

10 <210> 9

<211> 1197

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> > CDS

<222> (1)..(1197)

<400> 9

atg agg ctt cgg gag ccg ctc ctg agc ggc agc gcc gcg atg cca ggc 48
Met Arg Leu Arg Glu Pro Leu Leu Ser Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly 1 5 10 15

gcg tcc cta cag cgg gcc tgc cgc ctg ctc gtg gcc gtc tgc gct ctg 96
Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu 20 25 30

cac ctt ggc gtc acc ctc gtt tac tac ctg gct ggc cgc gac ctg agc 144
His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Ser 35 40 45

cgc ctg ccc caa ctg gtc gga gtc tcc aca ccg ctg cag ggc ggc tcg 192
Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Gly Ser 50 55 60

aac agt gcc gcc gcc atc ggg cag tcc tcc ggg gag ctc cgg acc gga 240
Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu Arg Thr Gly 65 70 75 80

ggg gcc cgg ccg ccg cct cct cta ggc gcc tcc tcc cag ccg cgc ccg 288
Gly Ala Arg Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln Pro Arg Pro 85 90 95

ggt ggc gac tcc agc cca gtc gtg gat tct ggc cct ggc ccc gct agc 336
Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly Pro Ala Ser 100 105 110

aac ttg acc tcg gtc cca gtg ccc cac acc acc gca ctg tcg ctg ccc 384
Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu Pro 115 120 125

gcc tgc cct gag gag tcc ccg ctg ctt gtg ggc ccc atg ctg att gag 432
Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu

20

130	135	140	
ttt aac atg cct gtg gac ctg gag ctc gtg gca aag cag aac cca aat Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn 145 150 155 160			480
gtg aag atg ggc ggc cgc tat gcc ccc agg gac tgc gtc tct cct cac Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His 165 170 175			528
aag gtg gcc atc atc att cca ttc cgc aac cgg cag gag cac ctc aag Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys 180 185 190			576
tac tgg cta tat tat ttg cat cca gtc ctg cag cgc cag cag ctg gac Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu Asp 195 200 205			624
tat ggc atc tat gtt atc aac cag gcg gga gac act ata ttc aat cgt Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe Asn Arg 210 215 220			672
gct aag ctc ctc aat gtt ggc ttt caa gaa gcc ttg aag gac tat gac Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr Asp 225 230 235 240			720
tac acc tgc ttt gtg ttt agt gac gtg gac ctc att cca atg aat gac Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn Asp 245 250 255			768
cat aat gcg tac agg tgt ttt tca cag cca cgg cac att tcc gtt gca His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala 260 265 270			816
atg gat aag ttt gga ttc agc cta cct tat gtt cag tat ttt gga ggt Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly Gly 275 280 285			864
gtc tct gct cta agt aaa caa cag ttt cta acc atc aat gga ttt cct Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe Pro 290 295 300			912
aat aat tat tgg ggc tgg gga gga gaa gat gat gac att ttt aac aga Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe Asn Arg 305 310 315 320			960
tta gtt ttt aga ggc atg tct ata tct cgc cca aat gct gtg gtc ggg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val Val Gly 325 330 335			1008
agg tgt cgc atg atc cgc cac tca aga gac aag aaa aat gaa ccc aat Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu Pro Asn 340 345 350			1056
cct cag agg ttt gac cga att gca cac aca aag gag aca atg ctc tct Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser 355 360 365			1104
gat ggt ttg aac tca ctc acc tac cag gtg ctg gat gta cag aga tac Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr 370 375 380			1152
cca ttg tat acc caa atc aca gtg gac atc ggg aca ccg agc tag Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser 385 390 395			1197

<210> 10
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

5

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

His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala
 260 265 270

Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly Gly
 275 280 285

Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe Pro
 290 295 300

Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe Asn Arg
 305 310 315 320

Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val Val Gly
 325 330 335

Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu Pro Asn
 340 345 350

Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser
 355 360 365

Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr
 370 375 380

Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser
 385 390 395

<210 > 11
 <211> 1128
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<220>
 <221 > CDS
 <222> (1)..(1128)

10 <400> 11

atg gga ctc ttg gta ttt gtg cgc aat ctg ctg cta gcc ctc tgc ctc	48
Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu	
1 5 10 15	
ttt ctg gta ctg gga ttt ttg tat tat tct gcg tgg aag cta cac tta	96
Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu	
20 25 30	
ctc cag tgg gag gag gac tcc aat tca gtg gtt ctt tcc ttt gac tcc	144
Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Asn Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser	
35 40 45	
gct gga caa aca cta ggc tca gag tat gat cgg ttg ggc ttc ctc ctg	192
Ala Gly Gln Thr Leu Gly Ser Glu Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu	
50 55 60	
aat ctg gac tct aaa ctg cct gct gaa tta gcc acc aag tac gca aac	240
Asn Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn	
65 70 75 80	

ttt tca gag gga gct tgc aag cct ggc tat gct tca gcc ttg atg acg	288
Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr	
85 90 95	
gcc atc ttc ccc cgg ttc tcc aag cca gca ccc atg ttc ctg gat gac	336
Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp	
100 105 110	
tcc ttt cgc aag tgg gct aga atc cgg gag ttc gtg ccg cct ttt ggg	384
Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly	
115 120 125	
atc aaa ggt caa gac aat ctg atc aaa gcc atc ttg tca gtc acc aaa	432
Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile Leu Ser Val Thr Lys	
130 135 140	
gag tac cgc ctg acc cct gcc ttg gac agc ctc cgc tgc cgc cgc tgc	480
Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys	
145 150 155 160	
atc atc gtg ggc aat gga ggc gtt ctt gcc aac aag tct ctg ggg tca	528
Ile Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala Asn Lys Ser Leu Gly Ser	
165 170 175	
cga att gac gac tat gac att gtg gtg aga ctg aat tca gca cca gtg	576
Arg Ile Asp Asp Tyr Asp Ile Val Val Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val	
180 185 190	
aaa ggc ttt gag aag gac gtg ggc agc aaa acg aca ctg cgc atc acc	624
Lys Gly Phe Glu Lys Asp Val Gly Ser Lys Thr Thr Leu Arg Ile Thr	
195 200 205	
tac ccc gag ggc gcc atg cag cgg cct gag cag tac gag cgc gat tct	672
Tyr Pro Glu Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu Gln Tyr Glu Arg Asp Ser	
210 215 220	
ctc ttt gtc ctc gcc ggc ttc aag tgg cag gac ttt aag tgg ttg aaa	720
Leu Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln Asp Phe Lys Trp Leu Lys	
225 230 235 240	
tac atc gtc tac aag gag aga gtg agt gca tgc gat ggc ttc tgg aaa	768
Tyr Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Ala Ser Asp Gly Phe Trp Lys	
245 250 255	
tct gtg gcc act cga gtg ccc aag gag ccc cct gag att cga atc ctc	816
Ser Val Ala Thr Arg Val Pro Lys Glu Pro Pro Glu Ile Arg Ile Leu	
260 265 270	
aac cca tat ttc atc cag gag gcc gcc ttc acc ctc att ggc ctg ccc	864
Asn Pro Tyr Phe Ile Gln Glu Ala Ala Phe Thr Leu Ile Gly Leu Pro	
275 280 285	
ttc aac aat ggc ctc atg ggc cgg ggg aac atc cct acc ctt ggc agt	912
Phe Asn Asn Gly Leu Met Gly Arg Gly Asn Ile Pro Thr Leu Gly Ser	
290 295 300	
gtg gca gtg acc atg gca cta cac ggc tgt gac gag gtg gca gtc gca	960
Val Ala Val Thr Met Ala Leu His Gly Cys Asp Glu Val Ala Val Ala	
305 310 315 320	
gga ttt ggc tat gac atg agc aca ccc aac gca ccc ctg cac tac tat	1008
Gly Phe Gly Tyr Asp Met Ser Thr Pro Asn Ala Pro Leu His Tyr Tyr	
325 330 335	
gag acc gtt cgc atg gca gcc atc aaa gag tcc tgg acg cac aat atc	1056
Glu Thr Val Arg Met Ala Ala Ile Lys Glu Ser Trp Thr His Asn Ile	
340 345 350	

cag cga gag aaa gag ttt ctg cgg aag ctg gtg aaa gct cgc gtc atc 1104
 Gln Arg Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys Leu Val Lys Ala Arg Val Ile
 355 360 365

act gat cta agc agt ggc atc tga 1128
 Thr Asp Leu Ser Ser Gly Ile
 370 375

<210> 12
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 12

Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu
 20 25 30

Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Asn Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser
 35 40 45

Ala Gly Gln Thr Leu Gly Ser Glu Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu
 50 55 60

Asn Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn
 65 70 75 80

Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr
 85 90 95

Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp
 100 105 110

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

Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile Leu Ser Val Thr Lys
 130 135 140

Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys
 145 150 155 160

Ile Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala Asn Lys Ser Leu Gly Ser
 165 170 175

Arg Ile Asp Asp Tyr Asp Ile Val Val Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val
 180 185 190

Lys Gly Phe Glu Lys Asp Val Gly Ser Lys Thr Thr Leu Arg Ile Thr
 195 200 205

Tyr Pro Glu Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu Gln Tyr Glu Arg Asp Ser
 210 215 220

Leu Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln Asp Phe Lys Trp Leu Lys
 225 230 235 240

Tyr Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Ala Ser Asp Gly Phe Trp Lys
 245 250 255

Ser Val Ala Thr Arg Val Pro Lys Glu Pro Pro Glu Ile Arg Ile Leu
 260 265 270

Asn Pro Tyr Phe Ile Gln Glu Ala Ala Phe Thr Leu Ile Gly Leu Pro
 275 280 285

Phe Asn Asn Gly Leu Met Gly Arg Gly Asn Ile Pro Thr Leu Gly Ser
 290 295 300

Val Ala Val Thr Met Ala Leu His Gly Cys Asp Glu Val Ala Val Ala
 305 310 315 320

Gly Phe Gly Tyr Asp Met Ser Thr Pro Asn Ala Pro Leu His Tyr Tyr
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Met Ala Ala Ile Lys Glu Ser Trp Thr His Asn Ile
 340 345 350

Gln Arg Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys Leu Val Lys Ala Arg Val Ile
 355 360 365

Thr Asp Leu Ser Ser Gly Ile
 370 375

- <210> 13
- <211> 1722
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

5

- <220>
- <221> > CDS
- <222> (1)..(1722)

10

<400> 13
 tta gtt gag gat acc aca tta gag cca gaa gag cca cca act aaa tac 48
 Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr
 1 5 10 15
 caa atc tct caa cca gaa gtg tac gtg gct gca cca ggg gag tcg cta 96
 Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu
 20 25 30
 gag gtg cgc tgc ctg ttg aaa gat gcc gcc gtg atc agt tgg act aag 144
 Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys
 35 40 45

gat Asp	ggg Gly 50	gtg Val	cac His	ttg Leu	ggg Gly	ccc Pro 55	aac Asn	aat Asn	agg Arg	aca Thr	gtg Val 60	ctt Leu	att Ile	ggg Gly	gag Glu	192
tac Tyr 65	ttg Leu	cag Gln	ata Ile	aag Lys	ggc Gly 70	gcc Ala	acg Thr	cct Pro	aga Arg	gac Asp 75	tcc Ser	ggc Gly	ctc Leu	tat Tyr	gct Ala 80	240
tgt Cys	act Thr	gcc Ala	agt Ser	agg Arg 85	act Thr	gta Val	gac Asp	agt Ser	gaa Glu 90	act Thr	tgg Trp	tac Tyr	ttc Phe	atg Met 95	gtg Val	288
aat Asn	gtc Val	aca Thr	gat Asp 100	gcc Ala	atc Ile	tca Ser	tcc Ser	gga Gly 105	gat Asp	gat Asp	gag Glu	gat Asp	gac Asp 110	acc Thr	gat Asp	336
ggc Gly	gcg Ala	gaa Glu 115	gat Asp	ttt Phe	gtc Val	agt Ser	gag Glu 120	aac Asn	agt Ser	aac Asn	aac Asn	aag Lys 125	aga Arg	gca Ala	cca Pro	384
tac Tyr 130	tgg Trp	acc Thr	aac Asn	aca Thr	gaa Glu	aag Lys 135	atg Met	gaa Glu	aag Lys	cgg Arg	ctc Leu 140	cat His	gct Ala	gtg Val	cct Pro	432
gcg Ala 145	gcc Ala	aac Asn	act Thr	gtc Val	aag Lys 150	ttt Phe	cgc Arg	tgc Cys	cca Pro	gcc Ala 155	ggg Gly	ggg Gly	aac Asn	cca Pro	atg Met 160	480
cca Pro	acc Thr	atg Met	cgg Arg	tgg Trp 165	ctg Leu	aaa Lys	aac Asn	ggg Gly	aag Lys 170	gag Glu	ttt Phe	aag Lys	cag Gln	gag Glu 175	cat His	528
cgc Arg	att Ile	gga Gly	ggc Gly 180	tac Tyr	aag Lys	gta Val	cga Arg	aac Asn 185	cag Gln	cac His	tgg Trp	agc Ser	ctc Leu 190	att Ile	atg Met	576
gaa Glu	agt Ser	gtg Val 195	gtc Val	cca Pro	tct Ser	gac Asp	aag Lys 200	gga Gly	aat Asn	tat Tyr	acc Thr	tgt Cys 205	gtg Val	gtg Val	gag Glu	624
aat Asn	gaa Glu 210	tac Tyr	ggg Gly	tcc Ser	atc Ile	aat Asn 215	cac His	acg Thr	tac Tyr	cac His	ctg Leu 220	gat Asp	gtt Val	gtg Val	gag Glu	672
cga Arg 225	tcg Ser	cct Pro	cac His	cgg Arg	ccc Pro 230	atc Ile	ctc Leu	caa Gln	gcc Ala	gga Gly 235	ctg Leu	ccg Pro	gca Ala	aat Asn	gcc Ala 240	720
tcc Ser	aca Thr	gtg Val	gtc Val	gga Gly 245	gga Gly	gac Asp	gta Val	gag Glu	ttt Phe 250	gtc Val	tgc Cys	aag Lys	gtt Val	tac Tyr 255	agt Ser	768
gat Asp	gcc Ala	cag Gln	ccc Pro 260	cac His	atc Ile	cag Gln	tgg Trp	atc Ile 265	aag Lys	cac His	gtg Val	gaa Glu	aag Lys 270	aac Asn	ggc Gly	816
agt Ser	aaa Lys	tac Tyr 275	ggg Gly	ccc Pro	gac Asp	ggg Gly	ctg Leu 280	ccc Pro	tac Tyr	ctc Leu	aag Lys	gtt Val 285	ctc Leu	aag Lys	gcc Ala	864
gcc Ala	ggc Gly 290	ggt Val	aac Asn	acc Thr	acg Thr	gac Asp 295	aaa Lys	gag Glu	att Ile	gag Glu	gtt Val 300	ctc Leu	tat Tyr	att Ile	cgg Arg	912
aat Asn 305	gta Val	act Thr	ttt Phe	gag Glu	gac Asp 310	gct Ala	ggg Gly	gaa Glu	tat Tyr	acg Thr 315	tgc Cys	ttg Leu	gcg Ala	ggt Gly	aat Asn 320	960

tct att ggg ata tcc ttt cac tct gca tgg ttg aca gtt ctg cca gcg 1008
 Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala
 325 330 335

cct gga aga gaa aag gag att aca gct tcc cca gac aaa act cac aca 1056
 Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Lys Thr His Thr
 340 345 350

tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc 1104
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 355 360 365

ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct 1152
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 370 375 380

gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gcc gtg agc cac gaa gac cct gag gtc 1200
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 385 390 395 400

aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca 1248
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 405 410 415

aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc 1296
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 420 425 430 435

ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc 1344
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 435 440 445

aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc 1392
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 450 455 460

aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca 1440
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 465 470 475 480

tcc ccg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc 1488
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 485 490 495

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg 1536
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 500 505 510

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac 1584
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 515 520 525

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

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

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga 1722
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 565 570

<210> 14
 <211> 573
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 14

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

Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly
 260 265 270
 Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala
 275 285
 Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg
 290 295 300
 Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn
 305 310 315 320
 Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Lys Thr His Thr
 340 345 350
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 355 360 365
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 370 375 380
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 385 390 395 400
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 405 410 415
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 420 425 430
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 435 440 445
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 450 455 460
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 465 470 475 480
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 485 490 495
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 500 505 510
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 515 520 525

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
530 535 540

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
545 550 555 560

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570

REIVINDICACIONES

1. Una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada que comprende una fusión de un fragmento o dominio soluble de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde el número promedio de ácido siálico por N-glicano del resto receptor para FGF es 0,9 o superior.
- 5 2. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 1, en donde el número promedio es ácido siálico por N-glicano del resto receptor para FGF es 1,2 o superior.
3. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 1 o 2, en donde como mucho el 45% de los N-glicanos de dicho resto receptor para FGF no tiene grupo sialilo.
- 10 4. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos el 5° sitio de N-glicosilación del resto receptor para FGF está ocupado.
5. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 4, en donde, además, los sitios 3°, 4°, 6° y 7° de glicosilación del resto receptor para FGF están ocupados.
6. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 5, en donde al menos 7 sitios de N-glicosilación del resto receptor para FGF están ocupados.
- 15 7. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 6, en donde todos los sitios de N-glicosilación del resto receptor para FGF están ocupados.
8. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquier reivindicación anterior, en donde el valor K_D de dicha fusión para FGF2 medido por Biacore™ está comprendido entre 1 y 5 nM
- 20 9. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 8, en donde el valor K_D de dicha fusión para FGF2 medida por Biacore™ es alrededor de 1,5 nM.
10. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha fusión posee actividades ADCC y/o CDC.
11. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los N-glicanos de dicha fusión están fucosilados al 60-100%.
- 25 12. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada comprende 3 residuos de manosa, una media de 1,5 a 3,0 residuos de galactosa, una media de 3,5 a 5 residuos de N-acetilglucosamina, y una media de 0,6 a 1 residuos de fucosa por molécula de glicano.
- 30 13. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde los N-glicanos de dicha fusión están fucosilados al 0-60%.
14. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el receptor para FGF se selecciona entre receptor para FGF 1 (FGFR1) o receptor para FGF 2 (FGFR2).
- 35 15. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el receptor para FGF se selecciona entre isotipo IIIc de receptor para FGF 1 e isotipo IIIc de receptor para FGF 2.
16. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dominio soluble de receptor para FGF tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 4, o bien una secuencia que tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO: 4.
- 40 17. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la parte Fc tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 6, o bien una secuencia que tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO: 6.
18. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada comprende además una secuencia enlazadora de al menos 3 residuos aminoácido.
- 45 19. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 18, en donde la secuencia enlazadora es SAL (Ser-Ala-Leu).
20. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada tiene una secuencia polipeptídica como se expone en SEQ ID NO: 2, o una secuencia que tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO: 2.

21. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada comprende además el péptido señal de SEQ ID
22. Una célula huésped que comprende (i) un ácido nucleico que codifica el receptor para FGF de fusión modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, (ii) un ácido nucleico que codifica α -1,4-galactosiltransferasa y (iii) un ácido nucleico que codifica β -2,3-sialiltransferasa.
23. La célula huésped según la reivindicación 22, en donde dicho ácido nucleico que codifica el receptor para FGF de fusión modificado comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 80% de identidad con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.
24. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, como un medicamento.
25. Una composición farmacéutica que comprende un receptor para FGF de fusión modificado, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.
26. La composición farmacéutica según la reivindicación 25, en donde dicha composición contiene un agente terapéutico adicional.
27. La composición farmacéutica según la reivindicación 26, en donde dicho agente terapéutico adicional es un agente anti-angiogénico o un agente quimioterapéutico.
28. La composición farmacéutica según la reivindicación 27, en donde dicho agente anti-angiogénico es un factor de necrosis tumoral, o un antagonista de un factor de crecimiento fibroblástico (FGF) ácido o básico, factor de crecimiento hepatocítico (HGF), factor tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o receptor HER2.
29. La composición farmacéutica según la reivindicación 27, en donde dicho agente quimioterapéutico se selecciona del grupo: agentes antimicrotúbulos; complejos de coordinación con platino; agentes alquilantes; agentes antibióticos; inhibidores de topoisomerasa II; antimetabolitos; inhibidores de topoisomerasa I; hormonas y análogos de hormonas; inhibidores de la ruta de transducción de señal: inhibidores de angiogénesis de tipo distinto al de receptor de tirosina-quinasa; agentes inmunoterapéuticos; agentes pro-apoptóticos; e inhibidores de la señalización del ciclo celular.
30. La composición farmacéutica según la reivindicación 27, en donde dicho agente quimioterapéutico se selecciona del grupo de taxol y taxotere.
31. Una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para usar en el tratamiento de cáncer.
32. Una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 31 en asociación con un agente terapéutico adicional.
33. Una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 32, en donde dicho agente terapéutico adicional es un agente anti-angiogénico o un agente quimioterapéutico.
34. Una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 33, en donde dicho agente anti-angiogénico es un factor de necrosis tumoral, o un antagonista de un factor de crecimiento fibroblástico (FGF) ácido o básico, factor de crecimiento hepatocítico (HGF), factor tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o receptor HER2.
35. Una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 33, en donde dicho agente quimioterapéutico se selecciona del grupo: agentes antimicrotúbulos; complejos de coordinación con platino; agentes alquilantes; agentes antibióticos; inhibidores de topoisomerasa II; antimetabolitos; inhibidores de topoisomerasa I; hormonas y análogos de hormonas; inhibidores de la ruta de transducción de señal; inhibidores de angiogénesis de tipo distinto al de receptor de tirosina quinasa; agentes inmunoterapéuticos; agentes pro-apoptóticos; e inhibidores de la señalización del ciclo celular.
36. Una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 33, en donde dicho agente quimioterapéutico se selecciona del grupo de taxol y taxotero.
37. Una fusión Fc con receptores para FGF soluble modificada según la reivindicación 31, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo de carcinoma, que incluye el de vejiga, mama, colon, cabeza y cuello, riñón, que incluye carcinoma de células renales, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello de útero, tiroides y piel; que incluye carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de trazado linfático, que incluye leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de trazado mielóide, incluidos leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, que

incluyen melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xeroderma pigmentoso, keratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

- 5 38. Una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según la reivindicación 37, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo de melanoma, leucemia, cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama y cáncer de cabeza y cuello.
- 10 39. El proceso de preparación de una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que consiste en cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 22 o 23 y en cosechar la proteína secretada.

