

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 940**

51 Int. Cl.:
C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05716585 .4**
96 Fecha de presentación: **13.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1704228**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2006**

54 Título: **Inmunoquinasas**

30 Prioridad:
16.01.2004 EP 04000847
29.07.2004 EP 04017928

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2012

73 Titular/es:
**Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V.**
Hansastraße 27c
80686 München, DE

72 Inventor/es:
BARTH, Stefan;
TUR, Mehmet Kemal;
STÖCKER, Michael y
FISCHER, Rainer

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 384 940 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

Inmunoquinasas

5 La presente invención se refiere a un complejo endógeno soluble sintético formado a partir de por lo menos un componente A y de por lo menos un componente B, de manera que el componente A comprende un dominio de unión para las estructuras de superficie extracelulares que se internalizan tras la unión del componente A de dicho complejo, y el componente B tiene una actividad quinasa catalítica constitutiva y realiza la biosíntesis/señalización celular que incluye la muerte celular después de la internalización a través de la fosforilación. La presente invención se refiere también a ácidos nucleicos y/o a vectores que codifican para tal complejo. La presente invención proporciona además un método para influir en el crecimiento celular y/o en la fisiología de las células a las que han sido dirigidos dicho complejo, dichos ácidos nucleicos o dichos vectores. La invención se refiere adicionalmente a células o líneas celulares u organismos no humanos, tales como plantas, que incluyen algas y/o microorganismos, que incluyen levaduras y hongos, que producen el complejo de la presente invención. La presente invención tiene que ver también con un kit que comprende dicho complejo, dichos ácidos nucleicos, dichos vectores y/o dichas células. La presente invención se refiere al uso de dicho complejo, dichos ácidos nucleicos o vectores, dichas células o dicho kit para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades proliferativas, las alergias, las enfermedades autoinmunes y/o la inflamación crónica. La presente invención se refiere adicionalmente al uso de dicho complejo, dichos ácidos nucleicos o vectores, dichas células y/o dicho kit para la modulación selectiva de las vías de señalización celular, a fin de realizar la expresión génica, y/o la viabilidad de la célula diana de una manera terapéutica. La invención se refiere adicionalmente a un medicamento que comprende dicho complejo, dichos ácidos nucleicos, dichos vectores, dichas células o dichos organismos. Además, los complejos, ácidos nucleicos, vectores, células y kits de la presente invención pueden utilizarse en ensayos diagnósticos, analíticos y de pronóstico de quinasas.

25

Antecedentes de la invención

Los medicamentos actualmente disponibles para las enfermedades proliferativas, tales como los agentes quimioterapéuticos, tienen la desventaja de inducir efectos secundarios considerables debido a su relativa falta de especificidad. Se ha intentado moderar éstos mediante diversos conceptos terapéuticos. Un enfoque potencial es el uso de agentes inmunoterapéuticos para aumentar la especificidad de la medicación. Este enfoque ha resultado especialmente útil para el tratamiento de tumores.

30

Un tipo de agente inmunoterapéutico son las inmunotoxinas. Una inmunotoxina comprende un anticuerpo monoclonal (AcMo) o un fragmento de anticuerpo recombinante con una afinidad específica para los marcadores de superficie de las células diana, que se acopla a un reactivo citotóxico. Los agentes citotóxicos se seleccionan de entre toxinas o elementos radiactivos. Un agente inmunoterapéutico en el que el agente citotóxico es un elemento radiactivo se denomina radioinmunoconjugado. Se han utilizado inmunotoxinas e radioinmunoconjugados para el tratamiento del cáncer.

35

40

Otro tipo de agente inmunoterapéutico son los anti-inmunoconjugados. Un anti-inmunoconjugado comprende una estructura relevante para la patogénesis o un fragmento del mismo, que se acopla a un componente de la toxina. Los anti-inmunoconjugados se utilizan para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, las reacciones tisulares o las alergias.

45

Cuando se utilizaban AcMo anti células B marcados radiactivamente con los linfomas celulares, pudieron observarse regresiones tumorales e incluso regresiones completas (1). Por el contrario, los resultados con AcMo frente a los tumores sólidos fueron bastante decepcionantes. Parece ser que el tamaño relativamente grande de las ITs utilizadas en estos estudios interfería con su capacidad de penetración tumoral, y las convertían en agentes terapéuticos ineficaces. La baja tasa de penetración tumoral planteaba un reto especial para los tumores pobremente vascularizados. A fin de obtener una mejor penetración tumoral y tisular y en general mejores propiedades de difusión, se miniaturizaron las ITs. Se especulaba también que estas ITs más pequeñas serían menos inmunogénicas debido al tamaño reducido de los determinantes antigénicos (2). Por lo tanto se conjugaron fragmentos de anticuerpos escindidos proteolíticamente (miniaturizados) con las funciones efectoras anteriormente mencionadas (elementos radiactivos o toxinas).

50

55

Las técnicas mejoradas de clonación permitieron preparar ITs completamente recombinantes: las regiones codificadoras de las regiones variables de la cadena ligera y pesada de las inmunoglobulinas, amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa, se unen entre sí mediante un conector sintético (por ejemplo, (Gly₄Ser)₃) (SEC ID N°: 7). A continuación, el fragmento monocatenario de genes de región variable (scFv) resultante se fusiona genéticamente a una región codificadora de una enzima catalíticamente activa que incluye polipéptidos o proteínas citotóxicamente activas (3).

60

Las citotoxinas peptídicas, que han sido principalmente utilizadas hasta la fecha y por lo tanto las mejor caracterizadas, son las toxinas bacterianas toxina de la difteria (DT), exotoxina A de *Pseudomonas*, (PE) y el derivado de plantas ricina A (4). El mecanismo de la actividad citotóxica es básicamente el mismo en todas estas

65

toxinas a pesar de sus diferentes antecedentes evolutivos. El dominio catalítico inhibe la biosíntesis de proteínas mediante la modificación directa del factor de elongación 2 (EF-2), que es importante para la traducción, o mediante la inactivación del sitio de unión a EF-2 en la subunidad 28S del ARNr de los ribosomas.

5 En la mayoría de las construcciones empleadas hasta la fecha, la aplicación sistémica de inmunotoxinas da como resultado efectos secundarios más o menos graves. Además del síndrome de "fuga vascular", también se produce trombocitopenia, hemólisis, insuficiencia renal y náuseas, dependiendo de la construcción empleada y de la dosis aplicada (4). También se observó daño hepático dependiente de la dosis (5). Además de los efectos secundarios documentados, la inmunogenicidad de las construcciones es uno de los problemas clave de la inmunoterapia. Esto se aplica, en concreto, a la defensa humoral frente a los dominios catalíticos empleados, tales como ricina (HARA), PE, o DT (2). Teóricamente, todas las estructuras no humanas pueden provocar una respuesta inmunológica. Por lo tanto, la administración repetida de inmunotoxinas e inmunoconjugados es limitada. Una consecuencia lógica de estos problemas es el desarrollo de inmunotoxinas humanas.

15 Hasta la fecha, las toxinas humanas utilizadas en las inmunotoxinas se han seleccionado en la mayoría de los casos de las ribonucleasas (6). Ya que las RNAsas humanas están presentes en los fluidos extracelulares, el plasma y los tejidos, se consideran menos inmunogénicas cuando se utilizan en inmunotoxinas. La angiogenina (ANG), una proteína de 14 kDa que tiene una homología de secuencia del 64% con la RNasa A, se aisló por primera vez a partir de un medio acondicionado para células tumorales, donde se descubrió debido a su capacidad para inducir la angiogénesis (7). Se demostró que la actividad RNasa específica del ARNt de la angiogenina tiene potencial citotóxico. De conformidad con ello, las inmunotoxinas químicamente conjugadas presentaban posteriormente una actividad tóxica específica de célula. Para evaluar la eficacia de las inmunotoxinas basadas en ANG, se construyeron diferentes conformaciones de ANG con, por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el ligando CD30, y se sometieron con éxito a ensayo *in vitro* (8). Otro miembro de la superfamilia de las RNasa es la neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN). Para la EDN, que tiene un tamaño de 18,4 kDa, hasta la fecha sólo se ha descrito la neurotoxicidad directa. En base a la potencia documentada, se han construido diferentes inmunotoxinas basadas en EDN y se han sometido a ensayo con éxito *in vitro* (9).

30 Muy recientemente se ha demostrado que las proteasas como la granzima B o derivados de la misma pueden cumplir de manera eficaz la función efectora de las inmunotoxinas (WO-A-01/80880).

La fosforilación de proteínas es uno de los mecanismos más importantes mediante el cual las señales extracelulares se transforman en respuestas biológicas en las células. La activación de proteínas quinasas es el modo más común de transducción de señales en los sistemas biológicos. Los tres componentes básicos de los sistemas de fosforilación son: 1) fosfoproteínas que modifican sus propiedades por fosforilación y desfosforilación, 2) las proteínas quinasas que transfieren un grupo fosfato a partir de sustratos donantes, como el ATP y el GTP, a los residuos de serina, treonina, tirosina o histidina; y 3) las proteínas fosfatasas que desfosforilan proteínas fosforiladas, restableciendo así el sistema de fosforilación de proteínas concreto a su fase basal. Las proteínas quinasas eucariotas (ePK) representan la mayor superfamilia de proteínas homólogas implicadas en la regulación de las vías de señalización intracelular. Estas quinasas fosforilan los residuos de aminoácidos (aa) situados en los bucles o vueltas de sus sustratos. Para regular las vías de transducción de señales, existen aproximadamente 2.000 quinasas y 500 proteínas fosfatasas codificadas dentro del genoma humano (10). Un gran número de estas quinasas son codificadas por oncogenes y genes supresores tumorales. Se conocen las estructuras primarias de cientos de estas enzimas, y todas contienen un núcleo catalítico conservado de aproximadamente 250 a 300 residuos de aa. Se han descubierto características estructurales conservadas del dominio catalítico desde levaduras, organismos eucariotas inferiores hasta mamíferos. El dominio catalítico de un dominio quinasa se divide adicionalmente en 12 subdominios más pequeños, definidos como regiones no interrumpidas por inserciones de gran tamaño y que contienen residuos de aa característicos altamente conservados. El subdominio I-IV, situado en el extremo amino-terminal del dominio catalítico, está implicado en el anclaje y en la orientación del nucleótido ATP. Los subdominios VI-IX forman una estructura lobular grande en el extremo carboxilo-terminal del dominio catalítico y están implicados en la unión de sustratos y en la catalización de la reacción de transferencia de fosfato. El patrón de los residuos de aa descubierto dentro del subdominio VIB (motivo HRD), VIII (motivo A/SPE), y IX (motivo DXWXXG (SEC ID N° 9) está altamente conservado entre las diferentes proteínas quinasas.

55 Las proteínas quinasas eucariotas constituyen una gran superfamilia de proteínas homólogas (11). Un esquema de clasificación se basa en una filogenia del dominio catalítico, que revela las familias de enzimas que tienen especificidades de sustrato y modos de regulación relacionados de acuerdo con el esquema de Hanks y Hunter (12). La mayoría de las proteínas quinasas contienen un dominio catalítico conservado que pertenece a la superfamilia de las proteínas quinasas eucariotas (ePK) (todas las demás proteínas quinasas se clasifican como proteínas quinasas atípicas (aPKs)). Las ePKs se dividen en siete grupos principales, y se subdividen en familias y subfamilias, en base a la secuencia de sus dominios:

65 Las proteínas quinasas atípicas (aPK) carecen de similitud de secuencia con los dominios ePK, pero tampoco tienen actividad de proteína quinasa, o una clara homología con las aPKs con actividad proteína quinasa. Todas las familias aPK son pequeñas, teniendo varias de ellas un solo miembro en los vertebrados. No se han encontrado en invertebrados. Una serie de informes han demostrado que las

quinasas de esta subfamilia desempeñan un papel crítico en las vías de señalización que controlan el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular.

Recientemente, varios investigadores han identificado una serie de proteínas que interactúan con la aPKC y su caracterización está ayudando a desentrañar los mecanismos de acción y las funciones de estas quinasas. Recientemente, se ha identificado una nueva familia de aPKs denominada alfa quinasas que no tienen ninguna homología con la superfamilia de las proteínas serina/treonina/tirosina quinasas (13).

Las alfa quinasas difieren de las proteínas serina/treonina/tirosina quinasas en que fosforilan un residuo de aa treonina situado en la región alfa helicoidal del sustrato.

10 EL calcio libre es un mensajero secundario importante en todos los tipos de células. Un mecanismo por el que los iones calcio ejercen sus efectos es mediante la unión a una proteína de 17 kDa, la calmodulina (CaM). La unión de cuatro iones calcio a la calmodulina cambia su conformación y promueve su interacción con una serie de otras proteínas, que incluyen varias clases de proteínas quinasas que son activadas por el complejo calcio/CaM (14). La clasificación de las proteínas quinasas dependientes de calcio/CaM se basa en su especificidad por el sustrato.

15 Algunas de estas enzimas tienen un solo sustrato, y se denominan proteínas quinasas dependientes de calcio/CaM "especializadas", mientras que otras tienen una amplia especificidad de sustrato y se denominan quinasas "multifuncionales". Las proteínas quinasas dependientes de calcio/CaM *especializadas* comprenden tres enzimas. La quinasa fosforilasa, la quinasa de cadena ligera de miosina y la quinasa del factor 2 de elongación eucariota. Las proteínas quinasas dependientes de calcio/CaM multifuncionales comprenden cuatro enzimas denominadas quinasas CAM-I, II, IV y proteínas serina/treonina quinasas proapoptóticas asociadas a la muerte.

Uno de los mediadores positivos de la apoptosis es la DAP-quinasa (DAPk) (15). La DAPk es una serina/treonina quinasa regulada por calcio/CaM proapoptótica con actividad supresora tumoral. DAPk es frecuentemente inactivada por la metilación del promotor en el cáncer humano. Su expresión se pierde con frecuencia en el carcinoma humano y en las neoplasias de células T/(NK) en banda, en algunos casos en asociación con fases más agresivas de la enfermedad (16). Muy recientemente, se ha demostrado, que no se podía detectar ninguna expresión de DAPk en las líneas celulares de carcinoma de pulmón altamente metastásico, mientras que los homólogos poco metastásicos fueron positivos para DAPk. Recientemente se han identificado cuatro quinasas adicionales que tienen una homología significativa en su dominio catalítico para DAPk. ZIP(Dlk) quinasa y DRP-1, también denominadas DAPk2, son los miembros de la familia más cercanos, ya que sus dominios catalíticos comparten aproximadamente el 80% de identidad con los de DAPk. Dos proteínas relacionadas con DAPk más distantes son DRAK1 y DRAK2. Tanto las funciones proapoptóticas como las supresoras tumorales de DAPk dependen de su actividad catalítica quinasa. El segmento regulador para CaM de DAPk posee un efecto autoinhibidor sobre la actividad catalítica, y se libera mediante la unión a CaM activada por Ca²⁺. Consecuentemente, la supresión de este segmento del mutante DAPk-ΔCAM generaba una quinasa constitutivamente activa ("quinasa súper citolítica"), que presentaba fosforilación del sustrato independiente de CaM *in vitro* y promovía la actividad apoptótica *in vivo* (17). La quinasa del factor 2 de elongación eucariota (eEF-2k) pertenece a las alfa quinasas y es distinta de la familia principal de las proteínas quinasas con las que no comparte similitud de secuencias (18). La actividad del factor 2 de elongación eucariota (eEF-2) es crucial para la etapa de elongación de la traducción del ARNm. La actividad del eEF-2 se regula mediante fosforilación. Para ser activo, el eEF-2 debe estar desfosforilado, ya que la fosforilación en la Thr-56 y 58 produce la inactivación, dando como resultando la terminación de la traducción del ARNm. La fosforilación de eEF-2 en la Thr-56 y 58 por la eEF-2k dependiente de calcio/CaM altamente específica da como resultado la inactivación de eEF-2 y, por tanto, puede regular la velocidad global de la síntesis de proteínas en la fase de elongación en las células animales. La eEF-2k es a su vez regulada tanto positiva como negativamente por la fosforilación en por lo menos cinco residuos diferentes de serina, probablemente mediada por siete proteínas quinasas o más. Muy recientemente, se ha demostrado que una mutación puntual en la Ser-499, eEF-2K S499D, transforma la quinasa en una forma constitutivamente activa (19).

La fosforilación de proteínas está implicada en procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la secreción, la invasión, la angiogénesis, la metástasis y la apoptosis. Las proteínas quinasas y las fosfatasas desempeñan un papel clave en la regulación de estos procesos. Los cambios en el nivel, el emplazamiento subcelular y la actividad de las quinasas y de las fosfatasas tienen consecuencias sobre el mantenimiento de la homeostasis celular y la función celular normal. La disfunción en las actividades de las proteínas quinasas puede ocasionar graves estados patológicos. En el cáncer, así como en otras enfermedades proliferativas, la supervivencia, la diferenciación y la proliferación celular desregulada son con frecuencia el resultado de la fosforilación anormal de las proteínas.