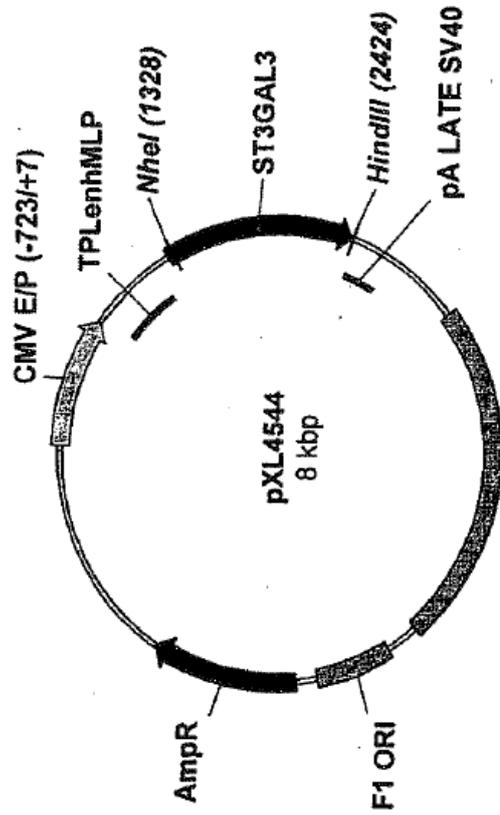


Fig. 1A

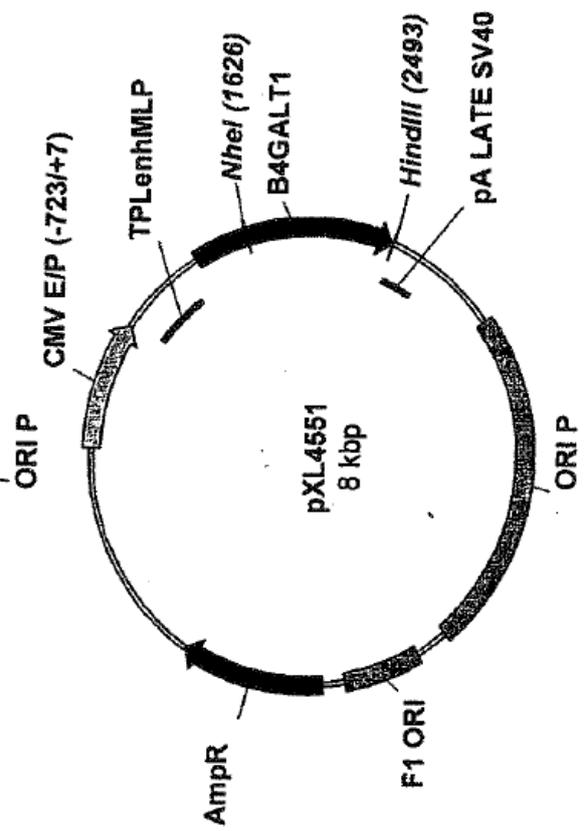


Fig. 1B

Fig. 2A

1281 ATGAGG CTTGGGAGC CGCTCCTGAG CGGCAGCGCC GCGATGCCAG GCGGTCCCT ACAGGGGGC
 TACTCC GAAGCCCTCG GCGAGGACTC GCGGTGCGG CGGTACCGTC CCGCAGGGA TGTCGCCCGG
 1361 TGCCGCTGC TGTGGCCGT CTGCGCTCG CACCTTGGG TCACCTCGT TTACTACCTG CTTGGCCGGC ACCTGAGCCG
 ACGGGGACC ACCACGGCA GACGGAGAC GTGGAAACCG AGTGGAGCA AATGATGGAC CGACCGGGC TGACTCGGC
 1441 CCTGCCCAA CTGGTCGGAG TCTCCACACC GCTCAGGCC GGCTCGAACA GTCCGCCCG CATCGGGCAG TCTCCGGGG
 GGACGGGTT GACCAGCCTC AGAGTGTGG CGACGTCCCG CCGAGCTTGT CACGGCGGG GTAGCCCGTC AGGAGGCCC
 1521 AGCTCCGGAC CGGAGGGCC CCGCCCGCC CTCTCTAGG CGCTCTCC CAGCCCGCC CCGTGGCGA CTCCAGCCCA
 TCGAGGCCG GCCTCCCGG CCGCGGGGG GAGGAGTCC CCGGAGGAG GTCCGGCGGG GCCCACCGCT GAGTCTGGT
 1601 GTGTGGATT CTGGCCCTGG CCCCCTAGC AACTGACCT CCGTCCCAAT GCCCACACAC ACCCGACTGT CGCTGCCCG
 CAGACCTAA GACCGGACC GGGGGATCG TTGAACCTGA SCCAGGCTCA CCGGTGTGG TGGCCTGACA GCGACGGGG
 1681 CTGCCCTGAG GAGTCCCGC TGTCTGTGG CCCCATGCTG ATTGAGTTTA ACATGCTGT GGACCTGGG CTCGTGGCAA
 GACGGGACT CTCAGGGGG ACGAACRCC GGGGTACGAC TAATCAAT GTACGGACA CTTGGACCTC GAGCACCCT
 1761 AGCAGARCC AATGTGAG ATGGCGGGC GCTATGCCCC CAGGACTGC GTCTCTCTC ACAGGTGGC CATCATCAFT
 TCGTCTGGG TTACACTTC TACCAGGGG CAGTACGGG GTCCCTGACG CAGAGAGGAG TGTCCACCG GTAGTAGTAA
 1841 CCATTCGCA ACCGCGAGG GACCTCAG TACTGGCTAT ATTATTGCA YCCAGTCTG CAGCGCCAGC AGCTGGACTA
 GGTAAAGCGT TGGCCGCTC CGTGAGTTC ATGACCGATA TAATAACGT RGGTCAGGAC GTCCGGCTCG TCGACCTGAT
 1921 TGGCATCTAT GTATCAACC AGGCGGGAGA CACTATATTC AATCGTCTA AGTCCCTCAA TGTGGCTTT CAAGAGCCCT
 ACCSTRGATA CAATAGTGG TCCGCCCTCT GTGATATAG TTAGCAGAT TCGAGGAGTT ACAACCGAAA GTTCTTCGGA
 2001 TGAAGGACTA TGACTACACC TGCCTTGTGT TTAGTGACCT GGACTCAAT CCAATGANTG ACCATAATGC GTACAGTGT
 ACTTCCTGAT ACTGANGTG ACCGACTGA ATCACTGCA CTTGAGTAA GTTACTTAC TGGTATPAC CATGTCCACA
 2081 TTTTCACAG CACGGCACH TTCCGTTGCA ATGATTAAG AACCTAATC GGTACTTAT GTTACTTAT TTGGAGTGT
 AATAGTTCG GTCCGCTGA AAGCAACCT TACCTATCA AACCTAATC GGTACTTAT GTTACTTAT TTGGAGTGT
 2161 CTCTGCTCA AGTAARCAAC AGTTTCTAAC CATCAATGGA TTTCTAATA ATTAATGGG CCAATGANTG AACCTAATC
 GAGACGAGT TCATTTGTTG TCAAGATTTG GTAGTACCT AAGGATAT TAATAACCC GACCCCTCT CTCTACTAC
 2241 ACATTTTAA CAGATTAGT TTTAGAGGCA TGTCTATATC TCGCCCAAT CTTGTGGTCC GAGGTGTCC CATGATCCCG
 TGTAAARAT GTCAATCA AATCTCCGT ACAGATATAG AGCGGTTTA CGACCCAGC CTTCCACAGC GTACTAGGCG
 2321 CACTCAGAG ACAGAAA AAGTCCCAT TGAACCCAT CCTCAGAGGT TTGACCGAAT TGCACACACA AAGGAGCAA TGTCTCTGA
 GTGAGTCTC TGTCTTTT ACTTGGGTTA GGAGTCTCCA AACTGGCTTA CCGTGTGTG TTCTCTGTT ACGGAGACT
 2401 TGTGTTGAC TCACTCACCT ACCAGGTGCT GGAATACAG AGATACCCAT TGTATACCA AATCAGATG GACATCGGGA
 ACCAAACTG AGTGAGTGA TGGTCCNOGA CCTACATGTC TCTATGGGTA ACATATGGGT TTAGTCTCAC CTGTAGCCCT
 2481 CACCGACTA G
 GTGGCTCGAT C

Fig. 2B

1 MRRLREPLLSG SAAMPGASLQ RACRLLLVAVC ALHLGVTLVY YLAGRDLRL
 51 PQLVGVSTPL QGGSNSAAA QSSGELRTG GARPPPLGA SQPRPQGGDS
 101 SPVVDGPGP ASNLTSVVP HTALSLPAC PEESPLLVG MLIEFNMPVD
 151 LELVAKQNPV KMGGRYAP DCVSPHKVA IIPFRNROEH LKYNLYLHP
 201 VLORQQLDYG IYVINQAGDT IFNRKLLNV GFQALKDYD YTCVFSDDVD
 251 LIPMNDHNAY RCFSPRRHS VAMDKGFFSL PYVQYFGGVS ALSKQQLTI
 301 NGFPNNYWGW GGEDDDIFNR LVFERGMSISR PNAVVGRCRM IRHSRDKNE
 351 PNPQRFDRIA HTKETMLSDG LNSLTYQVLD VQRYPLYTQI TVDIGTTPS

Fig. 3A

1281 ATGGGA CTCTTGGTAT TTGTGGCAA TCTGCTGCTA GCCCTCTGCC TCCTTCTGGT ACTGGGATTT
 TACCCCT GAGAACCATTA AACACCGGTT AGACAGCGAT CGGGAGACGG AGAAGACCA TGACCCFARA
 1361 TTGTATTATT CTGGGTGGAA GCTACACTTA CTCCAGTGGG AGGAGGACTC CAATTCATCG GTTCTTTCCT TTGACTCCGC
 AACATAATAA GACGCACCTT CGATGTGAAT GAGGTACACC TCCTCTCTGAG GTTAACTCAC AAGAAAGGA AACTGAGGG
 1441 TGGACARAACA CTAGGCTCAG AGTATGATCG GTTGGGCTTC CTCTGAAATC TGGACTCPAA ACTGCCTGCT GAATTAAGCCA
 ACTGTTTTGT GATCCGAGTC TCATACTAGC CAACCCGAAG GAGGACTTAG ACCTGAGATT TGACGGACGA CTTAATCGGT
 1521 CCAAGTACGC AAACCTTTCA GAGGGAGCTT GCAAGCCCTGG CTATGCTTCA GCCTTGATGA CGCCCATCTT CCCCCTGTC
 GGTTCATGG TTTGANAAGT CTCCCTCGAA CGTTCGGACC GATACGAAGT CGGAACFAC TCCCGTAGAA GGGGGCCAAAG
 1601 TCCAAGCCAG CACCCATGTT CCTGGATGAC TCCCTTGGCA AGTGGGCTAG AATCCGGAG TTCTGTCGCG CTTTTGGGAT
 AGGTTCCGTC GTGGGTACAA' GCAACACTACTG AGSAAAGCGT TCACCCGATC TTAGGCCCTC AAGCAGCGG GAAAACCTA
 1681 CAAAGGTCAA GACAATCTGA TCAAGCCAT CTGTGACGTC ACCAAGAGT ACCGCCCTGAC CCCCTGCCCTT GACAGCCTCC
 GTTCCAGTT CTGTTAGACT AGTTTCGGTA GAACAGTCAAG TGGTTCCTCA TGGCGGACTG GGGACGGAAC CTGTCCGAGG
 1761 GCTGCCGCGG CTGCATCATC GTGGCAATG GAGGCGTTC TGCCAAACAAG TCTCTGGGT CACGAATTGA CGACTATGAC
 CGACGGCAGC GACGTAGTAG CACCCGTTAC CTCGCAAGA ACGGTTGTTT AGAGACCCCA GTGCTTACT GCTGATACTG
 1841 ATTGTGGTGA GACTGAATC AGCACCAAGT ABAAGGCTTG AGAAGGACGT GGGCAGCNA ACGACACTGC GCATCACCTA
 TAACACCAC CTGACTTAAG TCGTGTCCAC TTTCCGAAC TCTTCTCTCT TTGTCTCTGC CGGCTCAAG TGGCAGGACT
 1921 CCCCAGGGC GCGATGCAGC GCGCTAGCA GTCATCGCG CTAGAGAGA AACAGGACG GCCGAAGTTC ACCGTCTGA
 GGGCTCCCG CGGTACGTCG CCGGACTCGT CATGCTGGG CTAGAGAGTA CGCTTCTGGA AATCTGTGGC CACTCGAGTG
 2001 TTAAGTGGT GAAATACATC GTCTACAAGG AGAGAGTAG TGCATCGGAT CCGTAAGACCT ATTAGACCCG GTGAGCTCAC
 AATCACCAA CTTTATAGTAG CAGATGTCC TCTCTACAT ACCTATATT TCAITCCAGGA GCGCCCTTC ACCCTCATG GCCTGCCCTT
 2081 CCCAAGGAC CCCCAGGAT TCGAATCTC AACCCATATT TCAITCCAGGA AGTAGTCTT CCGGCGGAAG TGGAGTAAC CGGACGGAA
 GGGTCTCCG GGGACTCTA AGCTTAGGAG TTGGGTAATA AGTAGTCTT GCGAGTGGG CAGTACCAT GGCATAAC GGCTGTGACG
 2161 CAACAATGGC CTCATGGGC GGGGACAT CCCCCTGTA GGGATGGAA CCGTACACAC CACTGATGTA CCGATGCGG CCGACACTGC
 GTTGTACC GAGTACCCCG CCCCCTGTA GGGATGGAA CCGTACACAC CACTGATGTA CCGATGCGG CCGACACTGC
 2241 AGGTGGCAGT CGCAGGATTT GGCTATGACA TGAGCACACC CMAACGACCC CTGCACACT ATGAGACCGT TCGCATGGCA
 TCCACCGTCA GCGTCTAAA CCGATACTGT ACTCGTGG GTTGGTGGG GACGTGATGA TACTCTGGCA AGCGTACCCT
 2321 GCCATCAAG AGTCTGGAC GCACAATATC CAGCGAGAGA AAGGTTTCT CCGGAAGCTG GTGAAAGCTC GCGTCAFCAC
 CGGTAGTTTC TCAGGACCTG CGTGTATATAG GTCGCTCTCT TTCTCAAGA GCGCTTCGAC CACTTTCGAG CGCAGTAGTG
 2401 TGATCTAAGC AGTGGCATCT GA
 ACTAGATTCC TCACCGTAGA CT

Fig. 3B

1 MGLLVFVRNL LLALCLFLVL GFLYSAWKL HLLQWEEDSN SVVLSFDSAG
 51 QTLGSEYDRL GFLNLNLSKL PABLAKRYAN FSEGACKPGY ASALMTAIFP
 101 RESKPAPMFL DDSFRKWARI REFPVPPGKIQ QDNLIKAIL SVTKEYRLTP
 151 ALDSLRCRR IIVNGGVLA NKSLSRIDD YDIVVRLNSA PVKGFEXDVG
 201 SKTTLRITYP EGAMQRPEQY ERDSLFLVLAG FKQDFKWLK YIVYKERVSA
 251 SDGFWSKSVAT RVPKPEPEIR ILNPFYIQEA AFTLIGLFPN NGLMGRGNIP
 301 TLGSVAVTMA LHGCDEVAVA GFYDMSTPN APLHYIYETVR MNAIKESWTH
 351 NIQREKEFLR KLVKARVITD LSSGI