La identificación de los papeles clave de las proteínas quinasas en las enfermedades proliferativas ha conducido a grandes esfuerzos para desarrollar inhibidores de las quinasas para el tratamiento de una amplia variedad de cánceres. Se han seleccionado muchas proteínas tirosina y serina/treonina quinasas diferentes como candidatas para las actividades de descubrimiento de fármacos en la investigación de la inflamación y del cáncer, ya sea en su sobreexpresión y/o en la disfunción de un órgano o tejido en concreto, o a través de su asociación en la desregulación de las vías del ciclo celular/la transducción señales. Hasta la fecha, más de 30 dianas diferentes para la tirosina quinasa se encuentran bajo evaluación en los proyectos de descubrimiento de fármacos en oncología. Se han desarrollado inhibidores químicos (moléculas orgánicas, inhibidores peptídicos), oligonucleótidos antisentido y anticuerpos selectivos para las quinasas que se dirigen contra las quinasas intracelulares.

Sin embargo, el desarrollo era lento y estaba asociado a problemas, principalmente debido a la toxicidad asociada, atribuida a la escasa selectividad de estos compuestos. Los inhibidores de las proteínas quinasas se unen principalmente al sitio activo de la enzima, en competencia con el ATP+, y todavía es cuestionable si tales inhibidores pueden utilizarse para el tratamiento a largo plazo de enfermedades crónicas, tales como la artritis reumatoide.

De forma similar, las inmunotoxinas del estado de la técnica tales como las inmunotoxinas recombinantes o enlazadas químicamente o que comprenden ribonucleasas, todavía se asocian al problema de la toxicidad no específica. Este problema reduce la eficacia de las composiciones que comprenden dichas inmunotoxinas, y limita su utilidad como agentes terapéuticos.

Muy recientemente, se desarrollaron diferentes proteínas quiméricas de quinasas fusionadas a distintos ligandos: A) Se construyeron proteínas de fusión quinasa-ligando para influir en el comportamiento de las células T después de la transfección (US-A-5.670.324): después de la transformación de las células T con un vector que codifica para una fusión CD4-quinasa quimérica, las moléculas quiméricas unidas a membrana expresadas pueden utilizarse para identificar fármacos que bloquean la activación de las células T o disminuyen el nivel de autoantígenos. B) También se construyeron receptores quiméricos basados en quinasa para redirigir las células efectoras inmunológicas. Las células efectoras inmunológicas humanas transformadas con un vector que codifica para una proteína de fusión ligando-quinasa unida a la membrana puede ser capaz de dirigirse específicamente contra las células a través de su ligando extracelular y puede iniciar la citólisis de las células diana mediante la actividad de la quinasa fusionada que desencadena la activación de las células efectoras inmunológicas (US 2002/0176851 A1). C) Se fusionaron quinasas dependientes de ciclina (CDKs), en concreto la quinasa Myt-1 humana y derivados de la misma a la región constante de las moléculas de inmunoglobulina, lo que puede mejorar las propiedades farmacocinéticas y simplificar la expresión y la purificación de Myt-1 (US 5.935.835). D) Se construyeron otras proteínas de fusión basadas en quinasa, en concreto las proteínas de fusión scFv-quinasa para la identificación indirecta de las interacciones proteína-proteína dentro de las células vivas después de su transformación con dos vectores diferentes (US 2002/0151684 A1).

En el documento US-A-6.015.556 se describe un compuesto que comprende una parte específica de célula diana, tal como un anticuerpo específico frente a los antígenos de células tumorales, y una parte de inactivación, tal como una enzima, capaz de convertir una sustancia que en su estado nativo es capaz de inhibir el efecto de un agente citotóxico en una sustancia que tiene menor efecto frente a dicho agente citotóxico. La acción prolongada de un agente citotóxico en los sitios del tumor es por tanto posible al tiempo que se protegen los tejidos normales de los efectos del agente citotóxico.

De acuerdo con el resumen de la Experimental Cell Research, Volumen 256, Número 1, abril de 2000, págs. 34-41 (8) Cross T.G. describe que la apoptosis es un proceso intrínseco presente en todas las células, puede ser regulado por factores extrínsecos, que incluyen hormonas, factores de crecimiento, receptores de superficie celular, y el estrés celular. Las acciones de los factores proapoptóticos y antiapoptóticos se ven con frecuencia influidas por la modulación del estado de fosforilación de los elementos clave del proceso de apoptosis. Este artículo se centra en el papel de las proteínas quinasas en la apoptosis. La apoptosis es un proceso de varias etapas y las proteínas quinasas han estado implicadas tanto en la fase de inducción de la apoptosis aguas arriba como en la fase de ejecución aguas abajo, como dianas directas para las caspasas. Debido a las limitaciones de espacio de esta revisión no es posible analizar todas las quinasas implicadas en el proceso de apoptosis y los investigadores se han centrado en el presente documento en el papel de las proteínas serina/treonina quinasas. Las quinasas de esta familia que se han propuesto para desempeñar un papel en la apoptosis son la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), específicamente p42/44ERK, MAPK p38 y c-Jun quinasa N-terminal (JNK), la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), la proteína quinasa B (PKB), o Akt y la proteína quinasa C (PKC). Los investigadores también han considerado brevemente el potencial para la regulación de estas quinasas mediante las proteínas tirosina quinasas, tales como c-abl.

Ninguna de estas fusiones quinasa está disponible como proteína soluble que permita su uso como inmunotoxina humana.

Sorprendentemente, se descubrió que los problemas anteriormente mencionados pueden solucionarse mediante complejos endógenos solubles que comprenden fragmento(s) de anticuerpo(s) específicos de célula que se une(n) a quinasa(s) constantemente y catalíticamente activa(s) que desarrollan una actividad citotóxica/reguladora tras la internalización del complejo. Sorprendentemente, los complejos de la presente invención resultan superiores a las inmunotoxinas del estado de la técnica por tener una mayor especificidad al combinar la unión específica a una célula diana con la actividad catalítica constitutiva específica dentro de la célula diana, una inmunogenicidad reducida, una actividad mejorada y ser resistentes a la inactivación no específica, y resultan por lo tanto menos propensas a la reducción de la actividad.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un complejo sintético de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5. La presente invención también describe un complejo sintético formado a partir de por lo menos un componente A y de por lo menos un componente B, de manera que el componente A comprende un dominio de unión para las estructuras de superficie extracelulares que se internalizan tras la unión del componente A de dicho complejo, y el componente B tiene una actividad quinasa catalítica constitutiva, dicho complejo es soluble y ocasiona la muerte celular después de la internalización. El componente A se selecciona del grupo de estructuras de unión activa que consisten en anticuerpos o sus derivados o fragmentos de los mismos, y/o moléculas químicas tales como carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, péptidos, vitaminas, etc., y/o moléculas pequeñas de hasta 100 átomos con actividad de unión al receptor, tales como ligandos, en concreto iones individuales, moléculas peptídicas, moléculas no peptídicas, etc., y/o proteínas de unión a los carbohidratos de la superficie celular y sus ligandos tales como lectinas, en concreto calnexinas, lectinas de tipo o, lectinas de tipo l, lectinas de tipo m, lectinas de tipo p, lectinas de tipo r, galectinas y sus derivados, y/o moléculas de unión a receptores tales como los ligandos naturales para los antígenos de diferenciación (CD), como CD30, CD40, etc., citocinas tales como quimiocinas, factores estimuladores de colonias, citocinas de tipo 1, citocinas de tipo 2, interferones, interleucinas, linfocinas, monocinas, etc., y/o moléculas de adhesión que incluyen sus derivados y mutantes, y/o derivados o combinaciones de cualquiera de las estructuras de unión activa anteriormente enumeradas, que se unen a antígenos CD, receptores de citocinas, receptores hormonales, receptores del factor de crecimiento, bombas de iones, proteínas formadoras de canales. El componente A también puede seleccionarse de entre el grupo de estructuras de unión pasiva que consisten en alérgenos, alérgenos peptídicos, alérgenos recombinantes, anticuerpos idiotípicos de alérgeno, estructuras que provocan la respuesta autoinmune, estructuras que inducen el rechazo de tejidos, regiones constantes de las inmunoglobulinas y sus derivados, mutantes o combinaciones de los mismos. En la presente invención se describe que el complejo es dirigido por su componente A hasta una célula diana que comprende una pareja de unión para las estructuras de unión de A anteriormente enumeradas. En una forma de realización adicional el componente A del complejo tiene una valencia superior al comprender dos o más estructuras de unión idénticas y/o diferentes. El complejo descrito también comprende un componente B que es por lo menos una quinasa seleccionada de entre los tres tipos siguientes de quinasas: 1, la superfamilia de las proteínas quinasas eucariotas (ePK), 2, la superfamilia de las proteínas histidina quinasas (HPK) ó 3, la superfamilia de las proteínas quinasas atípicas (APK). En una forma de realización adicional el componente B es una quinasa humana o una quinasa no humana. Una descripción adicional de la invención es un complejo en el que la ePK se selecciona del grupo de quinasas que promueven la muerte reguladas por calcio/calmodulina (CaM), que consisten en la proteína quinasa asociada a la muerte (DAP quinasa, DAPk), la proteína quinasa 1 relacionada con la DAP quinasa (DRP-1), también denominada DAR quinasa 2 (DAPk2), la proteína quinasa que interactúa con la quinasa de tipo DAP/cremallera (Dik/ZIP quinasa), también denominada DAP quinasa 3 (DAPK3) y las familias de las quinasas inductoras de apoptosis relacionadas con la DAP quinasa (DRAK1 Y DRAK2), la familia del grupo de proteínas similares a las quinasas que promueven la muerte (CAMKL) reguladas por calcio/calmodulina (CaM), que consiste en por lo menos 49 subfamilias, la subunidad catalítica alfa 1 activada por AMP de la proteína quinasa (PRKAA1), la subunidad catalítica alfa 2 activada por AMP de la proteína quinasa (PRKAA2), BRSK1 y BRSK2, el homólogo del punto de control de CHK1 (CHEK1), la quinasa asociada a Neu regulada positivamente por hormonas (HUNK), la serina/treonina quinasa 11 (síndrome de Peutz-Jeghers) (STK11), las quinasas que regulan la afinidad por MAP/microtúbulos (MARK) 1-4, MARKps 01-30, ortólogo probable de la quinasa de cremallera de leucina embrionaria materna (KIAA0175), serina/treonina quinasa que contiene un dominio PAS (PASK), NIM1, QIK y SNRK, la familia del grupo de las proteínas quinasas que interactúan con el receptor del dominio de muerte (RIP quinasa), que consiste en por lo menos seis subfamilias, RIP quinasa 1, RIP quinasa 2, RIP quinasa 3 y RIP quinasa 4, dominio de repetición de anquirina 3 (ANKRD3) y SqK288, la familia del grupo de las CaM quinasas multifuncionales, que consiste en las CaM quinasas I, II, que incluye las quinasas reguladoras de la afinidad por los microtúbulos (MARK) y las proteínas similares a las quinasas 1 reguladoras de la afinidad por los microtúbulos (MARKL1), la subfamilias de quinasas CaM quinasa IV y CaM quinasa, el grupo de CaM quinasas especializadas, que consiste en la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), la fosforilasa quinasa y la CaM quinasa III (eEF-2k), la familia del grupo de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), que consiste en las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las proteínas c-Jun quinasas NH2-terminal (JNK), las subfamilias de las quinasas p38 y quinasas similares a nemo (NLK), la familia del grupo de quinasas dependientes de ciclina (CDK), que consiste en las subfamilias, quinasa relacionada con el ciclo celular (CCRK), ciclo de división celular 2 (CDC2), quinasas dependientes de ciclina (CDK) 1-11, proteína quinasa PCTAIRE (PCTK) 1-3, proteína quinasa PFTAIRE (PFTK) 1-2, y 1 similar a la 2 del ciclo de división celular (proteínas PITSLRE), la familia del grupo de la quinasa 3 alfa del factor 2 de iniciación de la traducción eucariota (EIF2AK3), también denominado (PEK), que consiste en la subfamilia de las proteínas quinasas dependiente de ARN bicatenario (dsRNA) inducible por interferón (PKR). Una forma de realización adicional de la presente invención se refiere a un complejo en el que la proteína histidina quinasa se selecciona de entre una de las once familias HPK 1-11. Una forma de realización adicional de la presente invención es un complejo en el que la aPK se selecciona de entre la familia de las proteínas alfa quinasas, que consiste en las subfamilias de la quinasa del factor 2 de elongación eucariota (eEF-2k), la quinasa de cadena pesada de miosina (MHC quinasa), las quinasas alfa 1 del factor 2 de iniciación de la traducción eucariota (E2K1) y las quinasas asociadas a canales (Chak1 y Chak2), la familia del grupo de las s/t quinasas activadas por Fas (FASTK), que consiste en la subfamilia FASTK, la familia del grupo de la proteína tirosina quinasa 9 (A6), que consiste en las subfamilias A6 y similares a la proteína tirosina quinasa 9 (A6r), la familia del grupo de las proteínas quinasas activadas por p21 (PAK), que consiste en las tres isoformas altamente

conservadas: alfa PAK (PAK1), beta PAK (PAK3) y gamma PAK (PAK2, PAK1), la familia del grupo de las quinasas asociadas al receptor de la interleucina 1 (IL-1) (IRAK), que consiste en las subfamilias IRAK-1, IRAK-2, IRAK-3 e IRAK-4, o derivados, mutantes o combinaciones de las mismas. Se han seleccionado estas quinasas debido a que mantienen su actividad en un complejo soluble. Se describe adicionalmente un complejo en el que la actividad

5 quinasas del componente B activa o inactiva directamente los componentes de las vías de regulación celular a través de la fosforilación, la acetilación, la metilación, la prenilación, y la sulfatación, que modifican la función, la expresión génica, o la viabilidad de una célula diana, de manera que un célula diana se define por la capacidad del componente A de unirse a la célula. Preferentemente, el componente B activa o inactiva componentes de las vías de regulación celular, a través de la fosforilación. De acuerdo con la invención el componente B del complejo es DAPK2

10 o EF-2K. Esas dos quinasas resultaron ser especialmente eficaces en un complejo de acuerdo con la presente invención. Una ventaja adicional de la DAPK2 es la existencia de un mutante constitutivo activo de dicha enzima que es especialmente adecuado para el complejo de la presente invención. Las DAPKs se encuentran con frecuencia inactivadas en las células tumorales humanas. El complejo de la presente invención que comprende una DAPK de este tipo resulta por tanto especialmente útil, ya que permite la reintroducción de una DAPK activa dentro de, por ejemplo, un tumor. Un complejo que comprende eEF-2k como componente B tiene la ventaja de que será activo en cualquier célula humana, ya que eEF-2k es ubicuo. Un derivado de esas quinasas se define como una quinasas constitutivamente activa que ha acumulado por lo menos una mutación y/o modificación, es decir, una delección, una sustitución, un intercambio de dominio, etc. Las mutaciones preferentes son cambios conservativos de aminoácidos, y las modificaciones preferentes son fosforilaciones, acetilaciones, metilaciones, etc. Una forma de realización

20 adicional de la presente invención es un complejo que comprende uno o más componentes complementarios S que regulan la biosíntesis de proteínas a nivel de la transcripción y/o de la traducción, y/o permite la purificación y/o la detección del complejo o de su componentes, y/o facilita la translocación de por lo menos el componente B en la célula diana y la separación intracelular en la misma, y/o la activación del componente B. Una forma de realización adicional de la presente invención es un complejo en el que los componentes se acoplan químicamente y/o se fusionan genéticamente el uno al otro. Una forma de realización adicional son los complejos genéticamente fusionados denominados *L-DARK2-Ki-4-III/T* (SEC ID N°: 2), *Ki-4-DAPk2-II/G* (SEC ID N°: 4) y *Ki-4(scFv)-eEF-2K* (SEC ID N°: 6), codificados por las moléculas de ADN correspondientes con las SEC ID N°s 1, 3 y 5, respectivamente. Una forma de realización adicional de la presente invención son una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho complejo o para componentes individuales del mismo para la preparación de tal complejo,

30 y/o un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico. La presente invención se refiere también a las células y a los organismos no humanos que sintetizan complejos completos o componentes individuales de los mismos después de haber sido transformada o transfectada con moléculas de ácidos nucleicos que codifican para tales complejos de la presente invención, o a sistemas de traducción *in vitro* que sintetizan complejos completos o componentes individuales de los mismos. Son también formas de realización adicionales descritas un organismo y/o una célula transformada o transfectada con la molécula de ácido nucleico o el vector que codifica dicho complejo o componentes del mismo, de manera que dicho organismo sea un procarionota, tal como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. carnosus*, *S. coelicolor*, y/o *Marinococcus sp.*, o un eucariota inferior, tal como *Saccharomyces sp.*, *Aspergillus sp.*, *Spodoptera sp.* y/o *P. pastoris*, o un eucariota superior no humano tal como una planta y/o un animal, y la célula sea una célula de mamífero primaria o cultivada, tal como una célula humana recién aisladas o una línea celular eucariota, tal como CHO, Cos o 293. Se describe adicionalmente un método para influir en el crecimiento y/o en la fisiología de las células transfectadas o transformadas con la molécula de ácido nucleico o el vector que codifica dicho complejo, cultivando las células en condiciones que favorezcan la actividad del complejo. Se describe adicionalmente un kit que comprende el complejo y/o la molécula de ácido nucleico y/o el vector, y/o las células y/o los procarionotas y/o los eucariotas inferiores transfectados o transformados con dichas moléculas de ácido nucleico

45 de la presente invención. Se describe adicionalmente el uso del complejo, y/o de las moléculas de ácidos nucleicos, y/o de los vectores, y/o de las células y/o de los procarionotas y/o de los eucariotas inferiores transfectados o transformados con dicha molécula de ácido nucleico y/o del kit para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como las enfermedades proliferativas cancerosas o no cancerosas, las alergias, las enfermedades autoinmunes y/o la inflamación crónica. Una forma de realización adicional es un medicamento que comprende el complejo de la invención de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12. También se describen las moléculas de ácidos nucleicos y/o los vectores y/o las células u organismos que sintetizan el complejo de la presente invención, para el tratamiento de las enfermedades proliferativas, tales como las enfermedades proliferativas cancerosas o no cancerosas, las alergias, las reacciones autoinmunes, las reacciones inflamatorias crónicas o las reacciones por rechazo de tejidos. Una forma de realización adicional es el uso *ex vivo*, *in vivo* o *in vitro* del complejo, y/o de la molécula de ácido nucleico y/o del vector, y/o de las células y/o de los organismos que sintetizan el complejo y/o del kit, para la modulación selectiva de las vías de señalización celular. Una forma de realización adicional es el uso del complejo, y/o de la molécula de ácido nucleico y/o del vector, y/o de las células y/o de los organismos que sintetizan el complejo y/o del kit para los ensayos diagnósticos, analíticos y/o de pronóstico de quinasas, y/o para el desarrollo de tales ensayos. Una forma de realización adicional es el uso del complejo de la invención para el tratamiento de las enfermedades proliferativas, tales como las enfermedades proliferativas cancerosas o no cancerosas, las alergias, las enfermedades autoinmunes, y/o la inflamación crónica.

Breve descripción de los dibujos

65 Figura 1: Clonación de pMS-(L-DAPk2-Ki-4)-III/G (SEC ID N° 1), pMS-(Ki-4-DAFk2)-II/G (SEC ID N° 3) y pMT-Ki-4(scFv)-eEF-2K (SEC ID N° 5). Calle 1-3, amplificación por PCR de DAPk2 y derivados del mismo.

Calle 4, amplificación por PCR de eEF-2K y derivados del mismo. (M, escalera de ADN; C, control negativo).

5 Figura 2: Estructura esquemática de los casetes de expresión eucariota pMS-(L-DAPk2-Ki-4)-III/G (SEC ID N° 1), pMS (Ki-4-DAPk2)-II/G (SEC ID N° 3) y la región codificadora del módulo de expresión procariona pMT-Ki-4(scFv)-eEF-2K. Leyendas: hCMV = promotor/potenciador del citomegalovirus humano; Ig-k-L = secuencia líder de la cadena kappa de la inmunoglobulina; M/H = epítipo c-Myc (EQKLISEEDL (SEC ID N°: 8)) y marcador hexa-histidina; IVS/IRES = secuencia de intervención/sitio interno de entrada al ribosomas; EGFP = proteína verde (green) fluorescente potenciada (enhanced), T7-lac = promotor del operador de la lactosa del bacteriófago T7; pelB = secuencia líder/señal de la peptidasa B bacteriana de *Erwinia carotovora* EC; His₁₀ = marcador deca-histidina; V_H = cadena pesada (heavy) variable de la inmunoglobulina; V_L = cadena ligera variable de la inmunoglobulina, (G₄S)₃ = conector (Glicina x 4 - serina) x 3; ATG = codón de iniciación de la traducción; Stop = codón de terminación de la traducción; DAPk2 = proteína quinasa asociada a la muerte (death) 2/DRP-1; eEF-2K = quinasa (kinase) del factor 2 de elongación eucariota; Ki-4 = fragmento variable monocatenario (scfv) derivado de inmunoglobulina anti CD30.

20 Figura 3: Propiedades de unión de las inmuoquinasas anti-CD30 recombinantes. Unión de pMS-(L-DAPk2-Ki-4)-III/G (SEC ID N° 2) a las células positivas para CD30 por citometría de flujo. Las células se tiñeron con inmuoquinasa purificada (B) o con PBS como control negativo (A).

25 Figura 4: Inhibición del crecimiento de líneas celulares positivas para CD30 derivadas de Hodgkin después de la incubación con pMS-(L-DAPk2-Ki-4)-III/G como se documenta mediante ensayos de viabilidad celular. Las células L-540Cy se trataron con diferentes diluciones de inmuoquinasa anti-CD30 recombinante, y se midió su capacidad para metabolizar el XTT a una sal de formazán soluble en agua como la absorbancia a 450 y 650 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como porcentaje de las células control no tratadas con respecto al control positivo tratado con Zeocina.

30 Figura 5: Secuencia de ácidos nucleicos del marco de lectura abierto (ORF) de la construcción pMS-(L-DAPk2'-Ki-4)-III/G.

Figura 6: Secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto (ORF) de la construcción pMS-(L-DAPk2'-Ki-4)-III/G.

35 Figura 7: Secuencia de ácidos nucleicos del ORF de la construcción pMS-(L-DAPk2'-Ki-4)-II/G.

Figura 8: Secuencia de aminoácidos del ORF de la construcción pMS-(L-DAPk2'-Ki-4)-II/G.

40 Figura 9: Secuencia de ácidos nucleicos del ORF de la construcción pMT-Ki4(scFv)-eEF-2K.

Figura 10: Secuencia de aminoácidos del ORF de la construcción pMT-Ki4(scFv)-eEF-2K.

Figura 11: Secuencia de aminoácidos del conector sintético.

45 Figura 12: Secuencia de aminoácidos del epítipo c-Myc.

Figura 13: Motivo en el dominio IX de las quinasas.

50 Descripción detallada de la invención

El complejo de acuerdo con la invención es un complejo heterólogo recombinante que comprende por lo menos dos dominios, es decir, un dominio efector y por lo menos un dominio de unión específico de célula. El complejo de acuerdo con la invención es utilizable para el diagnóstico y la terapia de enfermedades.

55 La invención descrita en el presente documento se inspira en las solicitudes de patente en trámite y en los trabajos publicados con anterioridad. A modo de ejemplo, tales trabajos consisten en artículos científicos, patentes o solicitudes de patente en trámite. Todas estas publicaciones y solicitudes, citadas anteriormente o más adelante se incorporan en el presente documento por referencia.

60 Definiciones

65 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inmunotoxina" se refiere a moléculas químicas en las que un anticuerpo monoclonal de unión a células o fragmentos del mismo se acopla químicamente o se fusiona genéticamente a toxinas o a sus subunidades. La parte de toxina de la inmunotoxina puede derivarse de diversas fuentes, tales como plantas, animales, microorganismos superiores e inferiores tales como bacterias y hongos y, en concreto si la toxina es una enzima catalítica, la enzima puede ser de origen humano. La toxina también puede ser

un fármaco sintético. Las inmunotoxinas así como sus construcciones se han revisado anteriormente y son conocidas para el experto en la materia.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inmunoquinasa" se refiere a moléculas quiméricas en la que un anticuerpo monoclonal de unión a células o a fragmentos de las mismas se acopla o se fusiona a quinasas o a sus subunidades que albergan la actividad quinasa. El término inmunoquinasa es un sinónimo del complejo de la presente invención.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "componente A" del complejo representa la estructura de unión activa del complejo de la presente invención. El componente A se selecciona del grupo de estructuras de unión activa que consiste en anticuerpos, péptidos sintéticos tales como scFv, mimotopos. También se describen como ligandos moléculas químicas tales como carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, péptidos, vitaminas, etc., y/o moléculas pequeñas con hasta 100 átomos con actividad de unión al receptor, en concreto átomos individuales, moléculas peptídicas y moléculas no peptídicas, etc., y/o proteínas de unión a carbohidratos de la superficie celular y sus ligandos tales como lectinas, en concreto calnexinas, lectinas de tipo o, lectinas de tipo l, lectinas de tipo m, lectinas de tipo p, lectinas de tipo r, galectinas y sus derivados, y/o moléculas de unión a receptores tales como ligandos naturales para los antígenos de diferenciación (CD), como CD30, CD40, etc., citocinas, tales como quimiocinas, factores estimuladores de colonias, citocinas de tipo 1, citocinas de tipo 2, interferones, interleucinas, linfocinas, monocinas, etc., y/o moléculas de adhesión que incluyen sus derivados y mutantes, y/o derivados o combinaciones de cualquiera de las estructuras de unión activa anteriormente mencionadas, que se unen a antígenos CD, receptores de citocinas, receptores hormonales, receptores del factor de crecimiento, bombas de iones, proteínas formadoras de canales. Se describe que el componente A también puede seleccionarse del grupo de estructuras de unión pasiva que consisten en alérgenos, alérgenos peptídicos, alérgenos recombinantes, anticuerpos idiotípicos de alérgeno, estructuras que provocan la respuesta autoinmune, estructuras que inducen el rechazo de tejidos, regiones constantes de las inmunoglobulinas y sus derivados, mutantes o combinaciones de los mismos. Puede generarse un componente A con una valencia mayor combinando por lo menos dos estructuras de unión idénticas o diferentes seleccionadas de entre los grupos anteriormente mencionados.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, y fragmentos de los mismos, tales como Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos que conservan la función de unión al antígeno y la especificidad del anticuerpo parental.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición de anticuerpos que tiene una población homogénea de anticuerpos. La expresión no se limita con respecto a las especies o a la fuente del anticuerpo, ni pretende estar limitada por la manera en que se hace. La expresión abarca inmunoglobulinas enteras así como fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, y otros que conservan la función de unión al antígeno y la especificidad del anticuerpo. En la presente invención pueden utilizarse anticuerpos monoclonales de cualquier especie de mamífero, sin embargo, en la práctica, los anticuerpos serán por lo general de origen murino o de rata debido a la disponibilidad de las líneas celulares murinas o de rata para su uso en la fabricación de los hibridomas o líneas celulares híbridas requeridas para producir los anticuerpos monoclonales.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpos humanos" significa que las regiones marco de una inmunoglobulina se derivan de las secuencias de inmunoglobulinas humanas.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "fragmentos de anticuerpos monocatenarios" (scFv) se refiere a anticuerpos preparados determinando los dominios de unión (cadenas pesada y ligera) de un anticuerpo de unión, y suministrando un resto de unión, que permite conservar la función de unión. Esto forma, en esencia, un anticuerpo radicalmente abreviado, que tiene solamente esa parte del dominio variable necesaria para la unión al antígeno. La determinación y la construcción de anticuerpos monocatenarios se describe en la patente U.S. N° 4.946.778 de Ladner *et al.*

55 El "componente B" descrito por la presente invención representa el resto "quinasa diana" de la inmunoquinasa de la presente invención y puede seleccionarse de entre cualquier quinasa conocida en la técnica. En la actualidad, en las bases de datos públicas se encuentran disponibles para el análisis más de 5.000 secuencias similares a las de las quinasas de diversas especies. El genoma humano parece codificar para 510 proteínas quinasas además de muchos genes de proteínas pseudoquinasas, y éstos se han subclasificado en más de 57 familias. Es muy posible que haya otras proteínas quinasas que estén aún por identificar (<http://www.kinexus.ca/kinases.htm>). Sin embargo, tal como se describe, el componente B se elige de entre las siguientes tres clases de quinasas, todas ellas conocidas por ser activas en los seres humanos y por conservar su actividad quinasa en un complejo soluble, 1. la superfamilia de las proteínas quinasas eucariotas (ePK), 2. la superfamilia de las proteínas histidina quinasas (HPK), ó 3. la superfamilia de las proteínas quinasas atípicas (aPK). De acuerdo con la invención el componente B se elige de entre la superfamilia de las ePK, a saber, de entre el grupo de las quinasas que promueven la muerte reguladas por calcio/calmodulina (CaM), que consiste en la proteína quinasa asociada a la muerte (DAP quinasa, DAPk), la proteína quinasa 1 relacionada con la proteína quinasa DAP (DRP 1), también denominada DAP quinasa 2 (DAPk2). También se describen la proteína quinasa que interactúa con la quinasa de tipo DAP/cremallera (Dik/ZIP quinasa),

también denominada DAP quinasa 3 (DAPK3) y las familias de las quinasas inductoras de apoptosis relacionadas con la DAP quinasa (DRAK1 Y DRAK2), la familia del grupo de proteínas similares a las quinasas que promueven la muerte (CAMKL) reguladas por calcio/calmodulina (CaM), que consiste en por lo menos 49 subfamilias, la subunidad catalítica alfa 1 activada por AMP de la proteína quinasa (PRKAA1), la subunidad catalítica alfa 2 activada por AMP de la proteína quinasa (PRKAA2), BRSK1 y BRSK2, el homólogo del punto de control de CHK1 (CHEK1), la quinasa asociada a Neu regulada positivamente por hormonas (HUNK), la serina/treonina quinasa 11 (síndrome de Peutz-Jeghers) (STK11), la quinasa que regula la afinidad por MAP/microtúbulos (MARK) 1-4, MARKps 01-30, ortólogo probable de la quinasa de cremallera de leucina embrionaria materna (KIAA0175), serina/treonina quinasa que contiene un dominio PAS (PASK), NIM1, QIK y SNRK, la familia del grupo de las proteínas quinasas que interactúan con el receptor del dominio de muerte (RIP quinasa), que consiste en por lo menos seis subfamilias, RIP quinasa 1, RIP quinasa 2, RIP quinasa 3 y RIP quinasa 4, dominio de repetición de anquirina 3 (ANKRD3) y SqK288, la familia del grupo de las CaM quinasas multifuncionales, que consiste en las CaM quinasas I, II, que incluye las quinasas reguladoras de la afinidad por los microtúbulos (MARK) y las proteínas similares a las quinasas 1 reguladoras de la afinidad por los microtúbulos (MARKL1), la subfamilias de quinasas CaM quinasa IV y CaM quinasa, el grupo de CaM quinasas especializadas, que consiste en la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), la fosforilasa quinasa. La CaM quinasa III (eEF-2k) también es una forma de realización del componente B de la invención. Se describe adicionalmente la familia del grupo de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), que consiste en las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las proteínas c-Jun quinasas NH2-terminal (JNK), las subfamilias de las quinasas p38 y quinasas similares a nemo (NLK), la familia del grupo de quinasas dependientes de ciclina (CDK), que consiste en las subfamilias, quinasa relacionada con el ciclo celular (CCRK), ciclo de división celular 2 (CDC2), quinasas dependientes de ciclina (CDK) 1-11, proteína quinasa PCTAIRE (PCTK) 1-3, proteína quinasa PFTAIRE (PFTK) 1-2, y 1 similar a la 2 del ciclo de división celular (proteínas PITSLRE), la familia del grupo de la quinasa 3 alfa del factor 2 de iniciación de la traducción eucariota (EIF2AK3), también denominado (PEK), que consiste en la subfamilia de las proteínas quinasas dependientes de ARN bicatenario (dsRNA) inducibles por interferón (PKR). También se describe el componente B seleccionado de la superfamilia HPK, es decir seleccionado del grupo de por lo menos once familias HPK 1-11. De acuerdo con la invención el componente B se elige de entre la superfamilia de las aPK, es decir la quinasa del factor 2 de elongación eucariota (eEF-2k). También se describen las subfamilias de la quinasa de cadena pesada de miosina (MHC quinasa), la alfa quinasa 1 del factor 2 de iniciación de la traducción en eucariotas (E2K1) y las quinasas asociadas a canales (Chak1 y Chak2), la familia del grupo de s/t quinasas activadas por Fas (FASTK), que consiste en la subfamilia FASTK, la familia del grupo de la proteína tirosina quinasa 9 (A6), que consiste en las subfamilias A6 y similares a la proteína tirosina quinasa 9 (A6r), la familia del grupo de las proteínas quinasas activadas por p21 (PAK), que consiste en las tres isoformas altamente conservadas: alfa PAK (PAK1), beta PAK (PAK3) y gamma PAK (PAK2, PAKI), la familia del grupo de las quinasas asociadas al receptor de la interleucina 1 (IL-1) (IRAK), que consiste en las subfamilias IRAK-1, IRAK-2, IRAK-3 e IRAK-4.

La expresión "célula diana" o "tejido diana" se refiere a células o tejidos que llevan una estructura de superficie extracelular a la que el componente A del complejo se une activa o pasivamente. Las células diana y los tejidos diana son por tanto células y tejidos a los que puede unirse el componente A del complejo. Las células diana y los tejidos diana se caracterizan adicionalmente por su capacidad para internalizar el complejo de acuerdo con la presente invención tras la unión del componente A.