Fig. 4A

6241 ATGTACA GGATGCAACT CCTGCTTTGG ATTGCACTAA GTCTTGCACT
 TACATGT CCTAGGTTGA GGACAGNACG TAACTGTGAT CAGAACGTGA
 TGTACAGAAAT TCAATAGTGG AGGATACAC ATTAGAGCCA GAAGAGCCAC CAATAAATA CCANATCTCT CAACAGAAAG
 6321 ACAGTGTCTTA AGTAAATCAAC TCCATATGGTG TAAATCTGGT CTCTCGGTGG GTTGATTTAT GGTTTAGAGA GTTGGTCTTC
 TSTACGTGGC TGCACCAAGG GASTCGGTAG AGGTGCGTGG CCTGTTGAAA GAIGCCCGCC TGTACAGTTG GACTAAGGAT
 6401 ACATGACCG ACCTGGTCCC CTGAGCGATC TCCACGAC GACAACTTT CTACGCGCG ACTAGTCAAC CTGATTTCTA
 GGGTCCACT TGGGCCCAAA CAATAGACA GTGCTTATG GGGATACTT GCAGATBAAG GGGGCCACG CTAGAGACTC
 6481 CCCACGTG ACCCCGGGT CCAATCTGT CAGAAATAAC CCTCTNENA CGTCTATTC CCGCGTGG GATCTCTGAG
 6561 CGCCCTCAT GCTTGTACTG CTAGTACAGT TGTAGACAT GAACTTGGT ACTTCATGGT GAATGTCACA GATCCCATCT
 GCGGAGATA CGNACTGC GGTCACTCGT ACATCTGTCA TTTGATACCA CTTRACRAC CTRACAGT CTACGGTACT
 6641 CATCCGGAG TGTAGGAT GACACCGAT GTCCGAGA TTTTCTCAST GAGACAGTA ACAACNAGAG ACCACATAC
 GTAGGCTCT ACTACTCTTA CTGTGGTAC CAGCCCTCT AARACGTCA CTCTGTFCAT TGTGTTCTC TCGTGGTATG
 6721 TGAACACCA CAGAAAGAT GMAAAGCG GTCCATCTG TCCCTGCGC CMACCTGTC MAGTTCGGT GCCCAGCGCG
 ACCTGGTGT GTCTTTCTA CCTTTTGGC GAGGTACAC ACCGACCGG GTTGTACAG TTCAAAGGA CCGGTCCGGC
 6801 GGGAAACCA ATGCCARCCA TGCCTGGT GAGGTACAC CTTTTGCCC TCCCTCAAT TCGTCTCGT ACCGTACTC CGGTACTC
 6881 CCCCTTGGT TACGTTGGT AGCCACCGA CTTTTGCGT AAGTGTGT CCACTGAC AAGGMAAT ATACCTGTGT GGTGAGAAT
 6961 TAGAAACCA GCNCTGGAG CTCAATPAG GATVATPAC TTTCACACA GGTAGACTG TTCCCTTAA TATGACACA CCACCTCTTA
 GATCTTGGT CGTGACCTCG CACTCAACTA CACTTACAC CTGATPAG TCCATCTGAC AAGGMAAT ATACCTGTGT GGTGAGAAT
 7041 CTATGCCA GGTATTAAT GTGATGGT GACTTACAC ACCTCGCTAG CCGAGTGGC GGTAGACTG TCCCTTAA TATGACACA CCACCTCTTA
 GCGGCBAAT GCTCCACAG TGGTGGAG AGACFPAG TTTTCTGCA AGTFTACAG TGTAGTGGT TCCAGGAT GGTGAGAA
 7121 CGCCGTTTA GGAAGTGT ACCAGCTCC TCTGATCTC AAACAGCT TCCAAATGTC ACTACGGTC ACTACGGTC GGGTGTAGG
 AGTGGATCA GCACGTGGA ABAACCGCA GTAAATPAC GCGCACCGG CCGCACCGG TCCAAATGTC ACTACGGTC GGGTGTAGG
 7201 TCACCTAGT CTGACCTT TCTTGGCT CATTTAGC CCGCTCCG CCGCTACCG CCTACCGG TCAAGTCTT CANGGCTCG
 GTGTTAACA CCACGGACA AGATVAG GTTCTATA TTCGATGT ACTTTGAG GACGTGGG AATATAGCTG
 7281 CCAATGT GGTGCTGT TCTTACTA CAAGATAT AAGCTTACA TTGAAACTC CTGCGACG GCTTGAAGT TATATGAC
 CTGGGGGT AATCTATT GATATCTT TCACTGCA TGGTACAG TTCTGCGAG TCTGCGAG GCTTGAAGT TATATGAC
 7361 GAACCCCA TTAGATPAC CTTATAGAA AGTACACT ACCACTGTC ABAACTACA CAGTCCACC GTGCCACG
 TTAGACTTC CCGACTAC CTGTACCG CTAGGCCAA ATCTGTGAC ABAACTACA CAGTCCACC GTGCCACG
 7441 AATGCGRAG GGGTCTGAT GACAGTGG ATCTGGGT TAGRACACT TTTTGTAGT GTACGGTGG CACGGTCTGT
 CTTGACTCC TGGGGGACC GTCACTTTC CTCTCCCG CANAACCCA GGACCCCTC ATGATCTCC GACCCCTGA
 7521 GGACTTGG ACCCCCTGG CNETCAGAG GAGAGGGG GTTTGGGT CBTGTGGG TACTAGAGG CBTGGGACT
 CCACTGAC GACACACC TGCNCTGGT GCTTCTGGA CTCAGTCA AGTACCAT GCACCTGG CACCTCCAG
 7601 ATATGCCAA GACAAAGCG CGSAGGAG AGTACAAC CAGCTACCGT GTGTACGG TCCITACCGT CBTGGGACT
 TATTAGGTT CTGTTTGGC GCGCTCTCG TCAITGTC GTCAAGGCA CACAGTGG AGAGTGGCA GACCTCCAG
 7681 GACTGGTA ATGGCANGA GTACANGT CAGTCTCA ARAAGCCCT CCAAGCCCT CCAAGCCCT CCAAGCCCT
 CTGACCGACT TACCTTCT CATGTTTACG TTCCAGGAT TGTTCGGG GGTTCGGG TAGCTCTT GGTAGAGT
 7761 AGCCMAGG DAGCCCGAG AACCACAGT GTACACTG CCCCCTCC GGGTACGT GACCAAGAC CAGTCCAGC
 TCGGTTCC CTCGGGCT TTGTGTCCA CATGTGGAC GGGGTAGG CCTTCTGCA CTGGTCTG GTCAGTGG
 7841 TGACTGCT GTEPARAG TTTATCCCA GGCATPCC CGTGGATGG GCGACANTG GCGACCGA GACACTTAC
 ACTGGAGA CAGTTTCC AAGTATGG CCGTATGG CACTTACG CTCTCTTAC CCGTGGCT CTCTTATG
 7921 AAGACCAC CTCCTGCT GACTCCGAC GCTCTTCT TCCCTACAG CAGCTACC CAGTCCAG GTCAGTGG
 TCTGTGGC GAGGCACGA CTTGAGCT CCGAGAGA AGGATGTC GTTCAGTGG CACTGTCT CBTCCAGC
 8001 GCAGGGMAC GTCTTCTCAT GCTCCGAT GATGAGGT CTGCACACC ACTACAGCA GANAGCCCT TCCCTGTCT
 CBTCCCTTG CAGAAAGTA CGAGGACTA CBTACTCCA GACGTGTGG TGTGTGGT CTTCTCGAG AGGACAGAG
 8081 CGGGTTGA GCGCBACT

Fig. 4B

1
 51
 101
 151
 201
 251
 301
 351
 401
 451
 501
 551

LVEDTTLEPE EPPTYQISQ PEVYVAAPGE SLEVRCLLKD AAVISWTKDG
 VHLPNNRTV LIGEYLIQIG ATPRDSGLYA CTASRTVDSE TWYFMVNVTD
 AISSGDDDD TDGAEDFVSE NSNNKRAPIW TTEKMEKRL HAVPAANTVK
 FRCPAGGNPM PTMRWLKNGK EFKQEHRIIG YKVRNQHWLS IMESVVP SDK
 GNYTCVWENE YGSINHYYHL DVVERSHRP ILOAGLPANA STVGGDVEF
 VCKVYSDAQP HIQWIKHVEK NGSKYGPDLG PVLKVLKAAG VNTTDEIEV
 LYIRNVTFED AGEYTCLAGN SIGISFHSW LTVLPAAGRE KEITASPDYL
 SALEPKSCDK THTCPFPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
 VDVVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
 WLNCKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYITLP PSRDELTKNQ
 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPFVLDSDG SFELYSKLTV
 DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPG

Fig. 4C

1
 51
 101
 151
 201
 251
 301

LVEDTTLEPE EPPTYQISQ PEVYVAAPGE SLEVRCLLKD AAVISWTKDG
 VHLPNNRTV LIGEYLIQIG ATPRDSGLYA CTASRTVDSE TWYFMVNVTD
 AISSGDDDD TDGAEDFVSE NSNNKRAPIW TTEKMEKRL HAVPAANTVK
 FRCPAGGNPM PTMRWLKNGK EFKQEHRIIG YKVRNQHWLS IMESVVP SDK
 GNYTCVWENE YGSINHYYHL DVVERSHRP ILOAGLPANA STVGGDVEF
 VCKVYSDAQP HIQWIKHVEK NGSKYGPDLG PVLKVLKAAG VNTTDEIEV
 LYIRNVTFED AGEYTCLAGN SIGISFHSW LTVLPAAGRE KEITASPDYL

Fig. 4D

1
 51
 101
 151
 201

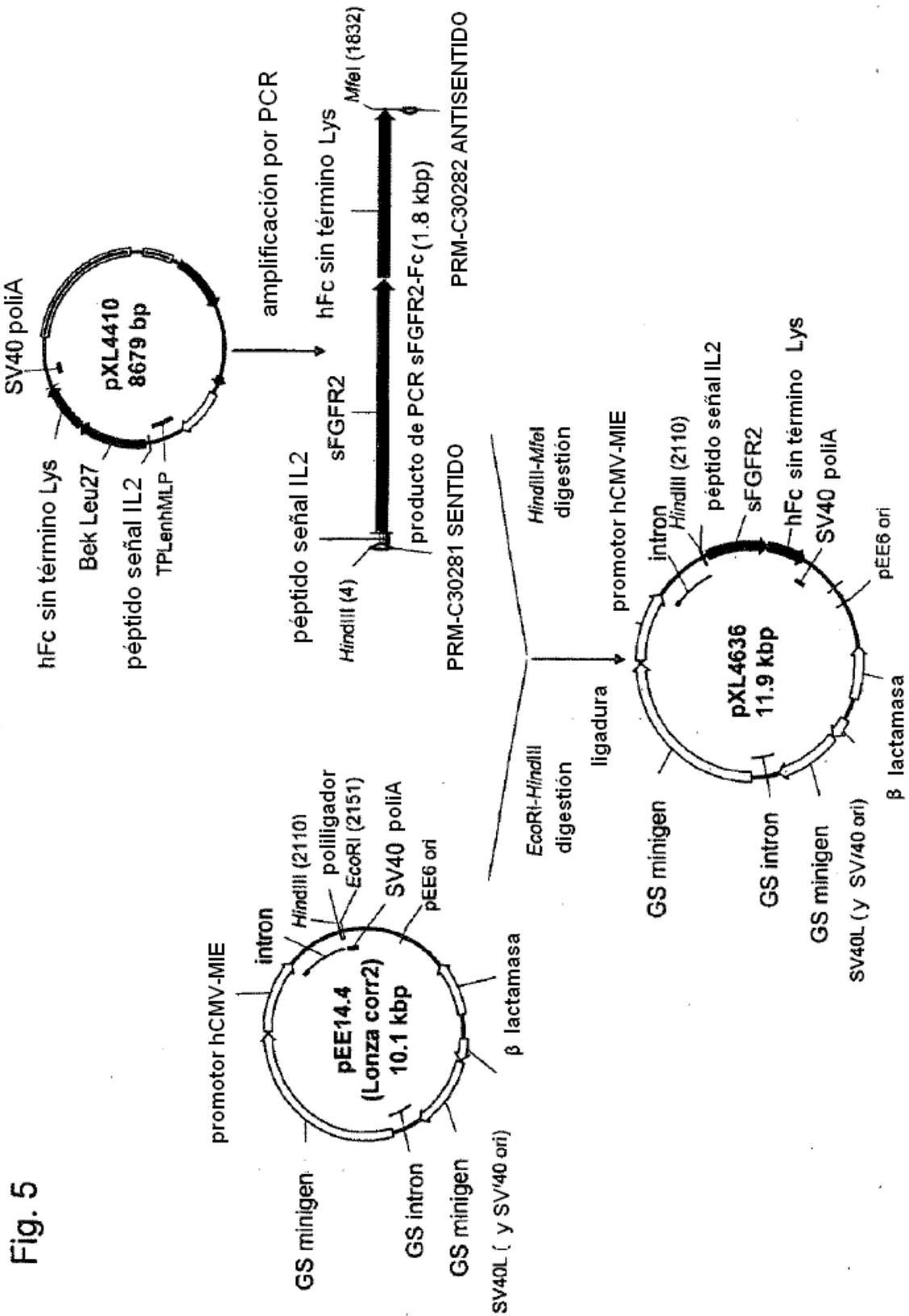
EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVWVD
 VSHEDPEVKE NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDMLN
 GKEYCKVSN KALPAPIKT ISKAKQPRE PQVYITLPPSR DELTKNQVSL
 TCLVKGFYPS DIAVWESNG QPENNYKTPP PVLDSGSGFF LYSKLTVDKS
 RWQQGNVESC SVMHEALHNN YTKSLSLSP G