El término "soluble" se refiere a la capacidad del complejo para permanecer en solución cuando se expresa de manera recombinante, en concreto durante la purificación de las proteínas, lo que permite altos rendimientos. El término "soluble" se refiere también al estado del complejo en los sistemas de fluidos dentro de un organismo, hasta que se une específicamente a la célula/al tejido diana. El término también se refiere al estado del complejo dentro de la célula tras la liberación desde cualquier tipo de vesículas de incorporación.

El término "endógeno" se refiere a la localización del complejo en el entorno/ambiente de una célula/un tejido diana dado.

El término sintético se refiere a un complejo hecho por el ser humano, que no se encuentra en la naturaleza. El término también comprende el significado de "recombinante".

El término "recombinante" se refiere a la preparación de moléculas, en concreto, la unión covalente de moléculas de diferentes fuentes, mediante cualquiera de los métodos conocidos de la biología molecular. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "recombinante" se refiere en concreto a la fusión de la parte de anticuerpo a la parte de toxina mediante cualquiera de los métodos conocidos de la biología molecular, tal como a través de la producción de anticuerpos monocatenarios. La molécula de ADN recombinante que codifica la proteína de fusión recombinante que comprende la parte de anticuerpo y la parte de toxina se expresan de manera recombinante. La inmunotoxina recombinante producida de esta manera puede aislarse mediante cualquier técnica adecuada conocida en el campo de la tecnología de expresión del ADN recombinante para este propósito.

El término "derivado" se refiere a una proteína mutada o modificada que ha conservado su actividad que le caracteriza, es decir, la actividad de unión o la actividad quinasa. Son especialmente preferentes los derivados constitutivamente activos. El término derivado comprende las proteínas que llevan por lo menos una delección,

adición, sustitución de aminoácidos, un intercambio de un solo dominio o por lo menos una modificación de por lo menos un aminoácido. Son preferentes los derivados que llevan 20 de tales cambios, son más preferentes aquellos con 10 de tales cambios y los más preferentes son aquellos con 1 a 5 de tales cambios. Las modificaciones que pueden producirse, son la fosforilación, la acetilación, la metilación, la prenilación y la sulfatación.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vector" comprende formas de ADN y ARN de un plásmido, un cósmido, un fago, fagémido, derivados de los mismos, o un virus. Un vector comprende secuencias de control y secuencias codificadoras.

10 La expresión "expresión de genes recombinantes que codifican el complejo recombinante", en el que el complejo recombinante es un polipéptido de fusión de resto de toxina-anticuerpo monocatenario, también denominado inmunoquinasa recombinante, se refiere a la transformación y/o la transfección de una célula hospedadora con un ácido nucleico o un vector que codifica dicho complejo, y el cultivo de dichas células hospedadoras seleccionadas del grupo de bacterias, tales como *E. coli*, y/o en levaduras, tales como en *S. cerevisiae*, y/o en líneas celulares establecidas de insectos o mamíferos, tales como células CHO, COS, BHK, 293T y MDCK, y/o en células primarias, tales como células humanas, células de vertebrados no humanos, y/o en células de invertebrados tales como células de insectos, y la síntesis y la traducción del ARNm correspondiente, que da lugar finalmente a la proteína recombinante, el complejo recombinante. En mayor detalle, la expresión "expresión de genes recombinantes que codifican el complejo recombinante", comprende las siguientes etapas:

20 Transformación de un hospedador celular apropiado con un vector recombinante, en el que se ha insertado una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de fusión bajo el control de los elementos reguladores apropiados, en concreto un promotor reconocido por las polimerasas del hospedador celular. En el caso de un hospedador procarionta, un sitio de unión al ribosoma (RBS) apropiado también precede a la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de fusión, lo que permite la traducción en dicho hospedador celular. En el caso de un hospedador eucariota puede proporcionarse cualquier pre/pro secuencia o secuencia señal artificial, o puede emplearse la secuencia señal natural. El hospedador celular transformado se cultiva en condiciones que permiten la expresión de dicho inserto.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "citólisis de las células que expresan el antígeno" se refiere a la inhibición de la síntesis de proteínas o la inducción de la apoptosis, que da como resultado la eliminación o la muerte de estas células.

35 La expresión "componentes complementarios S", se refiere a un componente adicional del complejo que comprende A y B. El componente complementario S aporta características y propiedades al complejo que permiten una preparación eficaz y/o que modifican la eficacia del complejo:

- la regulación inducible de la transcripción/traducción (por ejemplo, promotores inducibles),
- el control de la biosíntesis de proteínas (por ejemplo, secuencias líder);
- 40 – la purificación/detección del complejo o de sus componentes (por ejemplo, los marcador His, los marcadores de afinidad);
- la translocación de los agentes apoptóticos en las células diana (por ejemplo, el dominio translocación, las secuencias anfipáticas),
- la activación/separación intracelular del componente B (progranzima B sintética, secuencias anfipáticas).

45 De esta manera, el componente S se selecciona del grupo de promotores inducibles, secuencias líder, marcadores de afinidad, marcadores His, dominio de translocación, secuencias anfipáticas y progranzima B sintética. La invención también se refiere a moléculas de ácidos nucleicos, tales como ADN y/o ARN, o vectores, que codifican para el complejo de la presente invención o para los componentes individuales para preparar el complejo. La viabilidad de la expresión de los ácidos nucleicos que codifican un complejo recombinante en células eucariotas de origen humano se documenta con éxito en el presente documento, así como la viabilidad del uso del complejo como agente de apoptosis específico en las células eucariotas de origen humano. Esto sugiere la idoneidad de los ácidos nucleicos que codifican para un complejo de acuerdo con la invención también para los enfoques genoterapéuticos en líneas no germinales. Una persona experta en la materia es capaz de reconocer los diversos aspectos y posibilidades de las intervenciones genoterapéuticas en relación a las diversas enfermedades a tratar. Además de la aplicación local de vectores relativamente no específicos (por ejemplo, lípidos catiónicos, vectores no virales, adenovirales y retrovirales), una aplicación sistémica con vectores específicos para células diana modificados también será posible en el futuro próximo. Los complejos y las moléculas de ácidos nucleicos y/o los vectores que codifican para los complejos de la presente invención, se utilizan para la preparación de medicamentos para intervenciones genoterapéuticas en líneas no germinales, para la aplicación local o sistémica. Una alternativa interesante a la aplicación sistémica es la transfección *ex vivo* bien dirigida de poblaciones definidas de células y su retorno al organismo, o el uso de poblaciones definidas de células transfectadas *ex vivo* para la preparación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades asociadas con estas poblaciones de células.

65

También se reivindican células o sistemas de traducción *in vitro*, que sintetizan complejos completos de acuerdo con la invención o componentes individuales de los mismos, después de la transformación y/o la transfección con, o la adición de, los vectores o las moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención.

5 Las células o los organismos de acuerdo con la invención son de origen procariota, especialmente de *E. coli*, *B. subtilis*, *S. carnosus*, *S. coelicolor*, *Marinococcus sp.*, o de origen eucariota, especialmente de *Saccharomyces sp.*, *Aspergillus sp.*, *Spodoptera sp.*, *P. pastoris*, células de mamíferos primarias o cultivadas, líneas celulares eucariotas (por ejemplo, CHO, Cos ó 293) o plantas (por ejemplo, *N. tabacum*).

10 La invención también se refiere a medicamentos que comprenden el complejo de acuerdo con la presente invención. Por lo general, los complejos de acuerdo con la invención se administran en formas de dosificación fisiológicamente aceptables. Estas incluyen, por ejemplo, Tris, NaCl, tampones fosfato y todos los sistemas tampón aprobados, que incluyen especialmente los sistemas tampón, que se caracterizan por la adición de estabilizadores de proteínas aprobados. La administración se lleva a cabo, en concreto, por vía parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratumoral, administraciones transnasales, y mediante aplicación transmucosa. La dosificación de los complejos de acuerdo con la invención a administrar debe establecerse para cada aplicación en cada enfermedad a ser recién tratada mediante estudios clínicos de fase I (estudios de escalonamiento de dosis).

20 Los ácidos nucleicos o vectores, que codifican para un complejo de acuerdo con la invención, se administran ventajosamente en formas de dosificación fisiológicamente aceptables. Estas incluyen, por ejemplo, Tris, NaCl, tampones de fosfato y todos los sistemas tampón aprobados, que incluyen especialmente los sistemas tampón, que se caracterizan por la adición de estabilizadores aprobados para ácidos los nucleicos y/o los vectores a utilizar. La administración se realiza, en concreto, por vía parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratumoral, administraciones transnasales, y mediante aplicación transmucosa.

25 El complejo de acuerdo con la invención, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para las mismas y/o las células o los sistemas de traducción *in vitro* pueden utilizarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades tumorales, las alergias, las enfermedades autoinmunes y las reacciones inflamatorias crónicas/agudas.

30 **Resultados**

Después de la construcción de tres tipos de complejos recombinantes (inmunoquinasas), los primeros resultados obtenidos demostraron su calidad superior con respecto a la especificidad de unión así como a la citotoxicidad.

35 Construcción y expresión de un complejo recombinante (inmunoquinasa)

Se clonó direccionalmente ADN de DAPk2' amplificado por PCR (Fig. 1) en el vector de expresión eucariota pMS-(L-ANG-Ki-4)-III/G resistente a la ampicilina que contenía una secuencia líder *Igk* (L) en el extremo N-terminal, Ki-4(scFv) (componente A) y un epítipo Myc- y His-Tag en tándem en el extremo C-terminal de el casete de expresión (Fig. 2). Se verificó el éxito de la clonación mediante análisis de la secuencia de ADN. Tres días después de la transfección de células 293T, se detectó el complejo recombinante esperado de tamaño apropiado (inmunoquinasa) pMS-(L-DAPk2-Ki-4)-III/G ($M_r \sim 66.000$) mediante análisis de transferencia Western de las minipreparaciones de proteínas. Las células del productor transfectado se cultivaron adicionalmente bajo presión de selección con Zeocina en matraces de cultivo con medio y se utilizaron para la producción a mayor escala del complejo recombinante (inmunoquinasa) pMS-(L-DAPk2-Ki-4)-III/G. En condiciones de cultivo normales, se purificaron entre 0,1 y 0,5 μg de la proteína recombinante a partir de 1 ml de sobrenadante del cultivo celular mediante un procedimiento de purificación de Ni-NTA de una sola etapa. Se secretó el complejo recombinante intacto (inmunoquinasa) en el sobrenadante de las células 293T transfectadas, tal como se visualizó por inmunotransferencia utilizando anticuerpo monoclonal de ratón anti-penta-His.

Se clonó direccionalmente ADN de eEF-2K que codificaba el componente B (Fig. 1, 4a-e) en el vector de expresión procariota pBM-Ki-4(scFv) resistente a la kanamicina derivado de pET que contenía un operador *lac* inducible por IPTG, un péptido señal *pelB* seguido de un marcador His₁₀ escindible por enteroquinasa, y Ki-4-(scFv) (componente A) (Fig. 2). Se verificó el éxito de la clonación de la construcción del complejo recombinante pMT-Ki-4 (scFv)-eEF-2K mediante análisis de la secuencia de ADN. Después de la transformación, se cultivaron clones de *E. coli* BL21 StarTM (DE3) recombinante en condiciones de estrés osmótico en presencia de solutos compatibles. El complejo recombinante (inmunoquinasa) se dirigió al espacio periplásmico y la proteína funcional pMT-Ki-4(scFv)-eEF-2K ($M_r \sim 113.000$) se purificó directamente por combinación de IMAC y SEC hasta una pureza > 90%. Se preparó rutinariamente por lo menos 1 mg de proteína pMT-Ki-4(scFv)-eEF-2K purificada a partir de 1 litro de cultivos bacterianos en agitación. El complejo recombinante intacto (inmunoquinasa) se secretó al compartimento periplásmico, tal como se visualizó por inmunotransferencia utilizando anticuerpo monoclonal de ratón anti-penta-His.

65

Propiedades de unión de los complejos recombinantes (inmunoquinasas)

La fusión de las regiones codificadoras Ki-4(scFv), el componente A del complejo, a las secuencias codificadoras de la quinasa, el componente B del complejo, no influyó en la actividad de unión del formato de anticuerpo V_H/V_L del componente A. El componente A confería especificidad frente a la molécula CD30. El complejo recombinante purificado (inmunoquinasa) que comprende el componente A anti-CD30 siempre se unía a la línea celular derivada de Hodgkin L540Cy según se midió por citometría de flujo (Fig. 3)

Actividad citotóxica *in vitro*

Para caracterizar la actividad citotóxica del complejo recombinante que comprendía anti-CD30 (como componente A) y quinasas (componente B) *in vitro*, se evaluó la proliferación de las diferentes células diana después de la incubación con diferentes cantidades de los complejos recombinantes (inmunoquinasas) pMS-(L-DAPk2-Ki-4)-III/G y pMT-Ki-4(scFv)-eEF-2K, respectivamente. La inhibición del crecimiento de las líneas celulares positivas para CD30 L540Cy y HL60 se documentó mediante un ensayo colorimétrico basado en XTT. Se observaron efectos tóxicos sólo frente a células positivas para CD30 con una mediana calculada IC₅₀ de entre 4 y 35 ng/ml en las células L540Cy (Fig. 4). Las líneas celulares Ramos negativas para CD30 y 8701-BC no se vieron influidas por concentraciones de inmunoquinasa recombinante de hasta 10 µg/ml. Por tanto, el componente A (scFv anti-CD30) del complejo confería especificidad al complejo recombinante, limitando los efectos citotóxicos del dominio quinasa a las células diana seleccionadas.

EjemplosCepas bacterianas, oligonucleótidos, y plásmidos

Se utilizó *E. coli* XL1-blue (supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyr A46 thi relA1 lacF'[PRO AB⁺ lacI^q lacZ ?M15 Tn10 (tet^r)] para la propagación de los plásmidos, y *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (F⁻ ompT hsdS_B(r_Bm_B⁻) gal dcm rne 131 DE3) como hospedador para la síntesis de inmunoquinasas recombinantes. Se sintetizaron oligonucleótidos sintéticos mediante MWG Biotech (Ebersberg, Alemania). El vector de expresión bacteriano PBM-Ki-4 se deriva del plásmido pET27b (Novagen, Madison, EE.UU.), y se utiliza para la expresión de la fusión C-terminal de los dominios NotI/BlnI quinasa para el scFv anti-CD30 (Klimka, A. *et al.*, 1999). Los vectores de expresión eucariotas pMSKAngII y pMSLAngKIII se derivan del plásmido pSecTag (Invitrogen, San Diego, EE.UU.) y se utilizan para la fusión N-terminal o C-terminal de los dominios XbaI/BlnI quinasa para Ki-4 (scFv) (Stöcker, M. *et al.*, 2003). Los plásmidos se prepararon mediante el método de lisis alcalina y se purificaron utilizando kits de preparación de plásmidos de Qiagen (Hilden, Alemania). Los fragmentos de restricción o los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa horizontal y se extrajeron con QIAquick (Qiagen). Todos los procedimientos de clonación estándar se llevaron a cabo como describen Sam Brook, J. *et al.*, 1989.

Cultivo celular

Todas las líneas celulares, que incluyen las líneas celulares positivas para CD30 L540Cy (Kapp, U. *et al.*, 1992) y HL-60 (Thepen, T. Utrecht, Países Bajos), las líneas celulares Ramos negativas para CD30 (ATCC, VA, EE.UU.) y 8701-BC (Minafra, S. *et al.*, 1989) y la línea celular 293T productora (ATCC) se cultivaron en un medio complejo (RPMI 1640) complementado con suero de ternera fetal inactivado por calor al 10% (v/v), 50 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Todas las células se cultivaron a 37°C en atmósfera de aire con CO₂ al 5%. Para la selección de las células transfectadas, se añadió Zeocina (Invitrogen) a una concentración final de 100 µg/ml.

Construcción y expresión de los complejos recombinantes (inmunoquinasas)*Clonación y expresión de pMS-(L-DAPk2-Ki-4)-III/G (SEC ID N° 1) y pMS-(Ki-4-DAPk2)-II/G (SEC ID N° 3)*

Para la construcción de un vector que codifica un complejo recombinante con fusiones DAP-quinasa 2 (DAPk2) N-terminales o C-terminales, se amplificó DAPk2 por PCR para introducir los sitios de restricción XbaI y BlnI. Después de la digestión con XbaI/BlnI, se clonó el producto de la PCR en el vector de expresión eucariota pMS-(L-ANG-Ki-4)-III/G y pMS-(Ki-4-ANG)-II/G respectivamente, digerido con las mismas enzimas de restricción. Las construcciones recombinantes resultantes pMS-(L-DAPk2-Ki-4)-III/G (SEC ID N° 1) y pMS-(Ki-4-DAPk2)-II/G (SEC ID N° 3) que codificaban las proteínas inmunoquinasas L-DAPk2-Ki-4-MH (SEC ID N° 2) y L-Ki-4-DAPk2-MH (SEC ID N° 4) se verificaron mediante análisis de secuencias. Después de la transformación mediada por TransFast (Promega, Mannheim, Alemania) en células 293T, la inmunoquinasa recombinante se expresó como describen Stöcker M. *et al.*, 2003. En resumen, se han utilizado un µg de ADN de plásmido y 3 µg de TransFast de acuerdo con el protocolo del fabricante para placas de cultivo celular de 12 pocillos. La eficacia de la transfección fue de entre el 75% y el 95% determinada mediante recuento de células verdes fluorescentes. Tres días después de la transfección inicial, se analizaron los sobrenadantes de los cultivos celulares en busca de proteína recombinante. Posteriormente, las células transfectadas se transfirieron a matraces de cultivo celular de tamaño medio (Nunc; 85m²) y se cultivaron en medio complejo RPMI complementado con 100 µg/ml de Zeocina. Los clones de una a dos

semanas transfectados productivamente eran de color verde fluorescente y por lo tanto pudieron detectarse por microscopía de fluorescencia. Las poblaciones de células transfectadas se establecieron por subcultivo de estos clones. Se llevaron a cabo las purificaciones de las proteínas marcadas con His mediante el método de afinidad por los metales Ni-NTA (Hochuli, V., 1989, Porath, J. y col., 1975) (Qiagen). La purificación de proteínas siguió un protocolo modificado para la purificación de la proteína nativa de Qiagen (*The Expressionist 07/97*). Para la minipreparación de proteínas, se complementaron 900 µl de sobrenadante del cultivo celular aclarado por centrifugación con 300 µL de tampón de incubación 4x (200 mM de NaH₂PO₄, pH 8,0; 1,2M de NaCl; 40 mM de imidazol) y 30 µl de Ni-NTA al 50%. Tras 1 hora de incubación, se sedimentó la resina de Ni-NTA por centrifugación. Después de lavar el sedimento dos veces en 175 µl de tampón de incubación 1x, se eluyó la proteína unida con 30 µl de tampón de elución (50 mM de NaH₂PO₄, pH 8,0; NaCl 1,2 M y 40 mM de imidazol) y 30 µl de Ni-NTA al 50%. Tras 1 hora de incubación, se sedimentó la resina de Ni-NTA por centrifugación. Después de lavar el sedimento dos veces en 175 µl de tampón de incubación 1x, la proteína unida se eluyó con 30 µl de tampón de elución (50 mM de NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM de NaCl; 250 mM de imidazol) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la purificación a mayor escala de las proteínas expresadas eucarióticamente hasta 500 ml de sobrenadante del cultivo celular en una estación de trabajo BioLogic (Bio-Rad, EE.UU.). Los sobrenadantes del cultivo celular se cargaron en una columna de Ni-NTA y la elución siguiente de las proteínas marcadas con His se hizo bajo las condiciones que se han descrito anteriormente.

Clonación y expresión de pMT-Ki-4(scFv)-eEF-2K

Se amplificó por PCR la quinasa del factor 2 de elongación eucariota (EEF-2k) para introducir los sitios de restricción *NotI* y *BspI*. Después de la digestión con *NotI/BspI*, se clonó el fragmento amplificado por PCR en el vector de expresión bacteriano PBM-Ki-4, digerido con las mismas enzimas de restricción. Se verificó la construcción recombinante resultante pMT-Ki-4(scFv)-eEF-2K (SEC ID N°: 5) mediante análisis de secuencias de ADN. Después de la transformación en BL21 Star™ (DE3), la inmuoquinasa Ki-4(scFv)-eEF-2K (SEC ID N° 6) se expresó periplásmicamente bajo estrés osmótico en presencia de solutos compatibles como describen Barth, S. *et al.* 2000. En resumen, las bacterias transformadas se recogieron 15 horas después de la inducción con IPTG. El sedimento bacteriano se resuspendió en tampón de sonicación (75 mM de Tris/HCl (pH 8), 300 mM de NaCl, 1 cápsula de inhibidores de la proteasa/50 ml (Complete™, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), 5 mM de DTT, 10 mM de EDTA, glicerol al 10% (v/v)) a 4°C y se sonicó 6 veces durante 30 segundos a 200 W. La fusión de proteínas m22(scFv)-ETA' se enriqueció mediante IMAC (cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados) utilizando una sefarsa quelante de níquel-nitroacético (Qiagen) y SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) con columnas Bio-Prep SE-100/17 (Biorad, München, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína recombinante se eluyó con PBS (pH 7,4) y NaCl 1 M, se analizó mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio/poliacrilamida (SDS-PAGE), se cuantificó por densitometría (densitómetro de imágenes SG-700; Biorad) después de la tinción de Coomassie en comparación con los estándares BSA y se verificó mediante ensayos de Bradford (BioRad).

Análisis SDS-PAGE y transferencia de Western

Se realizaron el SDS-PAGE, la tinción de Coomassie, y la transferencia de Western como describen Barth, S. *et al.*, 1998. En resumen, las inmuoquinasas recombinantes marcadas con His se detectaron mediante AcMo de ratón anti-penta-His (Qiagen). El anticuerpo unido se detectó mediante AcMo de burro anti IgG de ratón conjugado con rábano (Dianova, Hamburgo, Alemania), seguido de mediada por ECL (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania), reacción de quimioluminiscencia y exposición a película de rayos X apropiada (Roche, Penzberg, Alemania) o AcMo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co., Deisenhofen, Alemania) y una solución de Tris-HCl (pH 8,0) y 0,2 mg/ml de naftol-AS-Bi-fosfato (Sigma Chemical Co.) complementado con 1 mg/ml de Fast-Red (Serva, Heidelberg, Alemania).

ELISA de membrana celular (CM)

La actividad de unión de los complejos recombinantes (inmuoquinasas) se determinó mediante ELISA-CM utilizando membranas activas biológicas de células tumorales como han descrito recientemente Tur, MK. *et al.*, 2003. En resumen, se recubrieron placas ELISA Maxisorp (Nalge Nunc International, Roskilde, Dinamarca) con 100 µl (~ 0,9 mg de proteína/ml) de fracciones de membrana recién preparadas de células L540Cy/HL60 positivas para CD30 y Ramos/8701-BC como control en tampón bicarbonato 0,02 M, pH 9,6, durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron cinco veces con PBS (pH 7,4) que contenía Tween 20 al 0,2% (TPBS) y se bloquearon con 200 µl de BSA al 2% en PBS. Después incubarse durante toda la noche a 4°C, se lavaron las placas cinco veces con TPBS y 1-10 µg/ml de inmuoquinasas recombinantes diluidas con 0,5% de BSA (p/v) y se añadió Tween 20 al 0,05% (v/v) en PBS a las placas y se incubaron a temperatura ambiente (23°C) durante 1 hora. Se añadió el conjugado IgG anti His marcado con peroxidasa (Qiagen) diluido con BSA al 0,5% y Tween 20 al 0,05% en PBS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos unidos se visualizaron después de la adición de 100 µl de solución 2',2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Alemania) midiendo la extinción a 415 nm con un lector de ELISA (MWG Biotech).

Análisis por citometría de flujo

Se evaluó la actividad de unión a las células de los complejos recombinantes (inmunoquinasas) expresados en *E. coli* BL21 Star™ (DE3) utilizando un instrumento de citometría de flujo FACSCalibur y el software CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Las células se tiñeron con proteína recombinante como se ha descrito (25). En resumen, se recogieron diez mil eventos para cada muestra, y los análisis de las células intactas se realizaron utilizando ventanas de análisis adecuadas para excluir los agregados y los residuos celulares. Se incubaron 5×10^5 células durante 1 hora sobre hielo con 50 μ l de extracto de proteína bacteriana a una concentración de 30-40 μ g/ml o 100 μ l de la inmunoquinasa que contenía sobrenadantes respectivamente. Las células se lavaron con tampón PBS que contenía de BSA al 0,2% en p/v y azida de sodio al 0,05% en p/v (PBA) y a continuación se incubaron durante 30 minutos con AcMo anti-penta-His (Qiagen) diluido 1:2 en tampón de PBA. Las células se lavaron y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako Diagnostica, Hamburgo, Alemania) durante 1 hora a 4°C. Después de un lavado final, las células se trataron con 2 μ l 6,25 mg/ml de yoduro de propidio y posteriormente se analizaron en un FACSCalibur (Becton Dickison, Heidelberg, Alemania).

Ensayo colorimétrico de proliferación celular

Se determinó el efecto citotóxico de los complejos recombinantes (inmunoquinasas) sobre las células diana por medición de la metabolización de la sal amarilla de tetrazolio (XTT) a un colorante de formazano naranja soluble en agua como publicaron Barth, S. *et al.* 2000. Se distribuyeron diversas diluciones de la inmunoquinasa recombinante en alícuotas de 100 μ l en placas de 96 pocillos. Se añadieron de dos a cuatro $\times 10^4$ células diana en alícuotas de 100 μ l de medio completo y se incubaron las placas durante 48 horas a 37°C. Después, los cultivos celulares se pulsaron con 100 μ l de medio de cultivo fresco complementado con XTT/PMS (concentraciones finales de 0,3 mg y 0,383 ng, respectivamente) durante 4 horas. Las absorbancias espectrofotométricas de las muestras se midieron a 450 y 650 nm (longitud de onda de referencia) con un lector de ELISA (MWG Biotech). La concentración requerida para lograr una reducción del 50% de la síntesis de proteínas (IC_{50}) con respecto a las células control no tratadas y a los controles positivos tratados con Triton X al 1% se calculó gráficamente a través de diagramas de generados en Excel. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Referencias

1. Kaminski, M. S., Zasadny, K. R., Francis, I. R., Fenner, M. C., Ross, C. W., Milik, A. W., Estes, J., Tuck, M., Regan, D., Fisher, S., Glenn, S. D., and Wahl, R. L. Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 14: 1974-1981, 1996.
2. Pennell, C. A. and Erickson, H. A. Designing immunotoxins for cancer therapy. *Immunol Res*, 25: 177-191, 2002.
3. Chaudhary, V. K., Gallo, M. G., FitzGerald, D. J., and Pastan, I. A recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 9491-9494, 1990.
4. Brinkmann, U., Keppler-Hafkemeyer, A., and Hafkemeyer, P. Recombinant immunotoxins for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 1: 693-702, 2001.
5. Frankel, A. E., Tagge, E. P., and Willingham, M. C. Clinical trials of targeted toxins. *Semin Cancer Biol*, 6: 307-317, 1995.
6. Youle, R. J., Newton, D., Wu, Y. N., Gadina, M., and Rybak, S. M. Cytotoxic ribonucleases and chimeras in cancer therapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 10: 1-28, 1993.
7. Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F., and Vallee, B. L. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*, 24: 5480-5486, 1985.
8. Huhn, M., Sasse, S., Tur, M. K., Matthey, B., Schinkothe, T., Rybak, S. M., Barth, S., and Engert, A. Human angiogenin fused to human CD30 ligand (Ang-CD30L) exhibits specific cytotoxicity against CD30-positive lymphoma. *Cancer Res*, 61: 8737-8742, 2001.
9. Newton, D. L. and Rybak, S. M. Preparation and preclinical characterization of RNase-based immunofusion proteins. *Methods Mol Biol*, 160: 387-406, 2001.
10. Goueli, S. Protein Kinases as Drug Targets in High-Throughput Systems. *Promega Notes*, 75: 24-28, 2000.
11. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, 298: 1912-1934, 2002.
12. Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241: 42- 52, 1988.
13. Ryazanov, A. G., Pavur, K. S., and Dorovkov, M. V. Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr Biol*, 9: 43-45, 1999.
14. Braun, A. P. and Schulman, H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol*, 57: 417-445, 1995.
15. Deiss, L. P., Feinstein, E., Berissi, H., Cohen, O., and Kimchi, A. Identification of a novel serine/ threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev*, 9: 15-30, 1995.

16. Nakatsuka, S., Takakuwa, T., Tomita, Y., Hoshida, Y., Nishiu, M., Yamaguchi, M., Nishii, K., Yang, W. I., and Aozasa, K. Hypermethylation of death-associated protein (DAP) kinase CpG island is frequent not only in B-cell but also in T- and natural killer (NK)/T-cell malignancies. *Cancer Sci*, 94: 87-91, 2003.
- 5 17. Cohen, O., Feinstein, E., and Kimchi, A. DAPkinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *Embo J*, 16: 998-1008, 1997.
18. Pavur, K. S., Petrov, A. N., and Ryazanov, A. G. Mapping the functional domains of elongation factor-2 kinase. *Biochemistry*, 39: 12216-12224, 2000.
- 10 19. Diggle, T. A., Subkhankulova, T., Lilley, K. S., Shikotra, N., Willis, A. E., and Redpath, N. T. Phosphorylation of elongation factor-2 kinase on serine 499 by cAMP-dependent protein kinase induces Ca²⁺/calmodulin-independent activity. *Biochem J*, 353: 621-626, 2001.

REIVINDICACIONES

1. Complejo endógeno soluble sintético formado a partir de por lo menos un componente A y de por lo menos un componente B que se acoplan químicamente o se fusionan genéticamente el uno al otro, de manera que el componente A comprende anticuerpos como dominio de unión para las estructuras de superficie extracelulares que se internalizan tras la unión del componente A de dicho complejo, y quinasas que promueven la muerte, que consisten en la proteína quinasa asociada a la muerte (DAP-quinasa, DAPk) o la quinasa del factor 2 de elongación eucariota (eEF-2k) como componente B, que tiene una actividad quinasa catalítica constitutiva y realiza la biosíntesis/señalización celular que incluye la muerte celular después de la internalización.
2. Complejo según la reivindicación 1, en el que los anticuerpos son anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos que conservan la función de unión al antígeno y la especificidad del anticuerpo parental.
3. Complejo según la reivindicación 1 ó 2, de manera que el componente B comprende DAP-quinasa 2 (DAPk2).
4. Complejo según las reivindicaciones 1 a 3, que comprende uno o más componentes complementarios S que regulan la biosíntesis de proteínas a nivel de la transcripción y/o de la traducción, y/o permiten la purificación y/o la detección del complejo, y/o facilitan la translocación de por lo menos el componente B en la célula diana, y la activación y/o la separación intracelular del componente B, de manera que el componente S se selecciona del grupo de los promotores inducibles, las secuencias líder, los marcadores de afinidad, los marcadores His, un dominio de translocación, las secuencias anfipáticas y una proenzima B sintética.
5. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene las secuencias de la SEC ID N°: 2 o la SEC ID N°: 4 y I SEC ID N°: 6.
6. Molécula de ácido nucleico que codifica para el complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o para los componentes individuales del mismo para la preparación de tal complejo, y/o un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico.
7. Célula u organismo no humano después de haber sido transformado o transfectado con el vector o la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6, y/o un sistema de traducción *in vitro* que sintetiza el complejo completo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o los componentes individuales del mismo.
8. Organismo o célula según la reivindicación 7, de manera que el organismo sea un procarionota, o un eucariota inferior, un eucariota superior no humano, y la célula sea una célula de mamífero primaria o cultivada, tal como una célula humana recién aislada excepto las células embrionarias humanas, o una línea celular eucariota.
9. Uso de un complejo endógeno soluble sintético formado a partir de por lo menos un componente A y de por lo menos un componente B, de manera que el componente A comprende anticuerpos como dominio de unión para las estructuras de superficie extracelulares que se internalizan tras la unión del componente A de dicho complejo, y quinasas que promueven la muerte, que consisten en la proteína quinasa asociada a la muerte (DAP-quinasa, DAPk) o la quinasa del factor 2 de elongación eucariota (eEF-2k) como componente B, que tiene una actividad quinasa catalítica constitutiva y que realiza la biosíntesis/señalización celular que incluye la muerte celular después de la internalización, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades proliferativas, tales como las enfermedades proliferativas cancerosas o no cancerosas, las alergias, las enfermedades autoinmunes, y/o la inflamación crónica.
10. Uso según la reivindicación 9 en el que los anticuerpos son anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos que conservan la función de unión al antígeno y la especificidad del anticuerpo parental.
11. Medicamento que comprende un complejo endógeno soluble sintético formado a partir de por lo menos un componente A y de por lo menos un componente B, de manera que el componente A comprende anticuerpos como dominio de unión para las estructuras de superficie extracelulares que se internalizan tras la unión del componente A de dicho complejo, y quinasas que promueven la muerte, que consisten en la proteína quinasa asociada a la muerte (DAP-quinasa, DAPk) o la quinasa del factor 2 de elongación eucariota (eEF-2k) como componente B, que tiene una actividad quinasa catalítica constitutiva y que realiza la biosíntesis/señalización celular que incluye la muerte celular después de la internalización.
12. Medicamento según la reivindicación 11 en el que los anticuerpos son anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos que conservan la función de unión al antígeno y la especificidad del anticuerpo parental.