Fig. 4E

1 SAL

Fig. 4F

1 MYRQLLSICI ALSIALVTNS



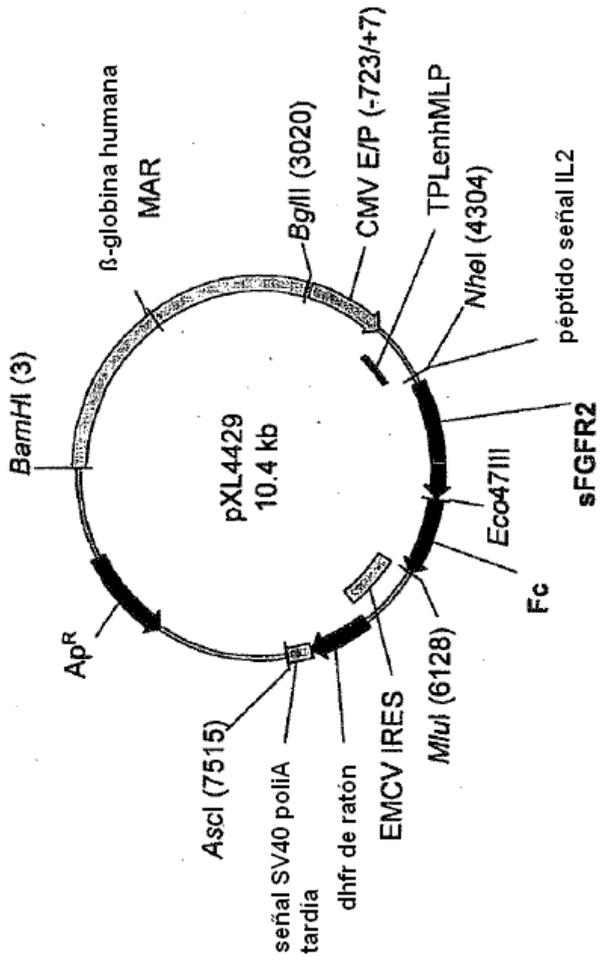


Fig. 6A

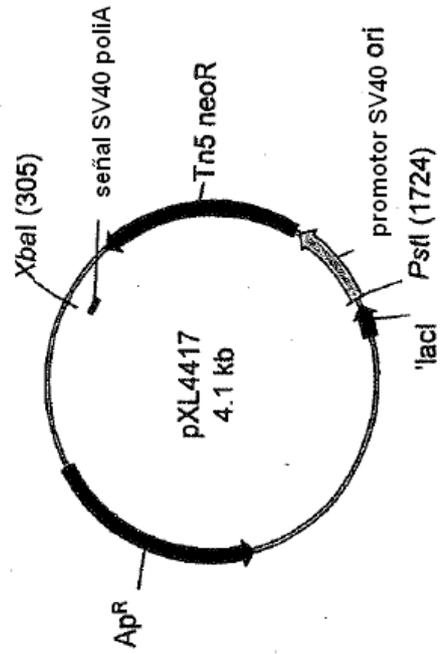


Fig. 6B

Fig. 7

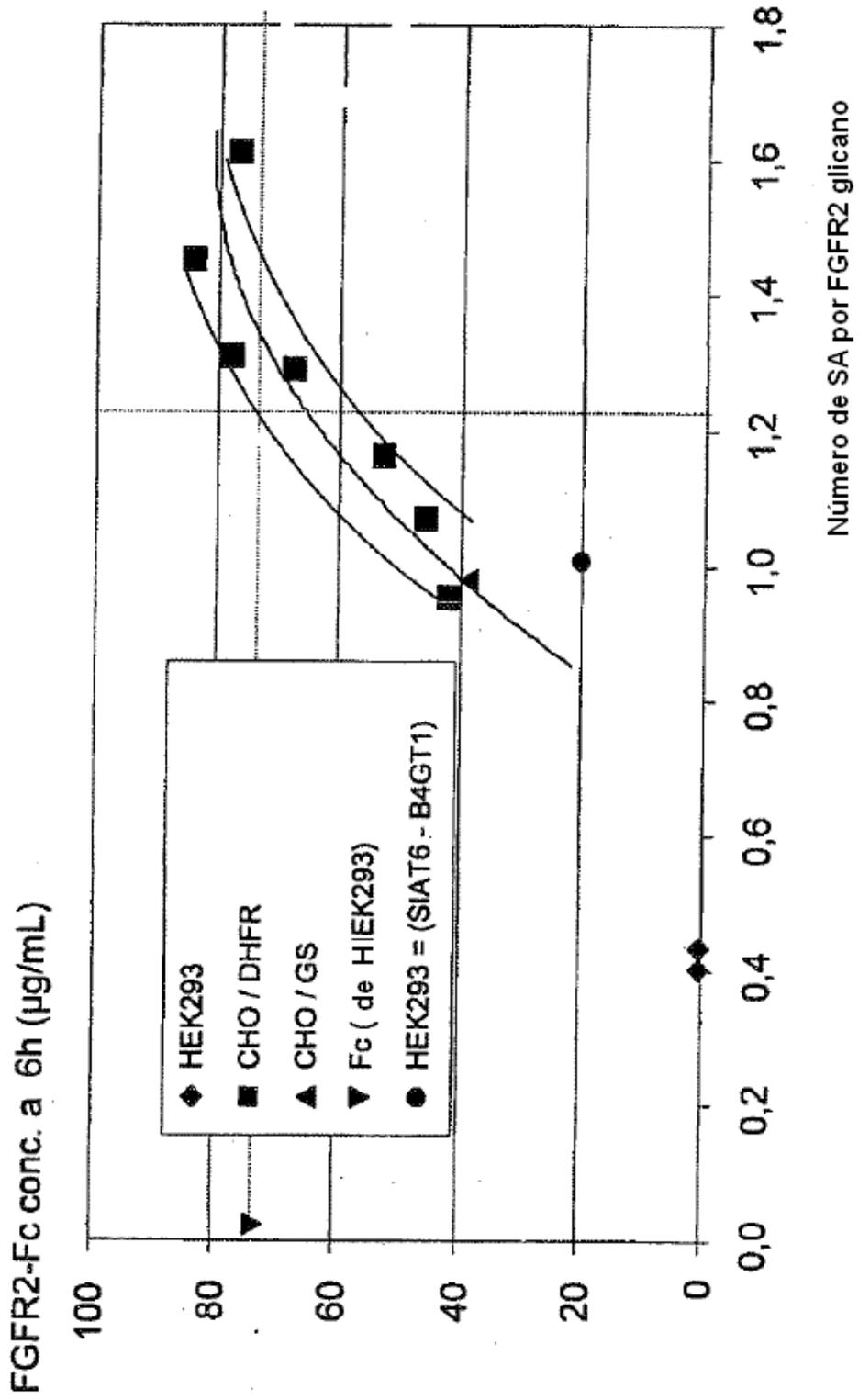


Fig. 8

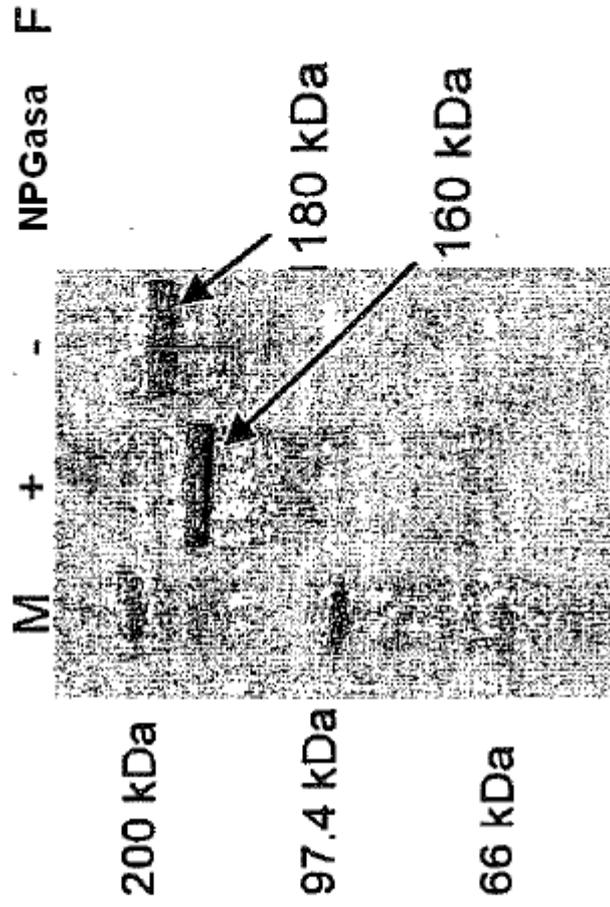