Fig. 1

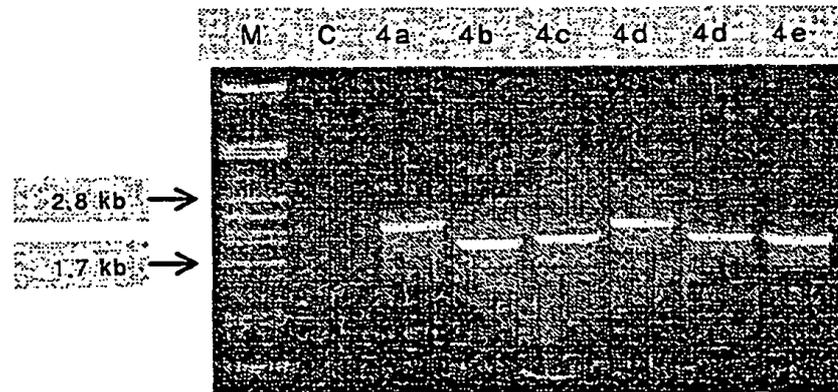
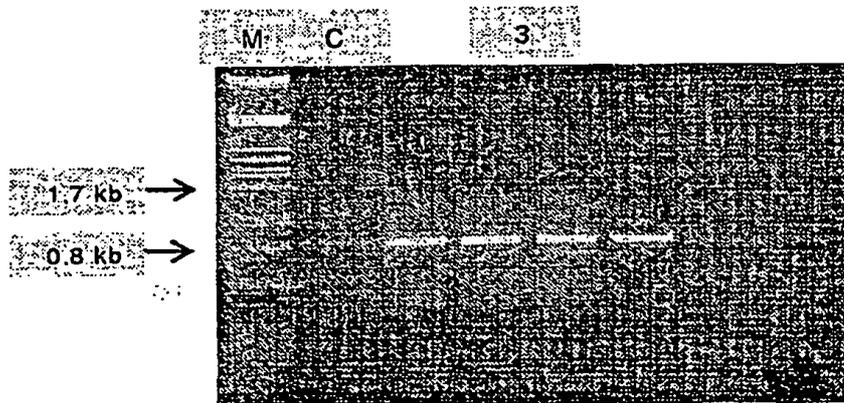
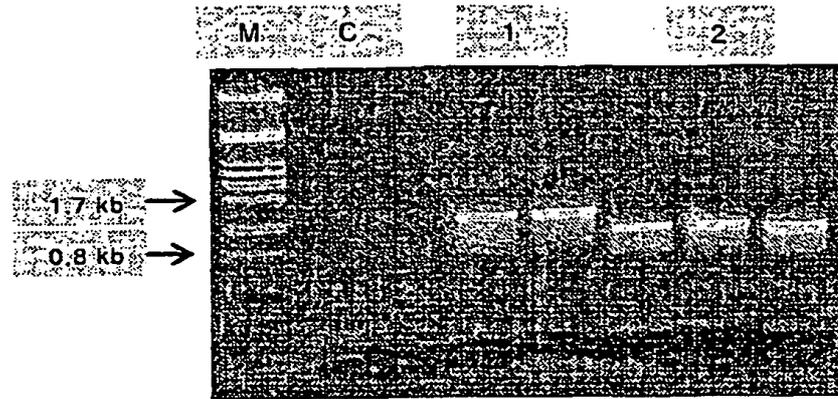


Fig.2

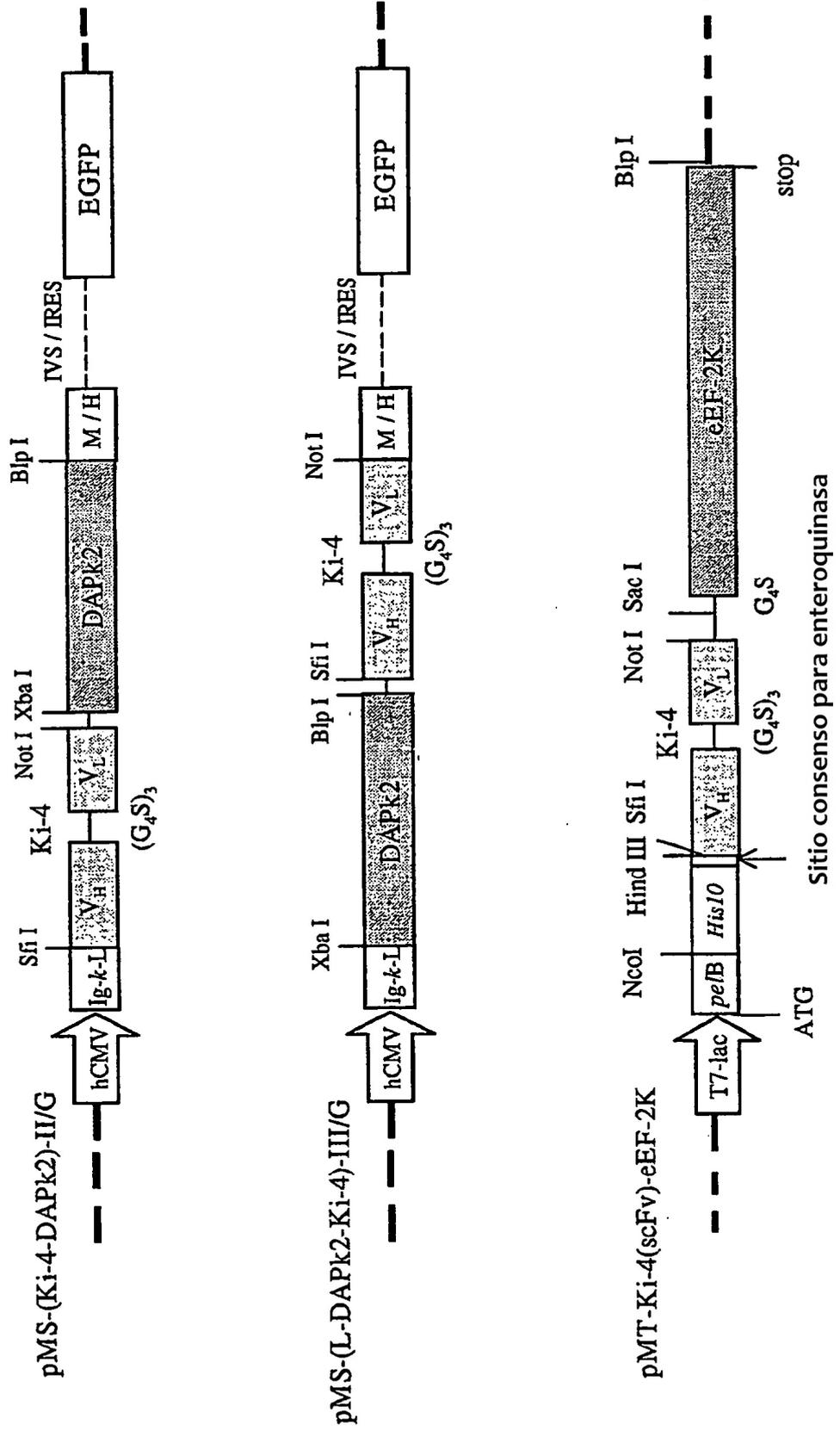
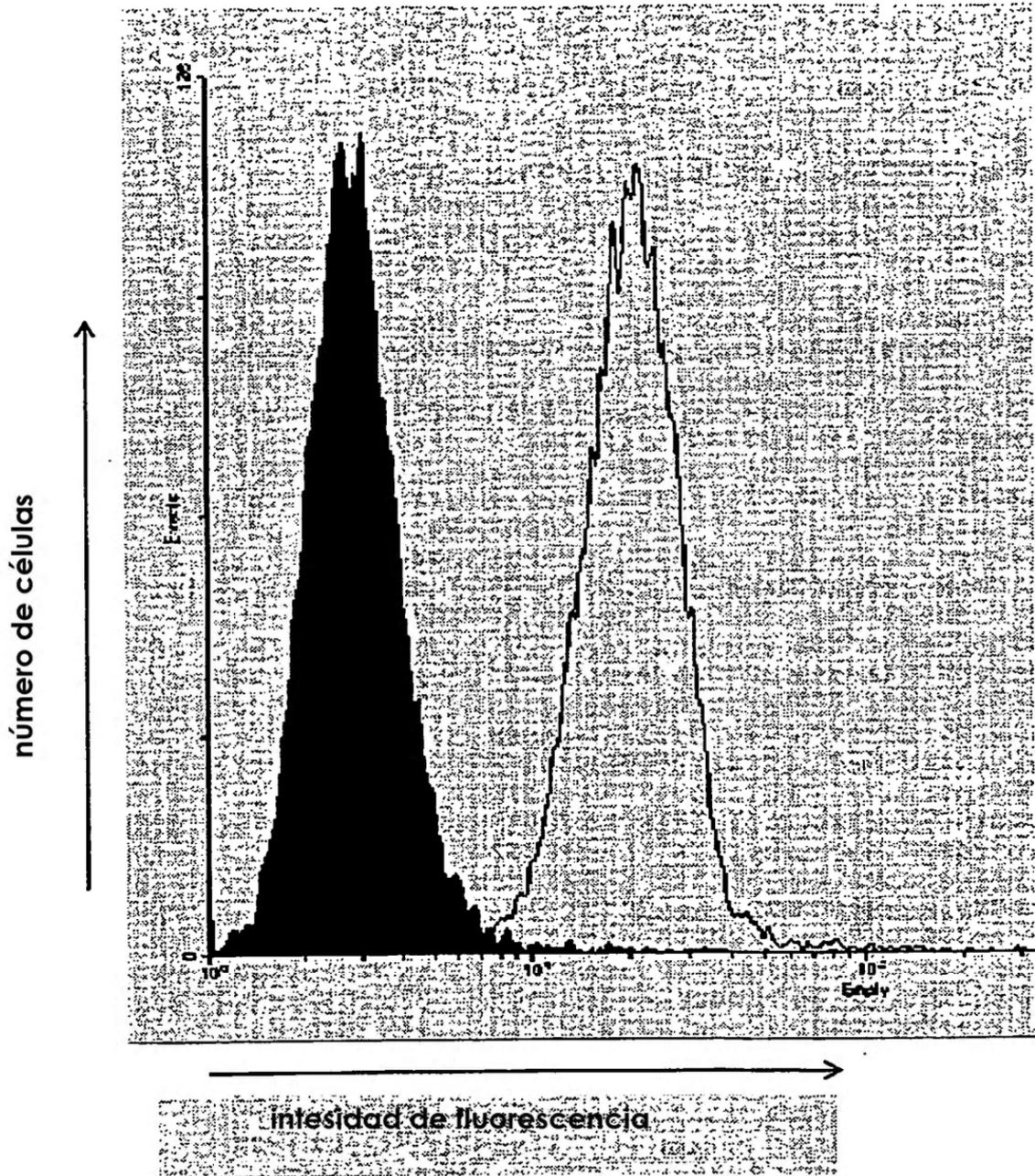


Fig.3



- 4 / 22 -

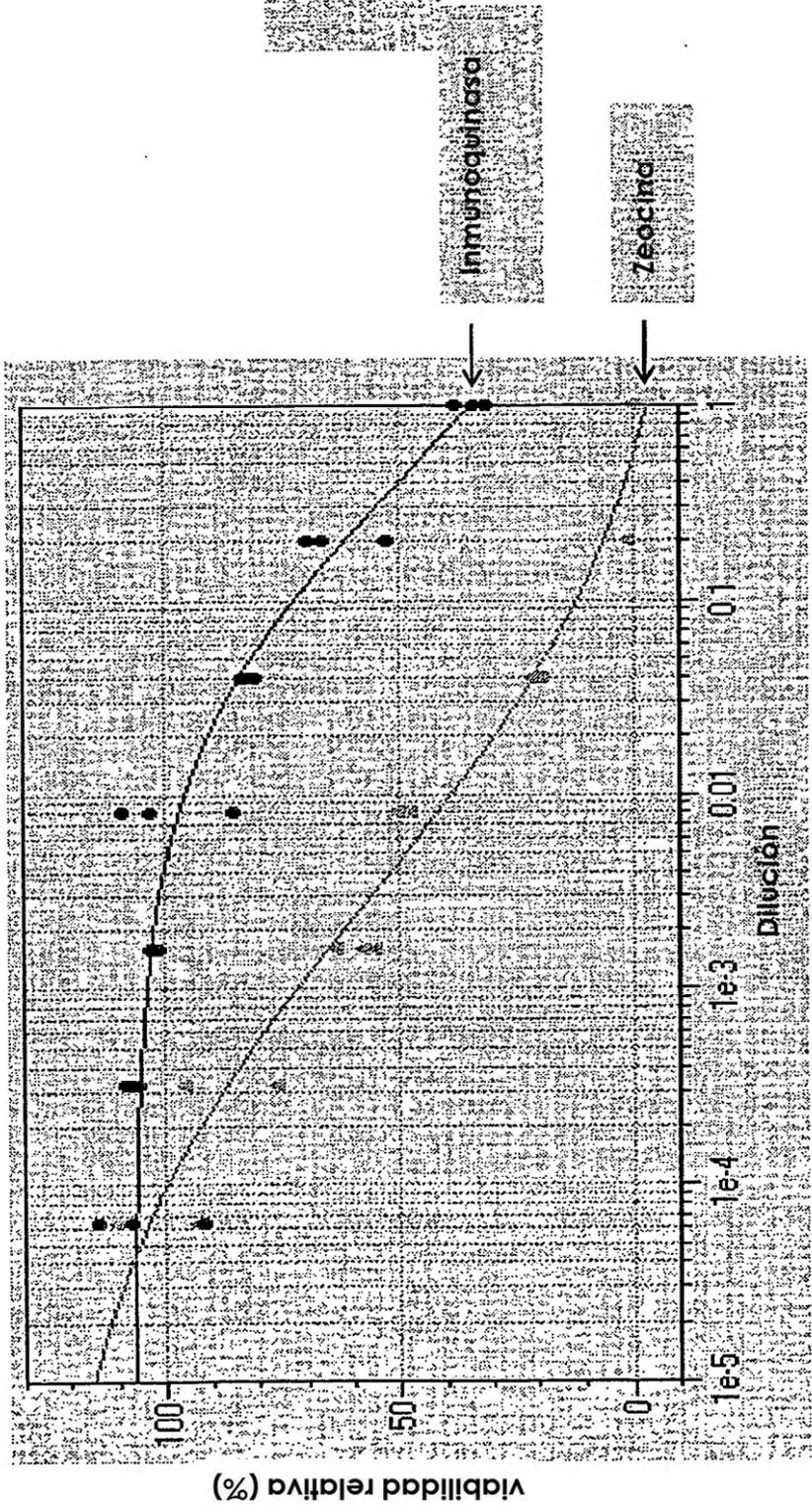


Fig.4

Fig. 5

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

ES 2 384 940 T3

tat	atc	ctt	cta	agt	gga	gcg	tcc	ccc	ttc	ctg	gga	gac	aca	aaa	caa	768
Tyr	Ile	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala	Ser	Pro	Phe	Leu	Gly	Asp	Thr	Lys	Gln	
				245					250					255		
gaa	acc	ctg	gca	aat	atc	act	gct	gtg	agt	tac	gac	ttt	gat	gag	gaa	816
Glu	Thr	Leu	Ala	Asn	Ile	Thr	Ala	Val	Ser	Tyr	Asp	Phe	Asp	Glu	Glu	
			260					265					270			
ttc	ttc	agc	cag	aca	agc	gag	ctg	gcc	aag	gac	ttc	att	cgg	aag	ctt	864
Phe	Phe	Ser	Gln	Thr	Ser	Glu	Leu	Ala	Lys	Asp	Phe	Ile	Arg	Lys	Leu	
		275					280					285				
ctt	gtg	aaa	gag	acc	cgg	aaa	cgg	ctt	acc	atc	caa	gag	gct	ctc	aga	912
Leu	Val	Lys	Glu	Thr	Arg	Lys	Arg	Leu	Thr	Ile	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	
	290					295					300					
cat	ccc	tgg	atc	gga	tcc	aaa	cta	gct	gag	cac	gaa	ggt	gac	gcg	gcc	960
His	Pro	Trp	Ile	Gly	Ser	Lys	Leu	Ala	Glu	His	Glu	Gly	Asp	Ala	Ala	
305				310						315					320	
cag	ccg	gcc	atg	gcc	cag	gtc	aag	ctg	cag	gag	tca	ggg	act	gaa	ctg	1008
Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Thr	Glu	Leu	
				325					330					335		
gca	aag	cct	ggg	gcc	gca	gtg	aag	atg	tcc	tgc	aag	gct	tct	ggc	tac	1056
Ala	Lys	Pro	Gly	Ala	Ala	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	
			340					345					350			
acc	ttt	act	gac	tac	tgg	atg	cac	tgg	gtt	aaa	cag	agg	cct	gga	cag	1104
Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	
		355					360					365				
ggt	ctg	gaa	tgg	att	gga	tac	att	aat	cct	aac	act	gct	tat	act	gac	1152
Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Asn	Thr	Ala	Tyr	Thr	Asp	
	370					375					380					
tac	aat	cag	aaa	ttc	aag	gac	aag	gcc	aca	ttg	act	gca	gac	aaa	tcc	1200
Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	
385				390					395						400	
tcc	agc	aca	gcc	tac	atg	caa	ctg	cgc	agc	ctg	acc	tct	gag	gat	tct	1248
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	
			405						410					415		
gca	gtc	tat	tac	tgt	gca	aaa	aag	aca	act	cag	act	acg	tgg	ggg	ttt	1296
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Lys	Thr	Thr	Gln	Thr	Thr	Trp	Gly	Phe	
			420					425					430			
cct	ttt	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	ggt	gga	ggc	1344
Pro	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	
		435				440						445				
ggt	tca	ggc	gga	ggt	ggc	tct	ggc	ggt	ggc	gga	tcg	gac	att	gtg	ctg	1392
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu	
	450					455					460					
acc	cag	tct	cca	aaa	tcc	atg	gcc	atg	tca	gtc	gga	gag	agg	gtc	acc	1440
Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Ser	Met	Ala	Met	Ser	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Thr	
465				470						475					480	