Fig. 9

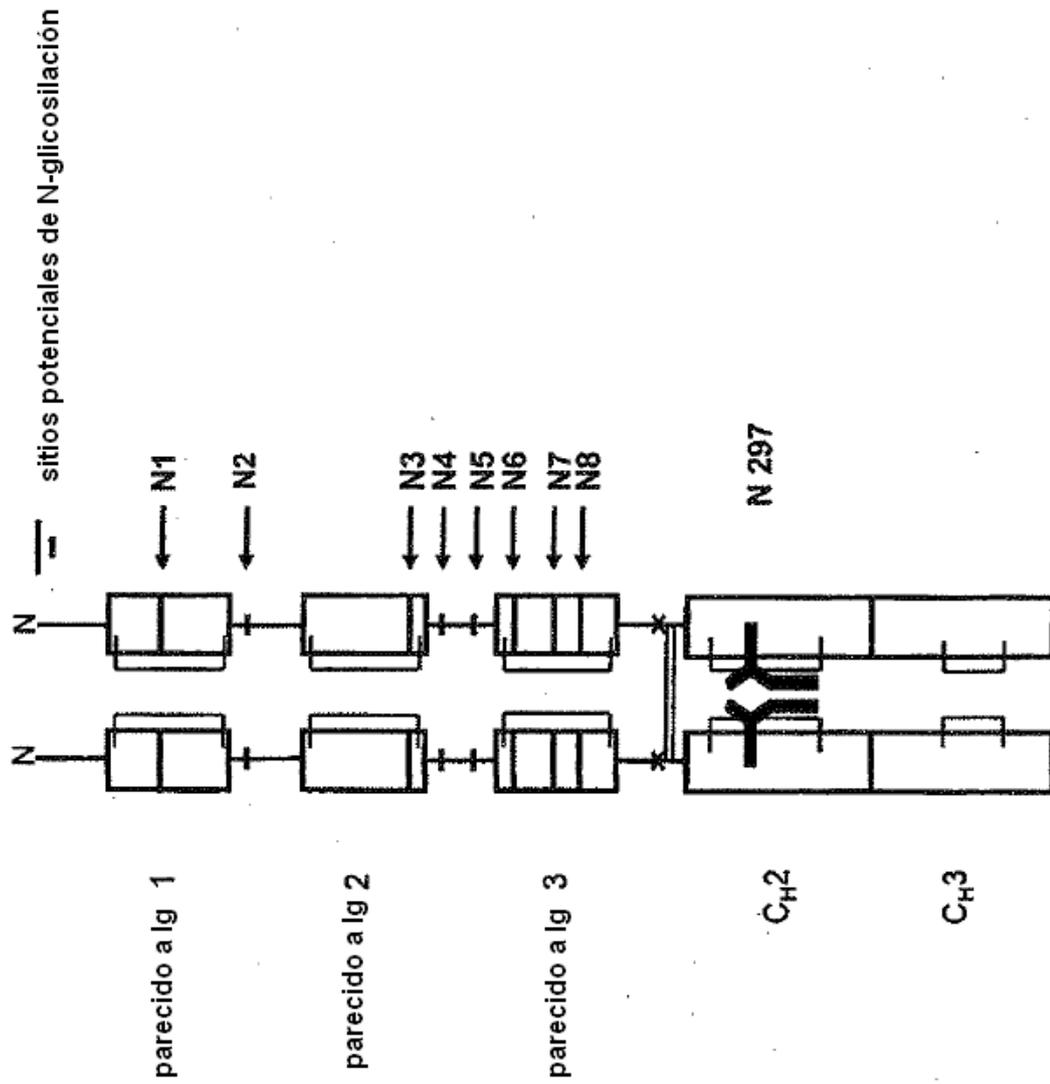


Fig. 10

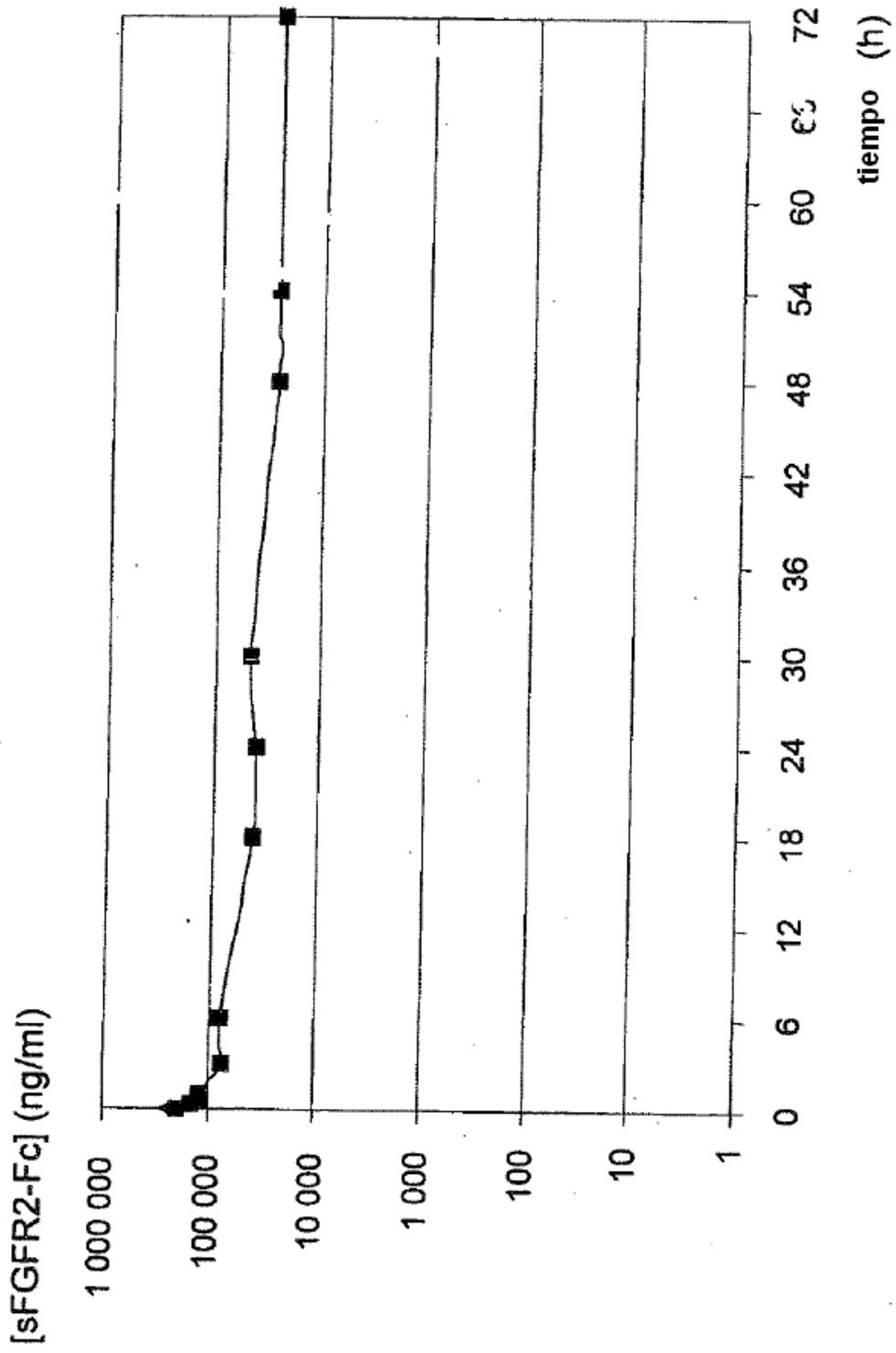


Fig. 11

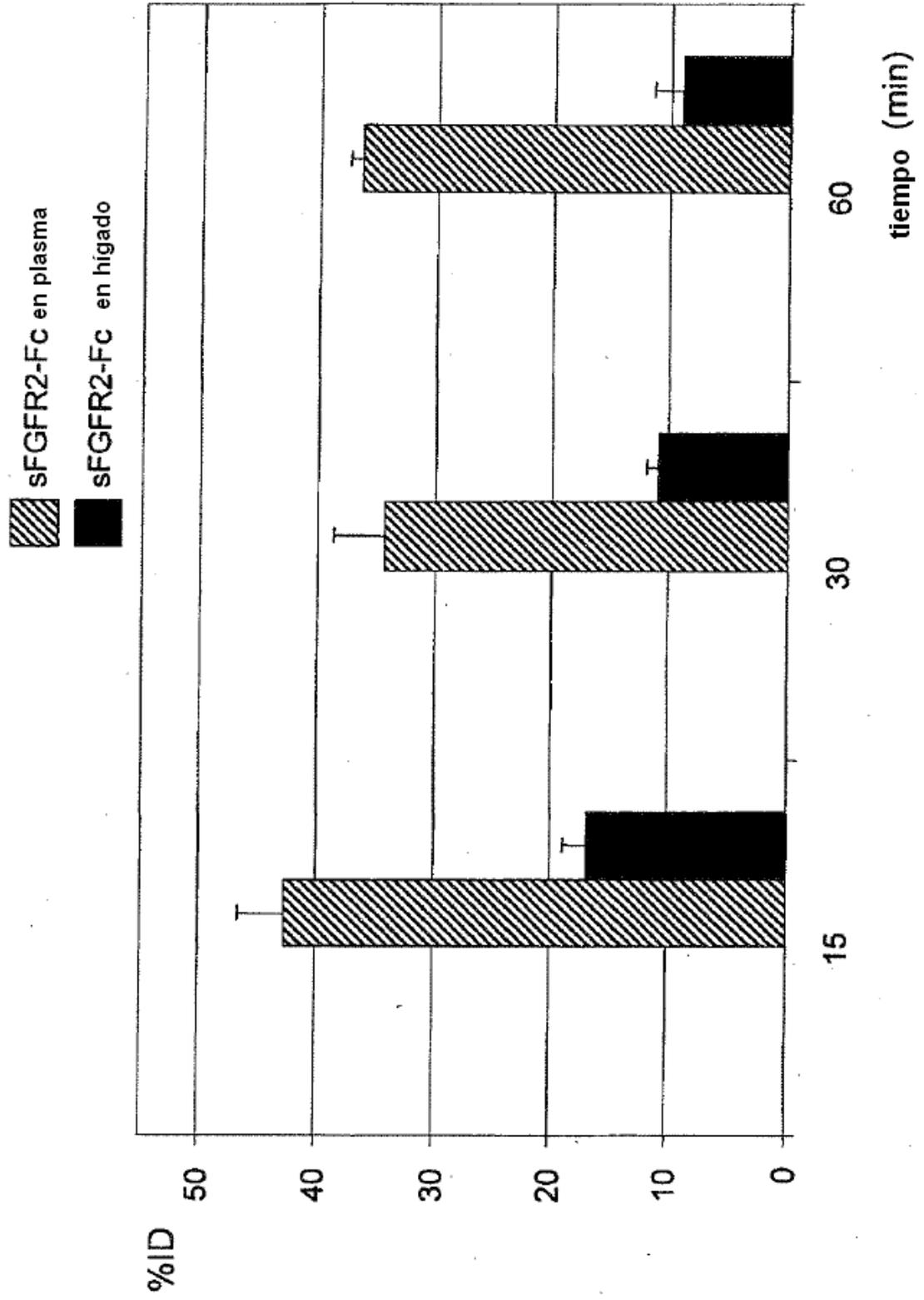


Fig. 12

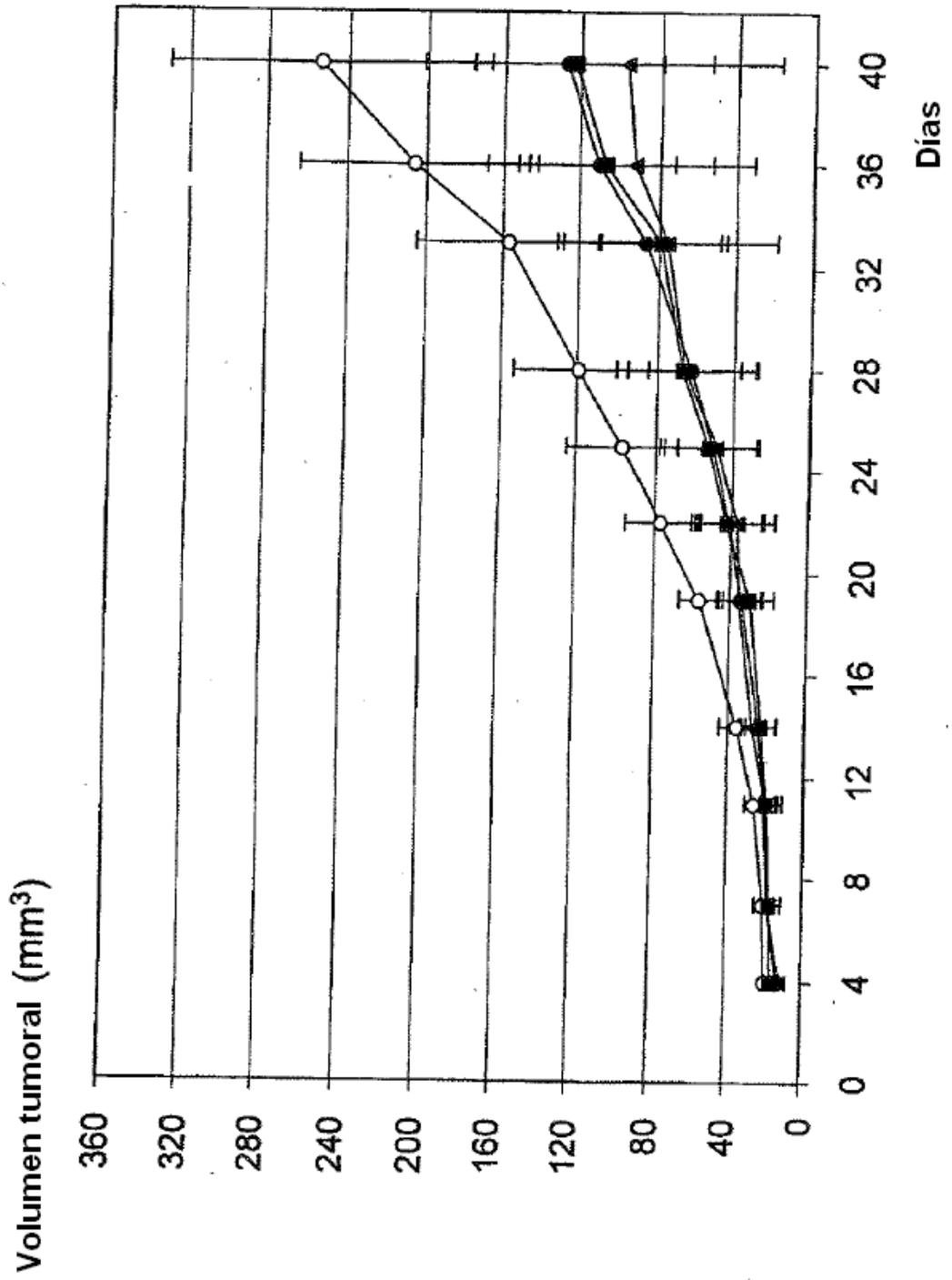


Fig. 13

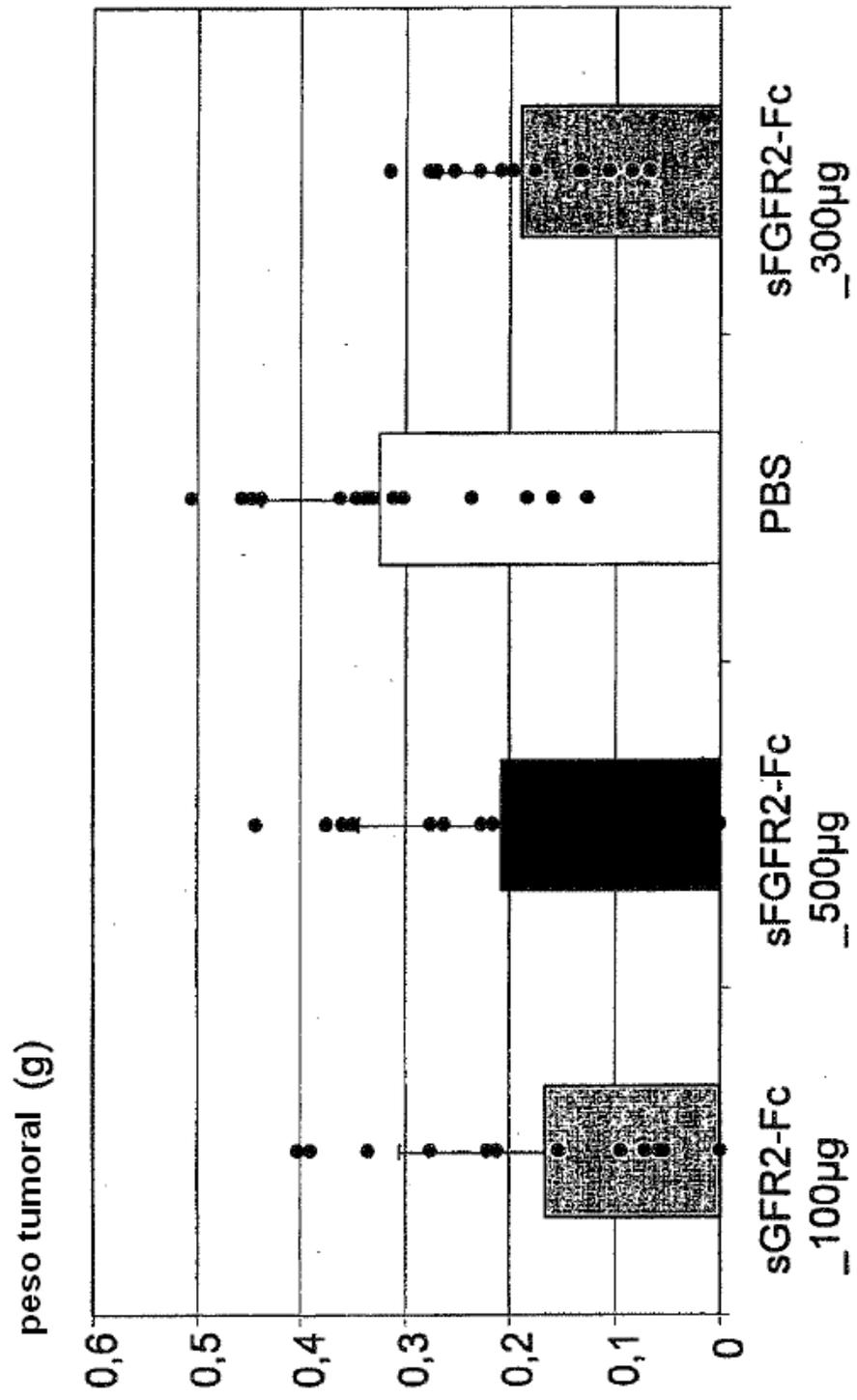