ES 2 384 940 T3

ttg agc tgc aag gcc agt gag aat gtg gat tct ttt gtt tcc tgg tat	1488
Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Ser Phe Val Ser Trp Tyr	
485 490 495	
caa cag aaa cca gcc cag tct cct aaa ctg ctg ata tac ggg gcc tcc	1536
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser	
500 505 510	
aac cgg tac act ggg gtc ccc gat cgc ttc gca ggc agt gga tct gga	1584
Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ala Gly Ser Gly Ser Gly	
515 520 525	
aga gat ttc act ctg acc atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctt gca	1632
Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala	
530 535 540	
gat tat cac tgt gga cag aat tac agg tat ccg ctc acg ttc ggt gct	1680
Asp Tyr His Cys Gly Gln Asn Tyr Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala	
545 550 555 560	
ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg gcg gcc gca ggg ccc gaa caa aaa	1728
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Gly Pro Glu Gln Lys	
565 570 575	
ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat	1776
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His	
580 585 590	
cat cat tga	1785
His His	
595	

Fig. 6

Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
1				5					10					15	
Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ser	Arg	Met	Val	Gln	Ala	Ser	Met	Arg	Ser	Pro
			20					25					30		
Asn	Met	Glu	Thr	Phe	Lys	Gln	Gln	Lys	Val	Glu	Asp	Phe	Tyr	Asp	Ile
		35					40					45			
Gly	Glu	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	Gln	Phe	Ala	Ile	Val	Lys	Lys	Cys	Arg
	50					55					60				
Glu	Lys	Ser	Thr	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Lys	Phe	Ile	Lys	Lys	Arg
	65				70					75					80
Gln	Ser	Arg	Ala	Ser	Arg	Arg	Gly	Val	Cys	Arg	Glu	Glu	Ile	Glu	Arg
				85					90					95	
Glu	Val	Ser	Ile	Leu	Arg	Gln	Val	Leu	His	Pro	Asn	Ile	Ile	Thr	Leu
			100					105					110		
His	Asp	Val	Tyr	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Val	Val	Leu	Ile	Leu	Glu	Leu
	115						120					125			
Val	Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Phe	Asp	Phe	Leu	Ala	Gln	Lys	Glu	Ser	Leu
	130					135					140				
Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Phe	Ile	Lys	Gln	Ile	Leu	Asp	Gly	Val
145					150					155					160
Asn	Tyr	Leu	His	Thr	Lys	Lys	Ile	Ala	His	Phe	Asp	Leu	Lys	Pro	Glu
				165					170					175	
Asn	Ile	Met	Leu	Leu	Asp	Lys	Asn	Ile	Pro	Ile	Pro	His	Ile	Lys	Leu
		180						185					190		
Ile	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	His	Glu	Ile	Glu	Asp	Gly	Val	Glu	Phe	Lys
	195						200					205			
Asn	Ile	Phe	Gly	Thr	Pro	Glu	Phe	Val	Ala	Pro	Glu	Ile	Val	Asn	Tyr
	210					215					220				
Glu	Pro	Leu	Gly	Leu	Glu	Ala	Asp	Met	Trp	Ser	Ile	Gly	Val	Ile	Thr
225					230					235					240
Tyr	Ile	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala	Ser	Pro	Phe	Leu	Gly	Asp	Thr	Lys	Gln
				245					250					255	
Glu	Thr	Leu	Ala	Asn	Ile	Thr	Ala	Val	Ser	Tyr	Asp	Phe	Asp	Glu	Glu
			260					265					270		
Phe	Phe	Ser	Gln	Thr	Ser	Glu	Leu	Ala	Lys	Asp	Phe	Ile	Arg	Lys	Leu
		275					280					285			
Leu	Val	Lys	Glu	Thr	Arg	Lys	Arg	Leu	Thr	Ile	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg
	290					295					300				
His	Pro	Trp	Ile	Gly	Ser	Lys	Leu	Ala	Glu	His	Glu	Gly	Asp	Ala	Ala
305					310				315						320
Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Thr	Glu	Leu
				325					330					335	
Ala	Lys	Pro	Gly	Ala	Ala	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr
			340					345					350		
Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln
		355					360					365			
Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Asn	Thr	Ala	Tyr	Thr	Asp
	370					375				380					
Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
385					390					395					400
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser
				405					410					415	
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Lys	Thr	Thr	Gln	Thr	Thr	Trp	Gly	Phe
			420					425					430		
Pro	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
		435					440					445			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu
	450					455					460				

Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Ser	Met	Ala	Met	Ser	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Thr
465					470					475					480
Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Glu	Asn	Val	Asp	Ser	Phe	Val	Ser	Trp	Tyr
				485					490					495	
Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser
			500					505					510		
Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ala	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
		515					520					525			
Arg	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala
	530					535					540				
Asp	Tyr	His	Cys	Gly	Gln	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala
545					550					555					560
Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Glu	Gln	Lys
				565					570					575	
Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser	Ala	Val	Asp	His	His	His	His
			580					585					590		
His	His														

Fig. 7

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

ES 2 384 940 T3

gtg. cag gct gaa gac ctt gca gat tat cac tgt gga cag aat tac agg	768
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Asn Tyr Arg	
245 250 255	
tat ccg ctc acg ttc ggt gct ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg gcg	816
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala	
260 265 270	
gcc gca ctc gag tct aga atg gtc cag gcc tcg atg agg agc cca aat	864
Ala Ala Leu Glu Ser Arg Met Val Gln Ala Ser Met Arg Ser Pro Asn	
275 280 285	
atg gag acg ttc aaa cag cag aag gtg gag gac ttt tat gat att gga	912
Met Glu Thr Phe Lys Gln Gln Lys Val Glu Asp Phe Tyr Asp Ile Gly	
290 295 300	
gag gag ctg ggc agt ggc cag ttt gcc atc gtg aag aag tgc cgg gag	960
Glu Glu Leu Gly Ser Gly Gln Phe Ala Ile Val Lys Lys Cys Arg Glu	
305 310 315 320	
aag agc acg ggg ctg gag tat gca gcc aag ttc att aag aag agg cag	1008
Lys Ser Thr Gly Leu Glu Tyr Ala Ala Lys Phe Ile Lys Lys Arg Gln	
325 330 335	
agc cgg gcc agc cgt cgg ggc gtg tgc cgg gag gaa atc gag cgg gag	1056
Ser Arg Ala Ser Arg Arg Gly Val Cys Arg Glu Glu Ile Glu Arg Glu	
340 345 350	
gtg agc atc ctg cgg cag gtg ctg cac ccc aac atc atc acg ctg cac	1104
Val Ser Ile Leu Arg Gln Val Leu His Pro Asn Ile Ile Thr Leu His	
355 360 365	
gac ctc tat gag aac cgc acc gac gtg gtg ctc atc ctt gag cta gtg	1152
Asp Leu Tyr Glu Asn Arg Thr Asp Val Val Leu Ile Leu Glu Leu Val	
370 375 380	
tcc gga gga gaa ctg ttt gat ttc ctg gcc cag aag gag tcg tta agt	1200
Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Phe Leu Ala Gln Lys Glu Ser Leu Ser	
385 390 395 400	
gag gag gaa gcc acc agc ttc att aag cag atc ctg gat ggg gtg aat	1248
Glu Glu Glu Ala Thr Ser Phe Ile Lys Gln Ile Leu Asp Gly Val Asn	
405 410 415	
tac ctt cac aca aag aaa att gct cac ttt gat ctc aag cca gaa aac	1296
Tyr Leu His Thr Lys Lys Ile Ala His Phe Asp Leu Lys Pro Glu Asn	
420 425 430	
atc atg ttg tta gac aag aat atc cca att cca cac atc aag ctg att	1344
Ile Met Leu Leu Asp Lys Asn Ile Pro Ile Pro His Ile Lys Leu Ile	
435 440 445	
gac ttt ggc ctg gct cac gaa ata gaa gat gga gtt gaa ttt aaa aac	1392
Asp Phe Gly Leu Ala His Glu Ile Glu Asp Gly Val Glu Phe Lys Asn	
450 455 460	
att ttt ggg aca cct gaa ttt gtt gct cca gaa atc gtg aac tat gag	1440
Ile Phe Gly Thr Pro Glu Phe Val Ala Pro Glu Ile Val Asn Tyr Glu	
465 470 475 480	

cca	ctg	gga	ctg	gag	gcc	gac	atg	tgg	agc	att	gga	gtc	atc	acc	tat	1488
Pro	Leu	Gly	Leu	Glu	Ala	Asp	Met	Trp	Ser	Ile	Gly	Val	Ile	Thr	Tyr	
				485					490					495		
atc	ctt	cta	agt	gga	gcg	tcc	ccc	ttc	ctg	gga	gac	aca	aaa	caa	gaa	1536
Ile	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala	Ser	Pro	Phe	Leu	Gly	Asp	Thr	Lys	Gln	Glu	
			500					505						510		
acc	ctg	gca	aat	atc	act	gct	gtg	agt	tac	gac	ttt	gat	gag	gaa	ttc	1584
Thr	Leu	Ala	Asn	Ile	Thr	Ala	Val	Ser	Tyr	Asp	Phe	Asp	Glu	Glu	Phe	
		515					520					525				
ttc	agc	cag	aca	agc	gag	ctg	gcc	aag	gac	ttc	att	cgg	aag	ctt	ctt	1632
Phe	Ser	Gln	Thr	Ser	Glu	Leu	Ala	Lys	Asp	Phe	Ile	Arg	Lys	Leu	Leu	
	530					535					540					
gtg	aaa	gag	acc	cgg	aaa	cgg	ctt	acc	atc	caa	gag	gct	ctc	aga	cat	1680
Val	Lys	Glu	Thr	Arg	Lys	Arg	Leu	Thr	Ile	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	His	
	545				550					555					560	
ccc	tgg	atc	gga	tcc	aaa	cta	gct	gag	cac	gaa	ttt	cga	gga	ggg	ccc	1728
Pro	Trp	Ile	Gly	Ser	Lys	Leu	Ala	Glu	His	Glu	Phe	Arg	Gly	Gly	Pro	
				565					570					575		
gaa	caa	aaa	ctc	atc	tca	gaa	gag	gat	ctg	aat	agc	gcc	gtc	gac	cat	1776
Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser	Ala	Val	Asp	His	
			580					585					590			
cat	cat	cat	cat	cat	tga											1794
His	His	His	His	His												
			595													

Fig. 8

Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
1				5					10					15	
Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Val	Lys	Leu
			20					25					30		
Gln	Glu	Ser	Gly	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Pro	Gly	Ala	Ala	Val	Lys	Met
		35					40					45			
Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Trp	Met	His	Trp
	50					55					60				
Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn
65					70					75					80
Pro	Asn	Thr	Ala	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala
				85					90					95	
Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Arg
			100					105					110		
Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Lys	Thr
		115					120					125			
Thr	Gln	Thr	Thr	Trp	Gly	Phe	Pro	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
	130				135						140				
Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
145				150						155					160
Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Ser	Met	Ala	Met
				165					170					175	
Ser	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Glu	Asn	Val
			180					185					190		
Asp	Ser	Phe	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys
		195					200					205			
Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg
	210					215					220				
Phe	Ala	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Arg	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
225				230						235					240
Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	His	Cys	Gly	Gln	Asn	Tyr	Arg
				245					250					255	
Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala
			260					265					270		
Ala	Ala	Leu	Glu	Ser	Arg	Met	Val	Gln	Ala	Ser	Met	Arg	Ser	Pro	Asn
		275					280					285			
Met	Glu	Thr	Phe	Lys	Gln	Gln	Lys	Val	Glu	Asp	Phe	Tyr	Asp	Ile	Gly
	290					295					300				
Glu	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	Gln	Phe	Ala	Ile	Val	Lys	Lys	Cys	Arg	Glu
305					310					315					320
Lys	Ser	Thr	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Lys	Phe	Ile	Lys	Lys	Arg	Gln
				325					330					335	
Ser	Arg	Ala	Ser	Arg	Arg	Gly	Val	Cys	Arg	Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Glu
			340					345					350		
Val	Ser	Ile	Leu	Arg	Gln	Val	Leu	His	Pro	Asn	Ile	Ile	Thr	Leu	His
		355					360						365		
Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Val	Val	Leu	Ile	Leu	Glu	Leu	Val
	370					375					380				
Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Phe	Asp	Phe	Leu	Ala	Gln	Lys	Glu	Ser	Leu	Ser
385					390					395					400
Glu	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Phe	Ile	Lys	Gln	Ile	Leu	Asp	Gly	Val	Asn
				405					410					415	
Tyr	Leu	His	Thr	Lys	Lys	Ile	Ala	His	Phe	Asp	Leu	Lys	Pro	Glu	Asn
			420					425					430		
Ile	Met	Leu	Leu	Asp	Lys	Asn	Ile	Pro	Ile	Pro	His	Ile	Lys	Leu	Ile
		435					440					445			
Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	His	Glu	Ile	Glu	Asp	Gly	Val	Glu	Phe	Lys	Asn
	450					455					460				

Ile	Phe	Gly	Thr	Pro	Glu	Phe	Val	Ala	Pro	Glu	Ile	Val	Asn	Tyr	Glu
465					470					475					480
Pro	Leu	Gly	Leu	Glu	Ala	Asp	Met	Trp	Ser	Ile	Gly	Val	Ile	Thr	Tyr
				485					490					495	
Ile	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala	Ser	Pro	Phe	Leu	Gly	Asp	Thr	Lys	Gln	Glu
			500					505					510		
Thr	Leu	Ala	Asn	Ile	Thr	Ala	Val	Ser	Tyr	Asp	Phe	Asp	Glu	Glu	Phe
		515					520					525			
Phe	Ser	Gln	Thr	Ser	Glu	Leu	Ala	Lys	Asp	Phe	Ile	Arg	Lys	Leu	Leu
	530					535					540				
Val	Lys	Glu	Thr	Arg	Lys	Arg	Leu	Thr	Ile	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	His
545					550					555					560
Pro	Trp	Ile	Gly	Ser	Lys	Leu	Ala	Glu	His	Glu	Phe	Arg	Gly	Gly	Pro
				565					570					575	
Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser	Ala	Val	Asp	His
			580					585					590		
His	His	His	His	His											
		595													

Fig. 9

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

gcc tcc aac cgg tac act ggg gtc ccc gat cgc ttc gca ggc agt gga	768
Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ala Gly Ser Gly	
245 250 255	
tct gga aga gat ttc act ctg acc atc agc agt gtg cag gct gaa gac	816
Ser Gly Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp	
260 265 270	
ctt gca gat tat cac tgt gga cag aat tac agg tat ccg ctc acg ttc	864
Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Asn Tyr Arg Tyr Pro Leu Thr Phe	
275 280 285	
ggg gct ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg gcg gcc gca gag ctc ggc	912
Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Leu Gly	
290 295 300	
gga ggt ggc tct atg gca gac gaa gat ctc atc ttc cgc ctg gaa ggc	960
Gly Gly Gly Ser Met Ala Asp Glu Asp Leu Ile Phe Arg Leu Glu Gly	
305 310 315 320	
gtt gat ggc ggc cag tcc ccc cga gct ggc cat gat ggt gat tct gat	1008
Val Asp Gly Gly Gln Ser Pro Arg Ala Gly His Asp Gly Asp Ser Asp	
325 330 335	
ggg gac agc gac gat gag gaa ggt tac ttc atc tgc ccc atc acg gat	1056
Gly Asp Ser Asp Asp Glu Glu Gly Tyr Phe Ile Cys Pro Ile Thr Asp	
340 345 350	
gac cca agc tcg aac cag aat gtc aat tcc aag gtt aat aag tac tac	1104
Asp Pro Ser Ser Asn Gln Asn Val Asn Ser Lys Val Asn Lys Tyr Tyr	
355 360 365	
agc aac cta aca aaa agt gag cgg tat agc tcc agc ggg tcc ccg gca	1152
Ser Asn Leu Thr Lys Ser Glu Arg Tyr Ser Ser Ser Gly Ser Pro Ala	
370 375 380	
aac tcc ttc cac ttc aag gaa gcc tgg aag cac gca atc cag aag gcc	1200
Asn Ser Phe His Phe Lys Glu Ala Trp Lys His Ala Ile Gln Lys Ala	
385 390 395 400	
aag cac atg ccc gac ccc tgg gct gag ttc cac ctg gaa gat att gcc	1248
Lys His Met Pro Asp Pro Trp Ala Glu Phe His Leu Glu Asp Ile Ala	
405 410 415	
acc gaa cgt gct act cga cac agg tac aac gcc gtc acc ggg gaa tgg	1296
Thr Glu Arg Ala Thr Arg His Arg Tyr Asn Ala Val Thr Gly Glu Trp	
420 425 430	
ctg gat gat gaa gtt ctg atc aag atg gca tct cag ccc ttc ggc cga	1344
Leu Asp Asp Glu Val Leu Ile Lys Met Ala Ser Gln Pro Phe Gly Arg	
435 440 445	
gga gca atg agg gag tgc ttc cgg acg aag aag ctc tcc aac ttc ttg	1392
Gly Ala Met Arg Glu Cys Phe Arg Thr Lys Lys Leu Ser Asn Phe Leu	
450 455 460	
cat gcc cag cag tgg aag ggc gcc tcc aac tac gtg gcg aag cgc tac	1440
His Ala Gln Gln Trp Lys Gly Ala Ser Asn Tyr Val Ala Lys Arg Tyr	
465 470 475 480	

ES 2 384 940 T3

atc gag ccc gta gac cgg gat gtg tac ttt gag gac gtg cgt cta cag	1488
Ile Glu Pro Val Asp Arg Asp Val Tyr Phe Glu Asp Val Arg Leu Gln	
485 490 495	
atg gag gcc aag ctc tgg ggg gag gag tat aat cgg cac aag ccc ccc	1536
Met Glu Ala Lys Leu Trp Gly Glu Glu Tyr Asn Arg His Lys Pro Pro	
500 505 510	
aag cag gtg gac atc atg cag atg tgc atc atc gag ctg aag gac aga	1584
Lys Gln Val Asp Ile Met Gln Met Cys Ile Ile Glu Leu Lys Asp Arg	
515 520 525	
ccg ggc aag ccc ctc ttc cac ctg gag cac tac atc gag ggc aag tac	1632
Pro Gly Lys Pro Leu Phe His Leu Glu His Tyr Ile Glu Gly Lys Tyr	
530 535 540	
atc aag tac aac tcc aac tct ggc ttt gtc cgc gat gac aac atc cgc	1680
Ile Lys Tyr Asn Ser Asn Ser Gly Phe Val Arg Asp Asp Asn Ile Arg	
545 550 555 560	
ctg acg ccg cag gcc ttc agc cac ttc act ttt gag cgt tcc ggc cat	1728
Leu Thr Pro Gln Ala Phe Ser His Phe Thr Phe Glu Arg Ser Gly His	
565 570 575	
cag ctg ata gtg gtg gac atc cag gga gtt ggg gat ctc tac act gac	1776
Gln Leu Ile Val Val Asp Ile Gln Gly Val Gly Asp Leu Tyr Thr Asp	
580 585 590	
cca cag atc cac acg gag acg ggc act gac ttt gga gac ggc aac cta	1824
Pro Gln Ile His Thr Glu Thr Gly Thr Asp Phe Gly Asp Gly Asn Leu	
595 600 605	
ggt gtc cgc ggg atg gcg ctc ttc ttc tac tct cat gcc tgc aac cgg	1872
Gly Val Arg Gly Met Ala Leu Phe Phe Tyr Ser His Ala Cys Asn Arg	
610 615 620	
att tgc gag agc atg ggc ctt gct ccc ttt gag ctc tcg ccc cgg gag	1920
Ile Cys Glu Ser Met Gly Leu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Pro Arg Glu	
625 630 635 640	
agg gat gca gtg aat cag aac acc aag ctg ctg caa tca gcc aag acc	1968
Arg Asp Ala Val Asn Gln Asn Thr Lys Leu Leu Gln Ser Ala Lys Thr	
645 650 655	
atc ttg aga gga aca gag gaa aaa tgt ggg agc ccc cga gta agg acc	2016
Ile Leu Arg Gly Thr Glu Glu Lys Cys Gly Ser Pro Arg Val Arg Thr	
660 665 670	
ctc tct ggg agc cgg cca ccc ctg ctc cgt ccc ctt tca gag aac tct	2064
Leu Ser Gly Ser Arg Pro Pro Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Asn Ser	
675 680 685	
gga gac gag aac atg agc gac gtg acc ttc gac tct ctc cct tct tcc	2112
Gly Asp Glu Asn Met Ser Asp Val Thr Phe Asp Ser Leu Pro Ser Ser	
690 695 700	
cca tct tcg gcc aca cca cac agc cag aag cta gac cac ctc cat tgg	2160
Pro Ser Ser Ala Thr Pro His Ser Gln Lys Leu Asp His Leu His Trp	
705 710 715 720	

ES 2 384 940 T3

cca gtc ttc agt gac ctc gat aac atg gca tcc aga gac cat gat cat	2208
Pro Val Phe Ser Asp Leu Asp Asn Met Ala Ser Arg Asp His Asp His	
725 730 735	
cta gac aac cac cgg gag tct gag aat agt ggg gac agc gga tac ccc	2256
Leu Asp Asn His Arg Glu Ser Glu Asn Ser Gly Asp Ser Gly Tyr Pro	
740 745 750	
agt gag aag cgg ggt gag ctg gat gac cct gag ccc cga gaa cat ggc	2304
Ser Glu Lys Arg Gly Glu Leu Asp Asp Pro Glu Pro Arg Glu His Gly	
755 760 765	
cac tca tac agt aat cgg aag tac gag tct gac gaa gac agc ctg ggc	2352
His Ser Tyr Ser Asn Arg Lys Tyr Glu Ser Asp Glu Asp Ser Leu Gly	
770 775 780	
agc tct gga cgg gta tgt gta gag aag tgg aat ctc ctc aac tcc tcc	2400
Ser Ser Gly Arg Val Cys Val Glu Lys Trp Asn Leu Leu Asn Ser Ser	
785 790 795 800	
cgc ctc cac ctg ccg agg gct tcg gcc gtg gcc ctg gaa gtg caa agg	2448
Arg Leu His Leu Pro Arg Ala Ser Ala Val Ala Leu Glu Val Gln Arg	
805 810 815	
ctt aat gct ctg gac ctc gaa aag aaa atc ggg aag tcc att ttg ggg	2496
Leu Asn Ala Leu Asp Leu Glu Lys Lys Ile Gly Lys Ser Ile Leu Gly	
820 825 830	
aag gtc cat ctg gcc atg gtg cgc tac cac gag ggt ggg cgc ttc tgc	2544
Lys Val His Leu Ala Met Val Arg Tyr His Glu Gly Gly Arg Phe Cys	
835 840 845	
gag aag ggc gag gag tgg gac cag gag tcg gct gtc ttc cac ctg gag	2592
Glu Lys Gly Glu Glu Trp Asp Gln Glu Ser Ala Val Phe His Leu Glu	
850 855 860	
cac gca gcc aac ctg ggc gag ctg gag gcc atc gtg ggc ctg gga ctc	2640
His Ala Ala Asn Leu Gly Glu Leu Glu Ala Ile Val Gly Leu Gly Leu	
865 870 875 880	
atg tac tcg cag ttg cct cat cac atc cta gcc gat gtc tct ctg aag	2688
Met Tyr Ser Gln Leu Pro His His Ile Leu Ala Asp Val Ser Leu Lys	
885 890 895	
gag aca gaa gag aac aaa acc aaa gga ttt gat tac tta cta aag gcc	2736
Glu Thr Glu Glu Asn Lys Thr Lys Gly Phe Asp Tyr Leu Leu Lys Ala	
900 905 910	
gct gaa gct ggc gac agg cag tcc atg atc cta gtg gcg cga gct ttt	2784
Ala Glu Ala Gly Asp Arg Gln Ser Met Ile Leu Val Ala Arg Ala Phe	
915 920 925	
gac tct ggc cag aac ctc agc ccg gac agg tgc caa gac tgg cta gag	2832
Asp Ser Gly Gln Asn Leu Ser Pro Asp Arg Cys Gln Asp Trp Leu Glu	
930 935 940	
gcc ctg cac tgg tac aac act gcc ctg gag atg acg gac tgt gat gag	2880
Ala Leu His Trp Tyr Asn Thr Ala Leu Glu Met Thr Asp Cys Asp Glu	
945 950 955 960	

ggc ggt gag tac gac gga atg cag gac gag ccc cgg tac atg atg ctg	2928
Gly Gly Glu Tyr Asp Gly Met Gln Asp Glu Pro Arg Tyr Met Met Leu	
965 970 975	
gcc agg gag gcc gag atg ctg ttc aca gga ggc tac ggg ctg gag aag	2976
Ala Arg Glu Ala Glu Met Leu Phe Thr Gly Gly Tyr Gly Leu Glu Lys	
980 985 990	
gac ccg cag aga tca ggg gac ttg tat acc cag gca gca gag gca gcg	3024
Asp Pro Gln Arg Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Gln Ala Ala Glu Ala Ala	
995 1000 1005	
atg gaa gcc atg aag ggc cga ctg gcc aac cag tac tac caa aag gct	3072
Met Glu Ala Met Lys Gly Arg Leu Ala Asn Gln Tyr Tyr Gln Lys Ala	
1010 1015 1020	
gaa gag gcc tgg gcc cag atg gag gag taa	3102
Glu Glu Ala Trp Ala Gln Met Glu Glu	
1025 1030	

Fig. 10

Met	Lys	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala
1				5					10						15
Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Met	Gly	His							
			20				25							30	
His	His	Ser	Ser	Gly	His	Ile	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	His	Met	Lys	Leu
		35					40					45			
Met	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Thr
	50					55					60				
Glu	Leu	Ala	Lys	Pro	Gly	Ala	Ala	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser
65					70					75					80
Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro
				85					90					95	
Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Asn	Thr	Ala	Tyr
			100					105					110		
Thr	Asp	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp
		115					120					125			
Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu
	130					135					140				
Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Lys	Thr	Thr	Gln	Thr	Thr	Trp
145					150					155					160
Gly	Phe	Pro	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
				165					170					175	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile
			180					185					190		
Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Ser	Met	Ala	Met	Ser	Val	Gly	Glu	Arg
		195					200					205			
Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Glu	Asn	Val	Asp	Ser	Phe	Val	Ser
	210					215					220				
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly
225					230					235					240
Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ala	Gly	Ser	Gly
				245					250					255	
Ser	Gly	Arg	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp
			260					265				270			
Leu	Ala	Asp	Tyr	His	Cys	Gly	Gln	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe
		275					280					285			
Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Leu	Gly
	290					295				300					
Gly	Gly	Gly	Ser	Met	Ala	Asp	Glu	Asp	Leu	Ile	Phe	Arg	Leu	Glu	Gly
305					310					315					320
Val	Asp	Gly	Gly	Gln	Ser	Pro	Arg	Ala	Gly	His	Asp	Gly	Asp	Ser	Asp
				325					330					335	
Gly	Asp	Ser	Asp	Asp	Glu	Glu	Gly	Tyr	Phe	Ile	Cys	Pro	Ile	Thr	Asp
			340					345					350		
Asp	Pro	Ser	Ser	Asn	Gln	Asn	Val	Asn	Ser	Lys	Val	Asn	Lys	Tyr	Tyr
		355					360					365			
Ser	Asn	Leu	Thr	Lys	Ser	Glu	Arg	Tyr	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Pro	Ala
	370					375						380			
Asn	Ser	Phe	His	Phe	Lys	Glu	Ala	Trp	Lys	His	Ala	Ile	Gln	Lys	Ala
385					390					395					400
Lys	His	Met	Pro	Asp	Pro	Trp	Ala	Glu	Phe	His	Leu	Glu	Asp	Ile	Ala
				405					410					415	
Thr	Glu	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Arg	Tyr	Asn	Ala	Val	Thr	Gly	Glu	Trp
			420					425					430		
Leu	Asp	Asp	Glu	Val	Leu	Ile	Lys	Met	Ala	Ser	Gln	Pro	Phe	Gly	Arg
	435						440					445			
Gly	Ala	Met	Arg	Glu	Cys	Phe	Arg	Thr	Lys	Lys	Leu	Ser	Asn	Phe	Leu
	450					455					460				
His	Ala	Gln	Gln	Trp	Lys	Gly	Ala	Ser	Asn	Tyr	Val	Ala	Lys	Arg	Tyr
465					470					475					480

Ile Glu Pro Val Asp Arg Asp Val Tyr Phe Glu Asp Val Arg Leu Gln
 485 490 495
 Met Glu Ala Lys Leu Trp Gly Glu Glu Tyr Asn Arg His Lys Pro Pro
 500 505 510
 Lys Gln Val Asp Ile Met Gln Met Cys Ile Ile Glu Leu Lys Asp Arg
 515 520 525
 Pro Gly Lys Pro Leu Phe His Leu Glu His Tyr Ile Glu Gly Lys Tyr
 530 535 540
 Ile Lys Tyr Asn Ser Asn Ser Gly Phe Val Arg Asp Asp Asn Ile Arg
 545 550 555 560
 Leu Thr Pro Gln Ala Phe Ser His Phe Thr Phe Glu Arg Ser Gly His
 565 570 575
 Gln Leu Ile Val Val Asp Ile Gln Gly Val Gly Asp Leu Tyr Thr Asp
 580 585 590
 Pro Gln Ile His Thr Glu Thr Gly Thr Asp Phe Gly Asp Gly Asn Leu
 595 600 605
 Gly Val Arg Gly Met Ala Leu Phe Phe Tyr Ser His Ala Cys Asn Arg
 610 615 620
 Ile Cys Glu Ser Met Gly Leu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Pro Arg Glu
 625 630 635 640
 Arg Asp Ala Val Asn Gln Asn Thr Lys Leu Leu Gln Ser Ala Lys Thr
 645 650 655
 Ile Leu Arg Gly Thr Glu Glu Lys Cys Gly Ser Pro Arg Val Arg Thr
 660 665 670
 Leu Ser Gly Ser Arg Pro Pro Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Asn Ser
 675 680 685
 Gly Asp Glu Asn Met Ser Asp Val Thr Phe Asp Ser Leu Pro Ser Ser
 690 695 700
 Pro Ser Ser Ala Thr Pro His Ser Gln Lys Leu Asp His Leu His Trp
 705 710 715 720
 Pro Val Phe Ser Asp Leu Asp Asn Met Ala Ser Arg Asp His Asp His
 725 730 735
 Leu Asp Asn His Arg Glu Ser Glu Asn Ser Gly Asp Ser Gly Tyr Pro
 740 745 750
 Ser Glu Lys Arg Gly Glu Leu Asp Pro Glu Pro Arg Glu His Gly
 755 760 765
 His Ser Tyr Ser Asn Arg Lys Tyr Glu Ser Asp Glu Asp Ser Leu Gly
 770 775 780
 Ser Ser Gly Arg Val Cys Val Glu Lys Trp Asn Leu Leu Asn Ser Ser
 785 790 795 800
 Arg Leu His Leu Pro Arg Ala Ser Ala Val Ala Leu Glu Val Gln Arg
 805 810 815
 Leu Asn Ala Leu Asp Leu Glu Lys Lys Ile Gly Lys Ser Ile Leu Gly
 820 825 830
 Lys Val His Leu Ala Met Val Arg Tyr His Glu Gly Gly Arg Phe Cys
 835 840 845
 Glu Lys Gly Glu Glu Trp Asp Gln Glu Ser Ala Val Phe His Leu Glu
 850 855 860
 His Ala Ala Asn Leu Gly Glu Leu Glu Ala Ile Val Gly Leu Gly Leu
 865 870 875 880
 Met Tyr Ser Gln Leu Pro His His Ile Leu Ala Asp Val Ser Leu Lys
 885 890 895
 Glu Thr Glu Glu Asn Lys Thr Lys Gly Phe Asp Tyr Leu Leu Lys Ala
 900 905 910
 Ala Glu Ala Gly Asp Arg Gln Ser Met Ile Leu Val Ala Arg Ala Phe
 915 920 925
 Asp Ser Gly Gln Asn Leu Ser Pro Asp Arg Cys Gln Asp Trp Leu Glu
 930 935 940
 Ala Leu His Trp Tyr Asn Thr Ala Leu Glu Met Thr Asp Cys Asp Glu
 945 950 955 960

Gly	Gly	Glu	Tyr	Asp	Gly	Met	Gln	Asp	Glu	Pro	Arg	Tyr	Met	Met	Leu
				965					970					975	
Ala	Arg	Glu	Ala	Glu	Met	Leu	Phe	Thr	Gly	Gly	Tyr	Gly	Leu	Glu	Lys
			980					985					990		
Asp	Pro	Gln	Arg	Ser	Gly	Asp	Leu	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala
		995					1000					1005			
Met	Glu	Ala	Met	Lys	Gly	Arg	Leu	Ala	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Gln	Lys	Ala
	1010					1015					1020				
Glu	Glu	Ala	Trp	Ala	Gln	Met	Glu	Glu							
1025					1030										

Fig. 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

Fig. 12

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

Fig. 13

Asp Xaa Trp Xaa Xaa Gly