Fig. 14

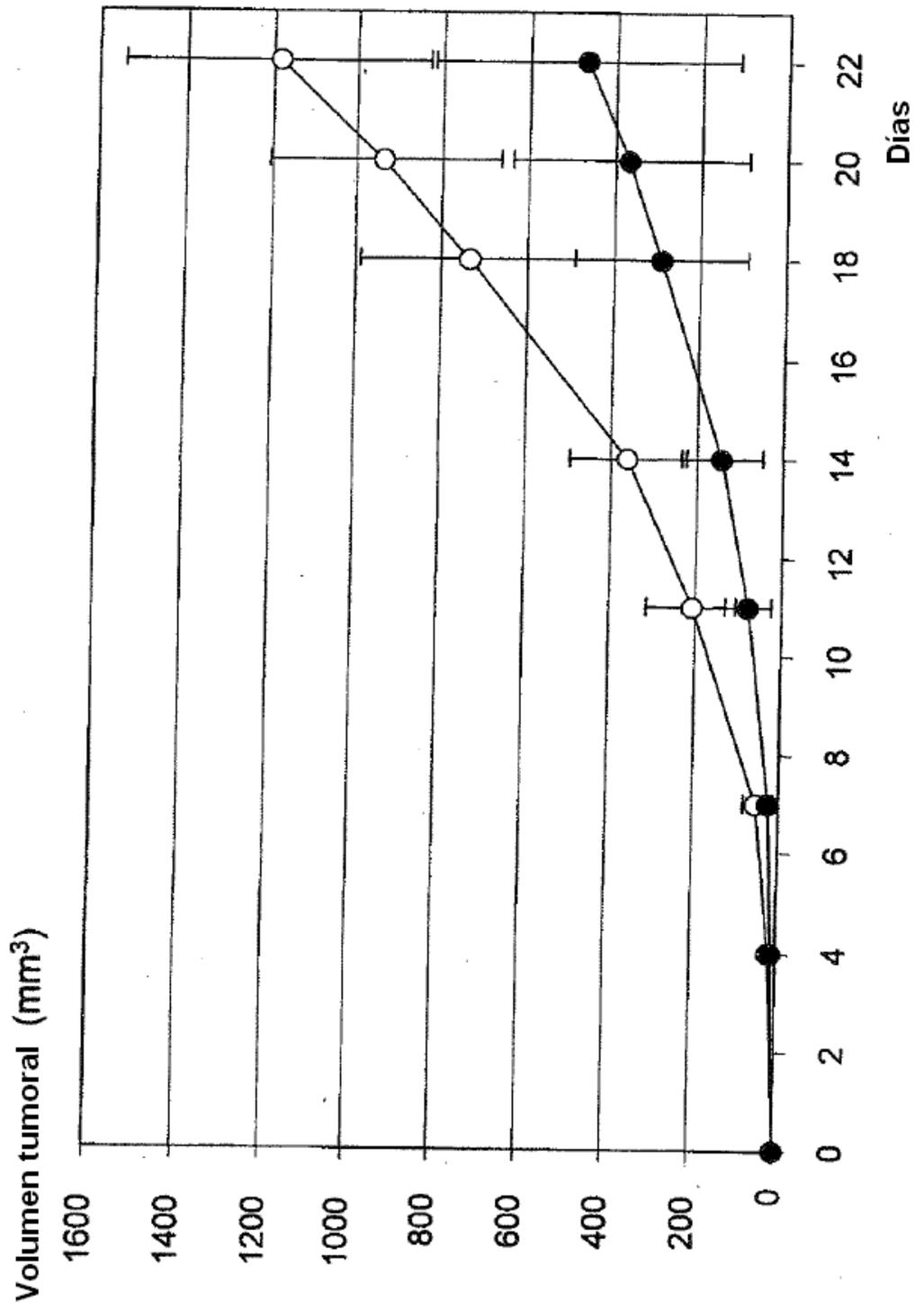


Fig. 16

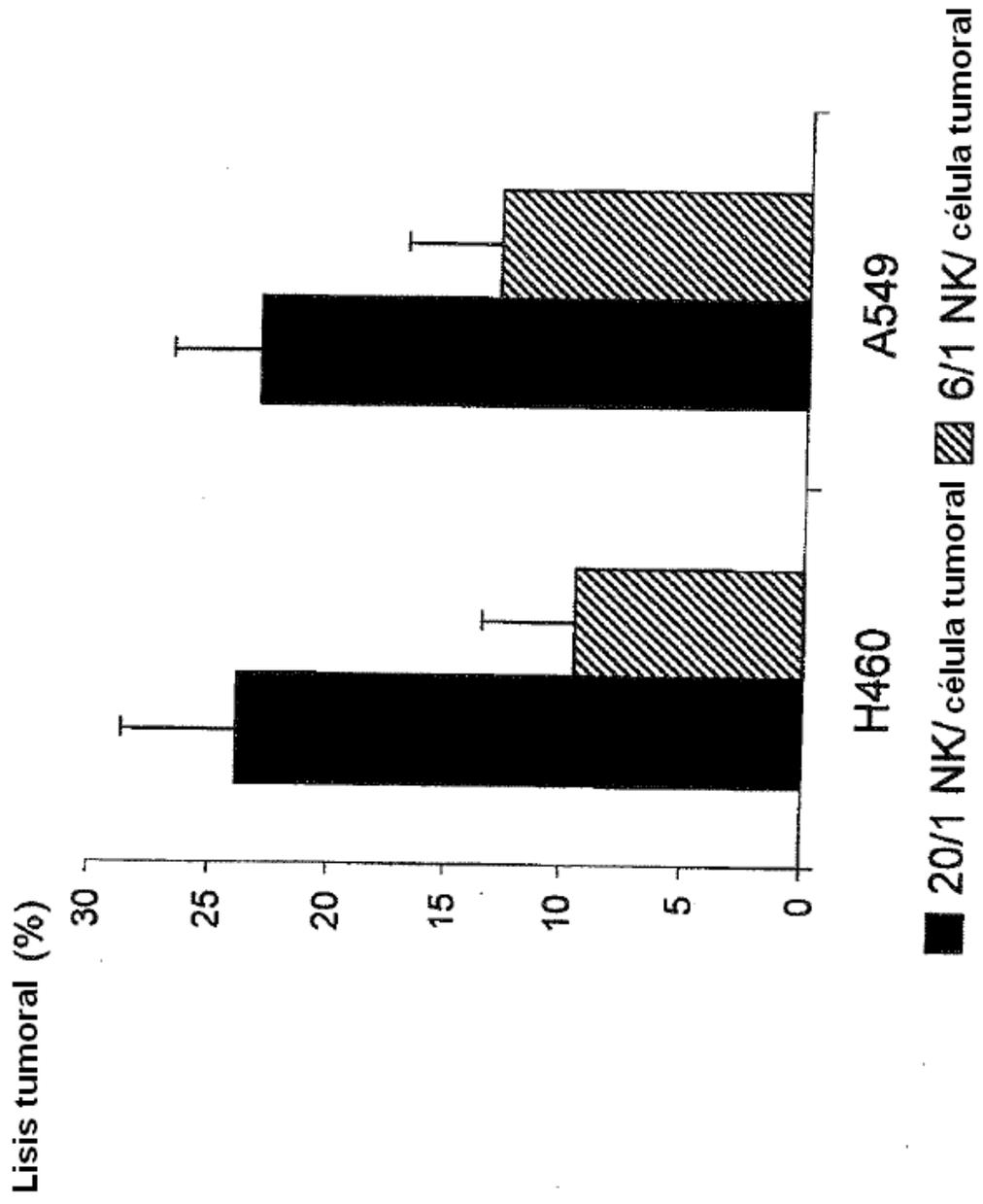


Fig. 17A

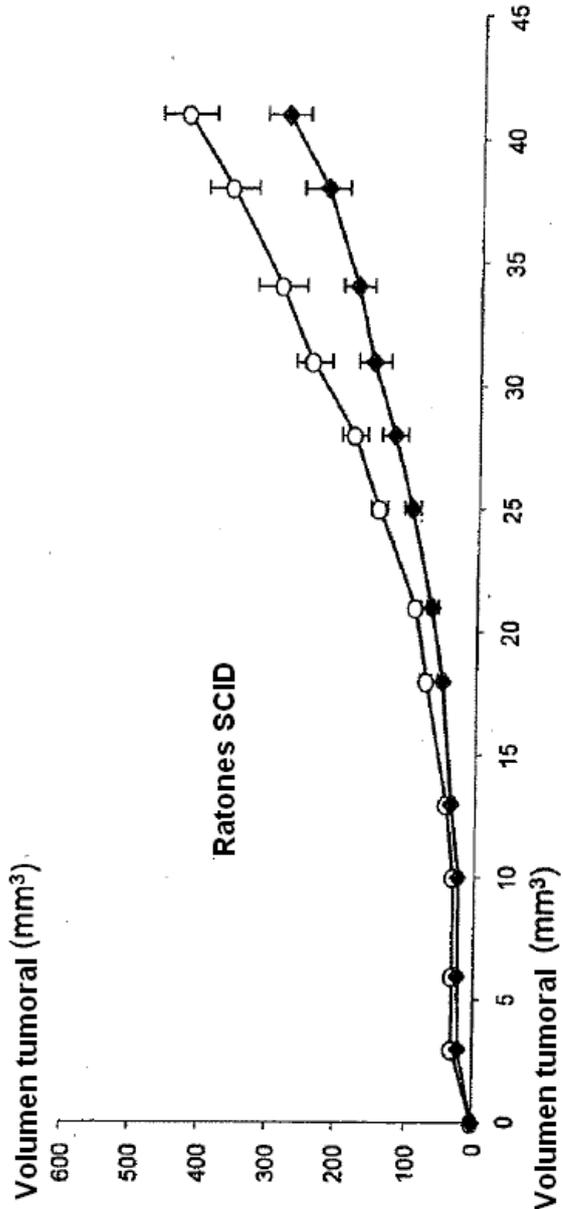


Fig. 17B

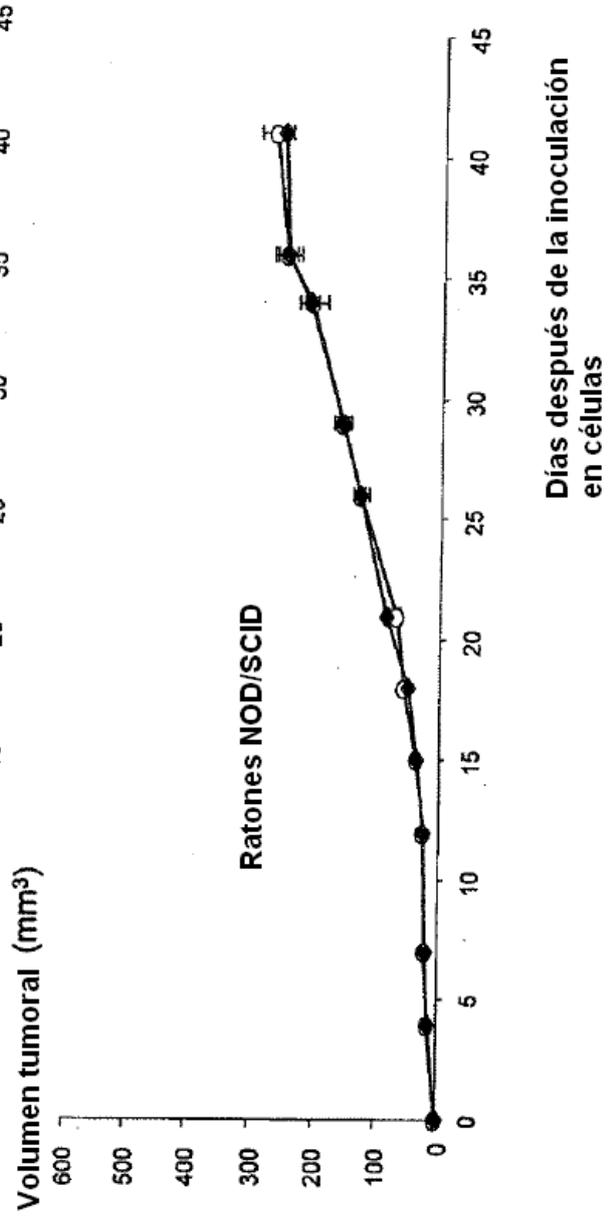
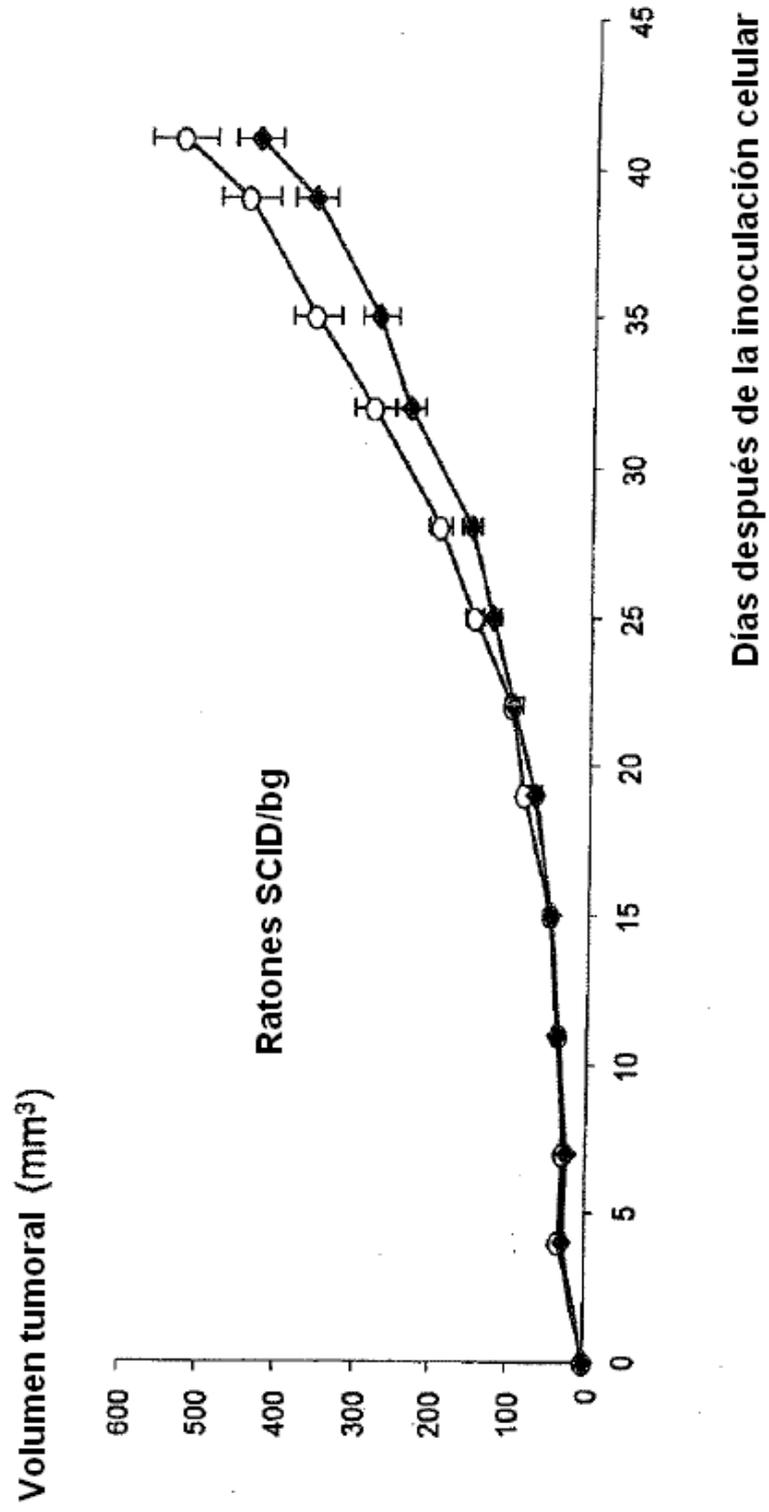


Fig. 17C



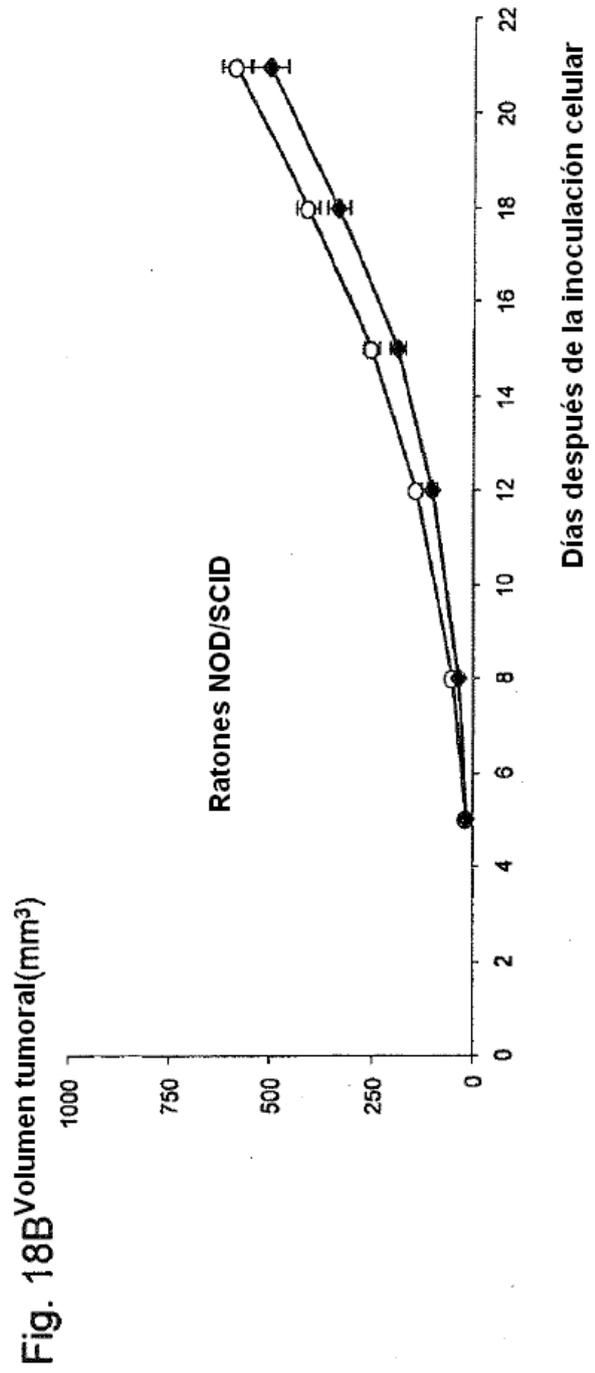
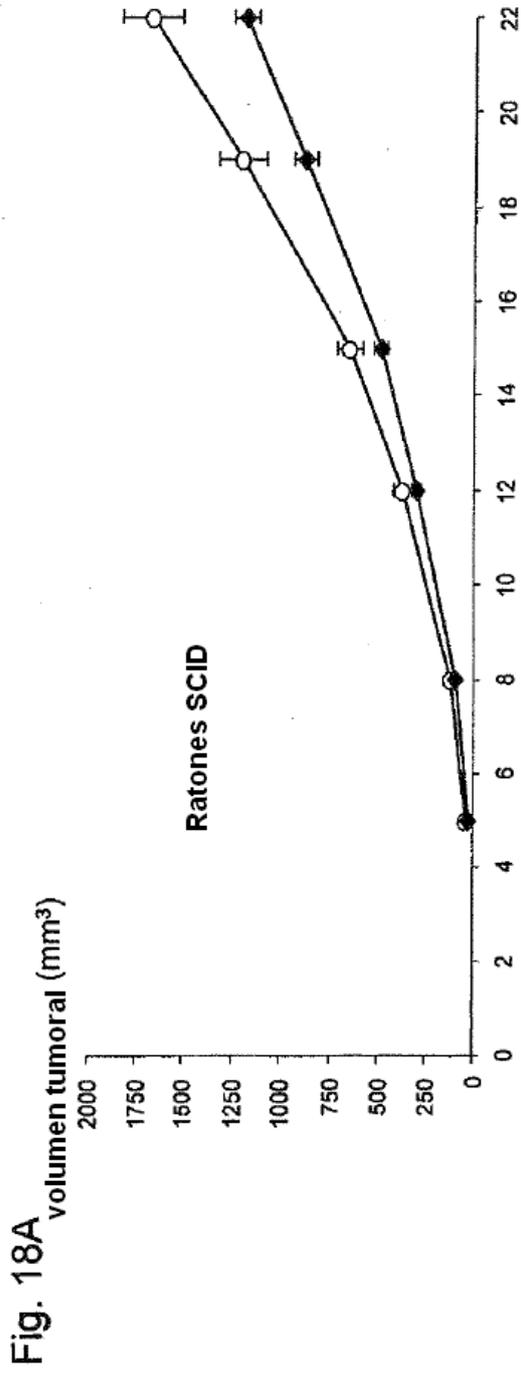


Fig. 18C

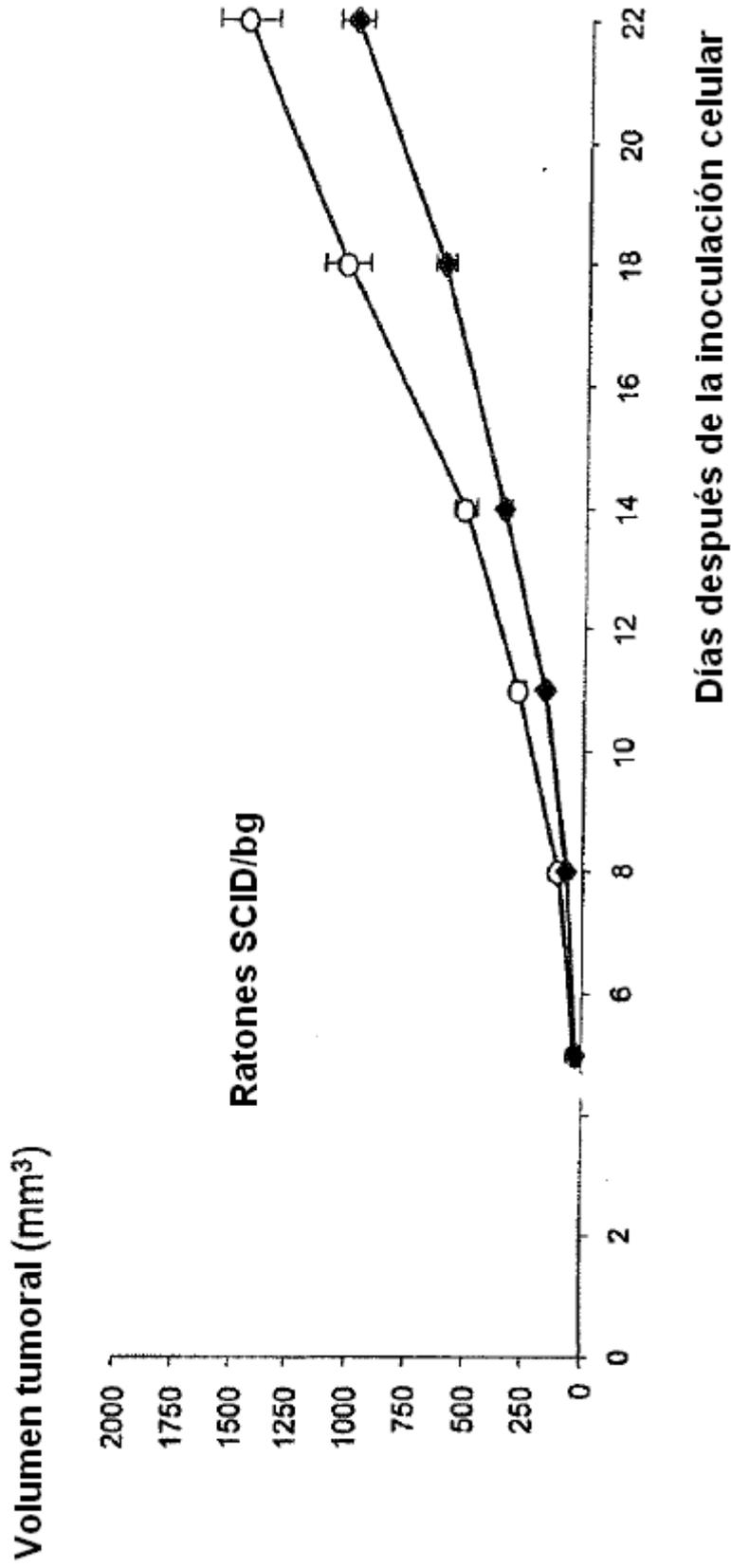


Fig. 19A

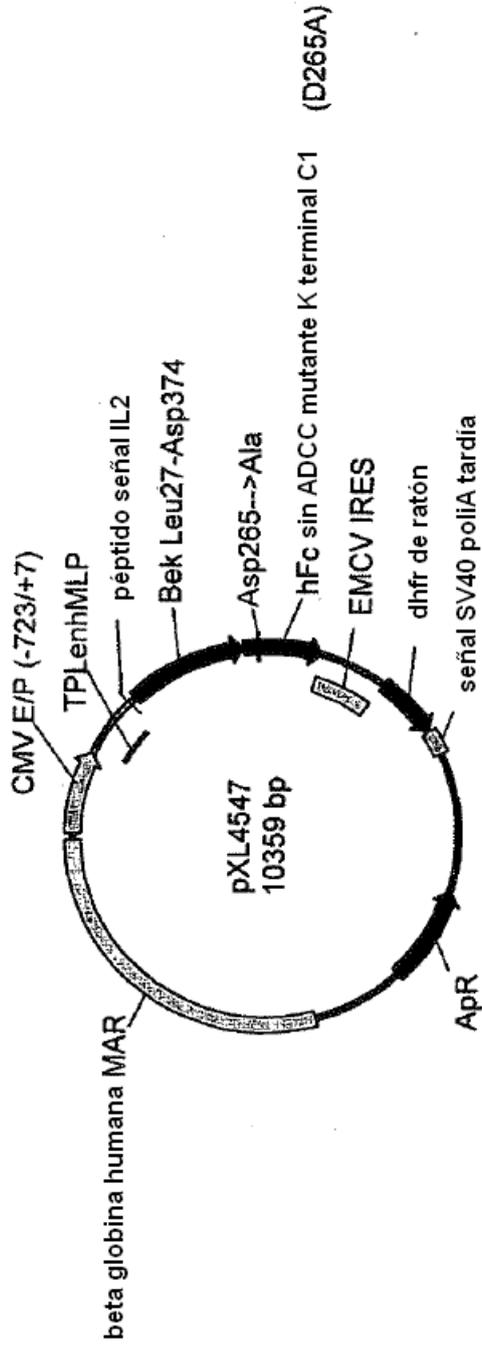


Fig. 19B

1	LVEDTTLEPE	EPPTKYQISQ	PEVYVAAPGE	SLEVRCLLKD	AAVISWTKDG
51	VHLGPNRNV	LIGEYLQIKG	ATPRDSGLYA	CTASRTVDSE	TWYFMVNVTD
101	AISSGDEDD	TDGAEDEFSE	NSNNKRAPYV	TNTEKMEKRL	HAYPAANTVK
151	FRCFAGGNPM	PTMRWLKNGK	EFKQEHRRIGG	YKVRNQHWSL	IMESVVPSPDK
201	GNYTCVENE	YGSINHTYHL	DVVERSPHRP	ILQAGLPANA	STVWGGDVEF
251	VCKVYSDAQP	HIQWIKHVEK	NGSKYGPDGL	FYLKVLKAAG	VNTTDKEIEV
301	LYIRNVTFED	AGEYTCLAGN	SIGISFHSAM	LTVLPAPGRE	KEITASPKDT
351	HTCPPCPAPE	LLGSPSVFLF	PRPKDTIMI	SRTPEVTCVV	VAVSHEDPEV
401	KFNWYVDGVE	VHNARTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV
451	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPOVYTLPP	SRDELTKNQV	SLTCLVKGFY
501	PSDIAVEMES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF
551	SCSVNHEALH	NHYTQKSLSL	SPG		

Fig. 20

